

ATELIER IMAGEJ

Différentes applications vous sont proposées pour apprendre à utiliser quelques fonctions d'ImageJ :

1.	ANALYSE QUANTITATIVE D'UN GEL D'ELECTROPHORESE.....	2
2.	NUMERATION DE COLONIES BACTERIENNES SUR UNE GELOSE	4
3.	DETERMINATION DU DIAMETRE DES ZONES D'INHIBITION D'UN ANTIBIOGRAMME	5
4.	ANALYSE D'UNE ELECTROPHORESE D'ADN SUR GEL D'AGAROSE.....	6
5.	NUMERATION DE LEVURES (TEST DE VIABILITE AU BLEU DE METHYLENE) PAR UTILISATION DU PLUGIN CELL COUNTER.....	7
6.	UTILISATION DE FICHIERS DICOM (DIGITAL IMAGING AND COMMUNICATION IN MEDICINE)	8
7.	CREER UNE IMAGE COMPOSITE A PARTIR DE 2 IMAGES OBTENUES SUR UN MEME CHAMP MICROSCOPIQUE D'OBSERVATION APRES 2 TRAITEMENTS AVEC DES MARQUEURS FLUORESCENTS SUB-CELLULAIRES DIFFERENTS	10
8.	SUIVI D'EXPERIENCE : MISE EN EVIDENCE ET QUANTIFICATION DE LA FLUIDITE MEMBRANAIRE	11
9.	CREATION ET UTILISATION D'UN FICHIER MACRO	13
8.1	Création d'une Macro.....	13
8.2	Utilisation de la Macro	14



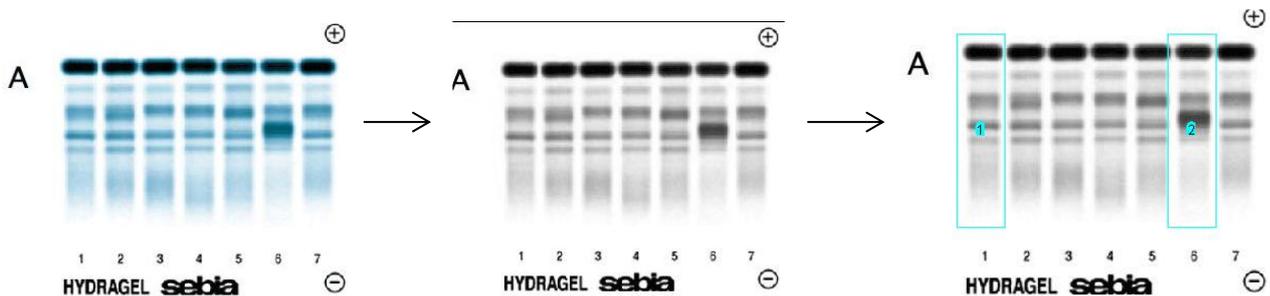
ATELIER IMAGEJ

1. ANALYSE QUANTITATIVE D'UN GEL D'ELECTROPHORESE

- Lancer ImageJ.
- Ouvrir le fichier « electrophorese.jpg » (image d'un gel obtenu après électrophorèse des protéines sériques). : File>Open
- Préparer l'image à l'analyse :
 - ✚ transformer le format couleur en image de type 8-bits. : Image>Type>8bits.
 - ✚ effectuer une inversion de couleur avec la fonction Invert du menu Edit
 - ✚ vérifier les options du menu Analyze > Gels > Gel Analyzer options : ne cocher que l'option « Label with percentages ».
- Tracer la courbe de densité correspondant pour les pistes de migration 1 et 6 :
 - ✚ sélectionner la piste 1 puis la déclarer comme 1^{ère} zone sélectionnée du gel dans le menu Analyze > Gels > Select First Lane . La zone sur l'image est annotée « 1 » : outil Rectangular selections
 - ✚ déplacer la 1^{ère} zone de sélection et la positionner sur la piste 6 (ne pas en créer une nouvelle car les 2 zones de sélection doivent avoir la même taille) puis la déclarer comme 2^{ème} zone sélectionnée du gel dans le menu Analyze > Gels > Select Next Lane. La zone sur l'image est annotée « 2 »

Remarque : renouveler cette opération pour sélectionner d'autres pistes et continuer de les déclarer dans le menu Analyze > Gels > Select Next Lane.

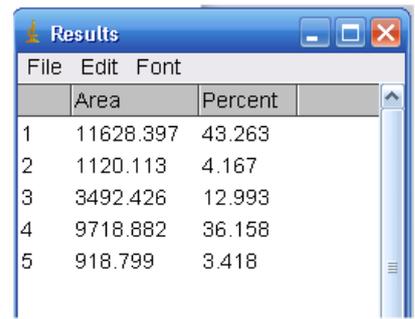
 - ✚ créer les graphes dans le menu Analyze > Gels > Plot Lanes. Une fenêtre s'ouvre avec les 2 graphes l'un sous l'autre. Ouvrir complètement la fenêtre pour observer l'ensemble des pics.



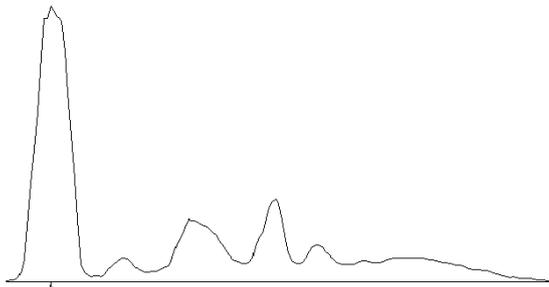
- Délimiter sur chaque graphe les différents pics en traçant une droite entre chaque pic : outils Straight line selections
- Pour chaque piste successivement,
 - ✚ Sélectionner l'aire de chaque pic avec l'outil Wand tool : une fenêtre « Result » apparaît avec les différentes aires mesurées. Si l'aire choisie est incorrecte, sélectionner le résultat dans « Result » et l'effacer (Edit>Clear).
 - ✚ Afficher les résultats en allant dans le menu Analyze Gels > Label Peaks : Les résultats en pourcentage apparaissent sur le graphe et le tableau de résultats
 - ✚ Enregistrer les résultats du tableau « Result » dans un tableur (Excel ou OpenOffice) pour pouvoir annoter les lignes et colonnes.
 - ✚ Répéter l'opération pour la piste suivante.



ATELIER IMAGEJ



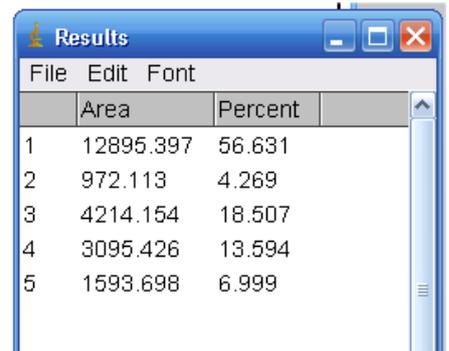
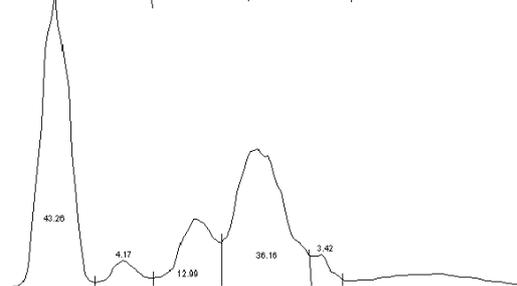
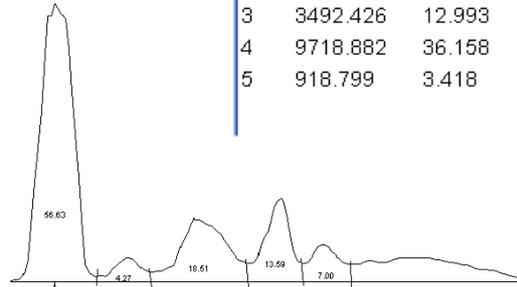
	Area	Percent
1	11628.397	43.263
2	1120.113	4.167
3	3492.426	12.993
4	9718.882	36.158
5	918.799	3.418



Pistes 1



Pistes 6



	Area	Percent
1	12895.397	56.631
2	972.113	4.269
3	4214.154	18.507
4	3095.426	13.594
5	1593.698	6.999



ATELIER IMAGEJ

2. NUMERATION DE COLONIES BACTERIENNES SUR UNE GELOSE

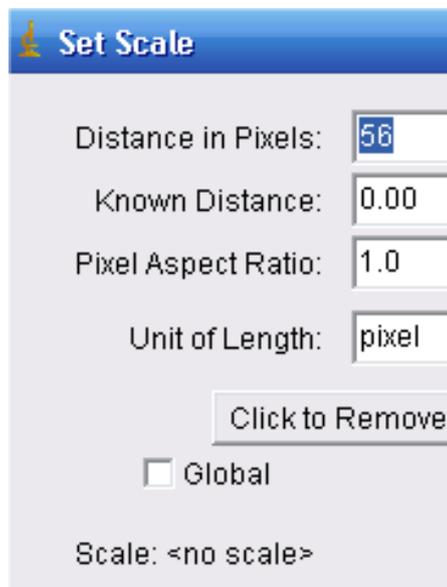
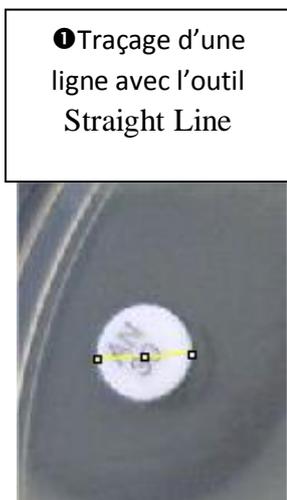
- Lancer ImageJ.
- Ouvrir le fichier « numeration.jpg » (colonies bactériennes réparties sur 4 géloses obtenue à partir de 4 dilutions au 1/10^{ème} successives).: File>Open
- Redimensionner l'image si celle-ci est de taille ou de poids trop important ce qui le cas ici (Informations de l'image avant redimensionnement = 578x568 pixels ; RGB ; 1,3 MB) à l'aide de la fonction Scale du menu Image : paramétrer « Xscale » et « Yscale » à 0,8 dans la fenêtre qui s'ouvre. Après validation une nouvelle image est créée « numeration-1.jpg » (Informations de l'image après redimensionnement (462x454 pixels ; RGB ; 819 K)
- Etape à effectuer pour chacune des 4 boîtes :
 - ✚ Sélectionner une première boîte de Pétri dans le nouveau fichier « numeration-1.jpg » : outil Elliptical selections
 - ✚ Choisir une couleur d'arrière-plan noir en double cliquant sur l'outil pipette (couleur du cadre du logo noir)
 - ✚ Eliminer tout ce qui se trouve à l'extérieur de la zone de comptage à l'aide de la fonction Clear outside du menu Edit : l'arrière plan devient noir
 - ✚ Recadrer l'image à l'aide de la fonction Crop du menu Image
 - ✚ Ajuster le contraste et la lumière : Image > Adjust > Brightness/Contrast
 - ✚ Transformer le format couleur en image de type 8-bits. : Image>Type>8bits.
 - ✚ Effectuer une inversion de couleur avec la fonction Invert du menu Edit
 - ✚ Effectuer un seuillage : définir les intensités minimum et maximum permettant d'isoler les colonies bactériennes du fond de l'image en utilisant la fonction Threshold du menu Image (menu Image > Adjust > Threshold)
 - ✚ Effectuer l'analyse de particules pour dénombrer les colonies à la surface de la gélose en utilisant la fonction Analyze Particle du menu Analyze : un tableau de résultats s'ouvre : vous pouvez choisir la taille des pixels à numérer. En sélectionnant dans Show « mask », cela génère une fenêtre qui montre les pixels qui ont été numérés.
 - ✚ Enregistrer les résultats.



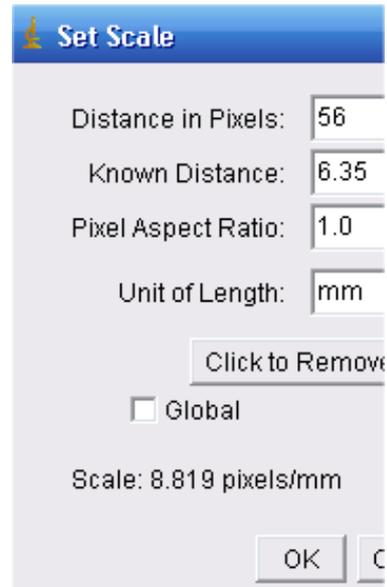
ATELIER IMAGEJ

3. DETERMINATION DU DIAMETRE DES ZONES D'INHIBITION D'UN ANTIBIOGRAMME

- Lancer ImageJ.
- Ouvrir le fichier « antibiogramme.jpg » : File>Open
- Étalonner le logiciel
 - ✚ mesurer à l'aide de l'outil Straight Line, une longueur connue du fichier «antibiogramme : diamètre de la boîte = 90 mm ou diamètre du disque = 6.35 mm.
 - ✚ Ouvrir la fonction Set Scale du menu Analyze : dans la fenêtre qui s'ouvre, la longueur en pixels du trait tracé apparaît (distance en pixels).
Renseigner la valeur de la longueur réelle et indiquer son unité ② ③



②



③

- Effectuer les mesures des diamètres des zones d'inhibition :
Pour chaque diamètre d'inhibition, répéter les opérations suivantes :
 - ✚ Tracer une ligne sur le diamètre à mesurer avec l'outil Straight Line
 - ✚ Effectuer la mesure avec la fonction mesure du menu Analyze : les diamètres mesurés apparaissent dans la dernière colonne du tableau.

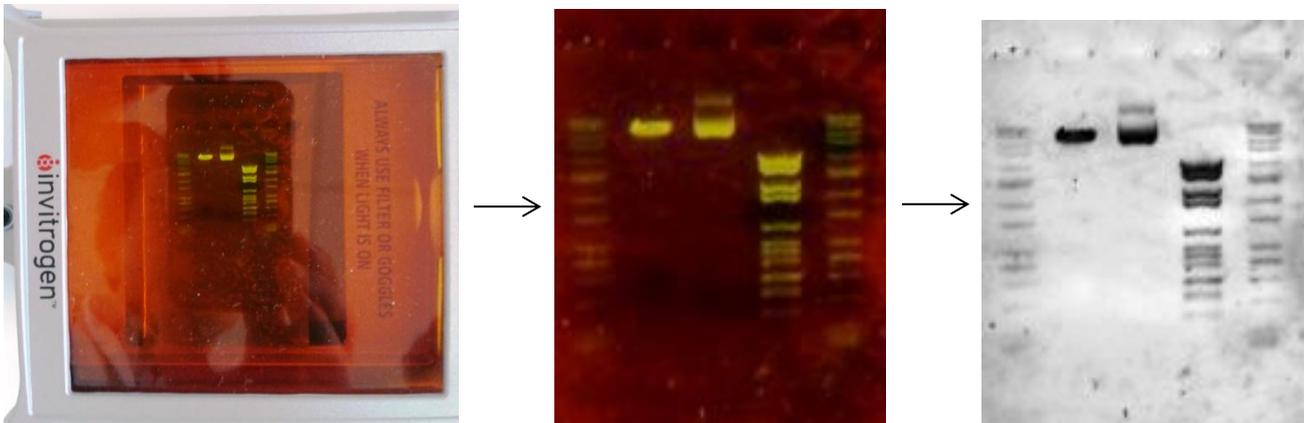
Enregistrer les résultats du tableau une fois toutes les mesures effectuées.



ATELIER IMAGEJ

4. ANALYSE D'UNE ELECTROPHORESE D'ADN SUR GEL D'AGAROSE

- Lancer ImageJ.
- Ouvrir le fichier « elecADN.jpg » : File>Open
- Préparer l'image à l'analyse :
 - ✚ Sélectionner la zone de migration à partir des puits de dépôt : outil Rectangular selections
 - ✚ Choisir une couleur d'arrière-plan noir en double cliquant sur l'outil pipette (couleur du cadre du logo noir)
 - ✚ Eliminer tout ce qui se trouve à l'extérieur de la sélection à l'aide de la fonction Clear outside du menu Edit : l'arrière plan devient noir
 - ✚ Recadrer l'image à l'aide de la fonction Crop du menu Image
 - ✚ Ajuster le contraste et la lumière : Image > Adjust > Brightness/Contrast
 - ✚ Transformer le format couleur en image de type 8-bits. : Image>Type>8bits.
 - ✚ Effectuer une inversion de couleur avec la fonction Invert du menu Edit



- Étalonner le logiciel :
 - ✚ Mesurer à l'aide de l'outil Straight Line, une longueur connue au niveau de l'image : longueur d'un puits = 10 mm.
 - ✚ Ouvrir la fonction Set Scale du menu Analyze : dans la fenêtre qui s'ouvre, la longueur en pixels du trait tracé apparaît (distance en pixels).
 - ✚ Renseigner la valeur de la longueur réelle et indiquer son unité.
- Effectuer les mesures :
 - ✚ Tracer une ligne avec l'outil Straight Line entre le puits et la première bande du marqueur de taille (touche maj pour une ligne bien verticale).
 - ✚ Effectuer la mesure avec la fonction mesure du menu Analyze (raccourci clavier Ctrl + M) : les distances mesurées apparaissent dans la dernière colonne du tableau (colonne « length »).
 - ✚ Recommencer pour chaque bande du marqueur, puis pour les bandes à mesurer (noter l'ordre).
 - ✚ Enregistrer les valeurs dans un tableur.



ATELIER IMAGEJ

5. NUMERATION DE LEVURES (TEST DE VIABILITE AU BLEU DE METHYLENE) PAR UTILISATION DU PLUGIN CELL COUNTER

- Fermer ImageJ si ce dernier est ouvert.
- Télécharger le plugin Cell Counter
- Copier le plugin dans le dossier « Analyse » du répertoire « plugins » du logiciel ImageJ présent dans « Program Files » (C:\Program Files).
- Lancer ImageJ
- Ouvrir le fichier « viabilitelevures.jpg » : File>Open
- Ouvrir le plugin Cell Counter présent dans le menu Plugins.
- Cliquer sur l'onglet « Initialize » pour rendre l'image accessible au comptage.
- Sélectionner comme type 1 les cellules viables non colorées comme premier type cellulaire à compter puis cliquer sur chaque cellule correspondante de l'image : toutes les cellules s'affichent avec le numéro 1 sur l'image.
- Sélectionner comme type 2 les cellules mortes bleues comme second type cellulaire à compter puis cliquer sur chaque cellule de l'image correspondante : toutes les cellules s'affichent avec le numéro 2 sur l'image
- Cliquer sur Result pour obtenir les résultats sous forme de tableau.



ATELIER IMAGEJ

6. UTILISATION DE FICHIERS DICOM (DIGITAL IMAGING AND COMMUNICATION IN MEDICINE)

L'extension .dcm désigne un fichier "DICOM", format standard des fichiers numériques de résultats d'examens d'imagerie médicale (radios, scanner, IRM...). Ce fichier contient non seulement les images numériques issues des examens médicaux mais également des informations cliniques (données du patient, données de l'examen, données médicales...). Cette extension ne peut pas être ouverte avec des logiciels de traitement d'image classique tel que Gimp, Paint, Paint Shop Pro...

- Lancer ImageJ
- Ouvrir le fichier « Heart.dcm » : File>Open
- Observer les informations du fichier ❶ puis visualiser l'ensemble des clichés sous forme de film en cliquant ici ❷
- Afficher les informations complémentaires contenues dans le fichier à l'aide de la fonction Show Info du menu Image : date du cliché, nom du patient, nombre de clichés (Stacks)...

The screenshot shows two windows from the ImageJ application. The primary window, titled 'Heart', displays a grayscale MRI slice of a heart. The status bar at the top of this window reads '3/16; 256x256 pixels; 8-bit; 1MB'. A red circle with the number '1' is placed to the left of the window's title bar. The secondary window, titled 'Info for Heart', is open on the right side of the screen. It contains a list of DICOM metadata fields, with several entries highlighted in red. A red circle with the number '2' is placed to the left of the 'Info for Heart' window's title bar.

Heart
3/16; 256x256 pixels; 8-bit; 1MB

Info for Heart
File Edit Font

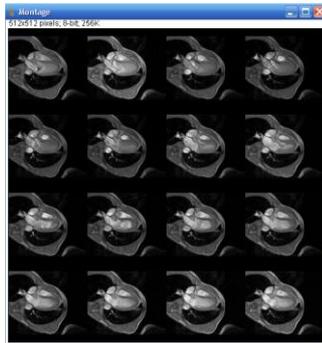
0008,0020 Study Date: 1995.06.26
0008,0023 Image Date: 1995.06.26
0008,0030 Study Time: 11:20:00
0008,0060 Modality: MR
0008,0070 Manufacturer: Philips
0008,0080 Institution Name: Community Hospital
0008,0081 Institution Address: Anytown
0008,0090 Referring Physician's Name: Anonymized
0008,1030 Study Description: MRI
0010,0010 Patient's Name: Anonymized
0018,0050 Slice Thickness: 10.00
0018,0080 Repetition Time: 1333.33
0018,0081 Echo Time: 11.98
0018,0089 Number of Phase Encoding Steps: 16
0018,1063 Frame Time: 69.47
0018,1149 Field of View Dimensions(s): 350
0018,1314 Flip Angle: 50
0020,000D Study Instance UID: 999.999.2.19960619.163000
0020,000E Series Instance UID: 999.999.2.19960619.163000.1



ATELIER IMAGEJ

- Observer le fichier Heart.dcm en une planche contact où vous pouvez effectuer un choix de clichés en utilisant la fonction Make Montage du menu Image > Stacks : une fenêtre Montage s'ouvre avec le nombre de clichés choisis.

Montage avec les 16 clichés

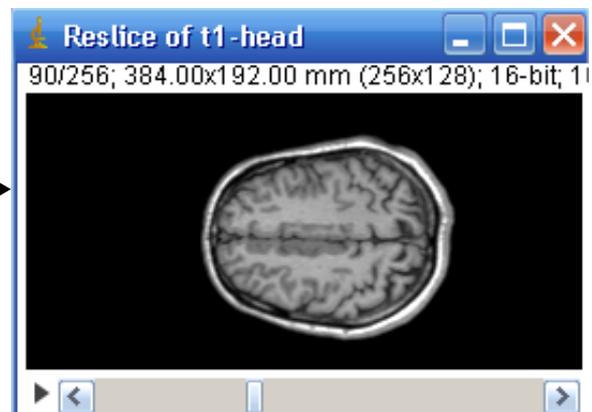


Montage avec 4 clichés



En sauvegardant au format jpeg, les clichés deviennent exploitables par les logiciels de traitement d'image.

- Possibilité d'ouvrir tous les clichés comme une image avec la fonction Stack to Images du menu Image > Stacks
En sauvegardant au format jpeg, les clichés deviennent exploitables par les logiciels de traitement d'image.
- Possibilité de découper le fichier selon un nouveau plan à l'aide de la fonction Reslice [/]... du menu Image > Stacks ou avec la fonction Orthogonal Views mais l'épaisseur mesurée est faible sur le fichier « Heart.dcm » comme on peut le constater en effectuant la fonction 3D Project...(Axe de rotation en Y)
- Effectuer la fonction Reslice [/]..., Orthogonal Views, 3D Project... après avoir ouvert le fichier « Head.tif » :
 - ✚ Reslice [/]... permet de changer de coupe (ici on passe d'une coupe sagittale à une coupe transversale)
 - ✚ Orthogonal Views permet de visualiser selon 2 axes d'observation (YZ et XZ)
 - ✚ 3D Project... permet d'obtenir une vue 3D (nécessité de travailler en image 8 bit)



ATELIER IMAGEJ

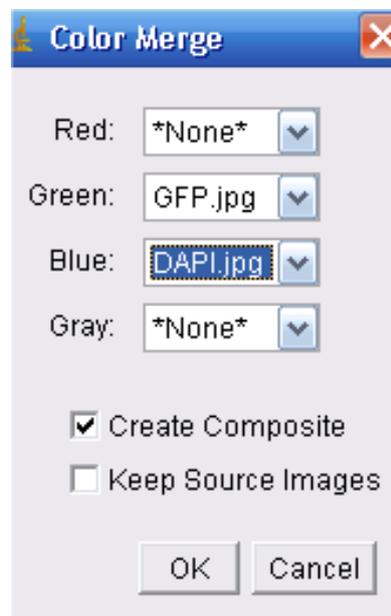
7. CREER UNE IMAGE COMPOSITE A PARTIR DE 2 IMAGES OBTENUES SUR UN MEME CHAMP MICROSCOPIQUE D'OBSERVATION APRES 2 TRAITEMENTS AVEC DES MARQUEURS FLUORESCENTS SUB-CELLULAIRES DIFFERENTS

Photographies utilisées :

- ✚ l'image DAPI.jpg est obtenue par le marquage des noyaux au DAPI (Di-Amidino-Phenyl-Indol) qui se fixe spécifiquement sur l'ADN et émet une fluorescence bleue (max à 456 nm) lorsqu'il est éclairé en lumière violette (max à 372 nm).
- ✚ l'image GFP.jpg est obtenue par l'observation de la fluorescence de la GFP (Green Fluorescent Protein), protéine fluorescente qui absorbe la lumière bleue (max à 420 nm) et émet une lumière dans le vert (max à 510 nm).

Selon le jeu de filtres utilisé au moment de l'observation, le champ microscopique peut fluorescer en bleu (DAPI) ou en vert (GFP). La caméra utilisée ne restitue que des images 8 bit.

- Lancer ImageJ
- Ouvrir successivement les fichiers « DAPI.jpg » et « GFP.jpg » : File>Open
- Fusionner les 2 images avec la fonction RGB Merge du menu Image > Color :
 - ✚ dans la fenêtre de paramétrage Color Merge qui s'ouvre, attribuer le fichier GFP.jpg pour Green et le fichier DAPI.jpg pour Blue
 - ✚ cliquer sur OK pour générer une image en fausses couleurs dans une fenêtre Composite



- Enregistrer le fichier généré.



ATELIER IMAGEJ

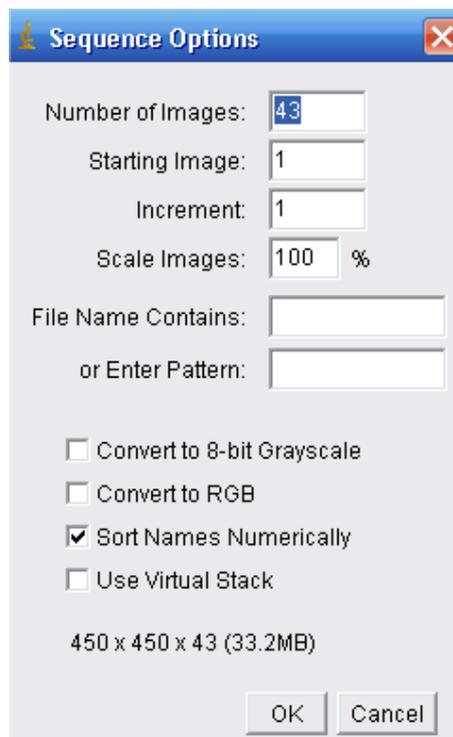
8. SUIVI D'EXPERIENCE : MISE EN EVIDENCE ET QUANTIFICATION DE LA FLUIDITE MEMBRANAIRE

Des membranes sont incubées avec des phospholipides couplés à un fluorochrome. Les phospholipides se répartissent uniformément dans la membrane et la fluorescence est homogène sur toute la surface observée.

Une petite zone de la membrane est ensuite irradiée avec un flash de faisceau laser qui détruit localement et irréversiblement le fluorochrome.

On photographie en fonction du temps, l'intensité de la fluorescence qui réapparaît dans la zone irradiée au laser : les photographies du même champ d'observation, prises successivement à intervalles de temps réguliers, sont présentes dans le répertoire « membrane »

- Lancer ImageJ
- Ouvrir la pile d'images présentes dans le répertoire « membrane » en utilisant la fonction Image Sequence du menu File > Import : sélectionner la première image puis cliquer sur Ouvrir. Une fenêtre de paramétrage « Sequence Options » s'ouvre. Cliquer sur OK : un fichier « membrane » de 43 images est créé

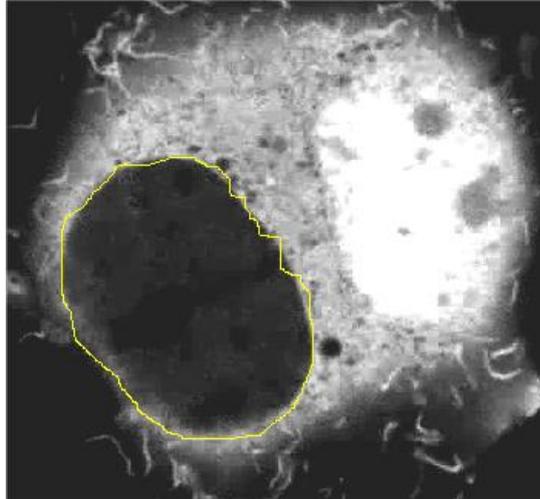


- Transformer le format en image de type 8-bits. : Image>Type>8bits.
- Ajuster le contraste et la lumière : Image > Adjust > Brightness/Contrast (le faire après l'image 1).



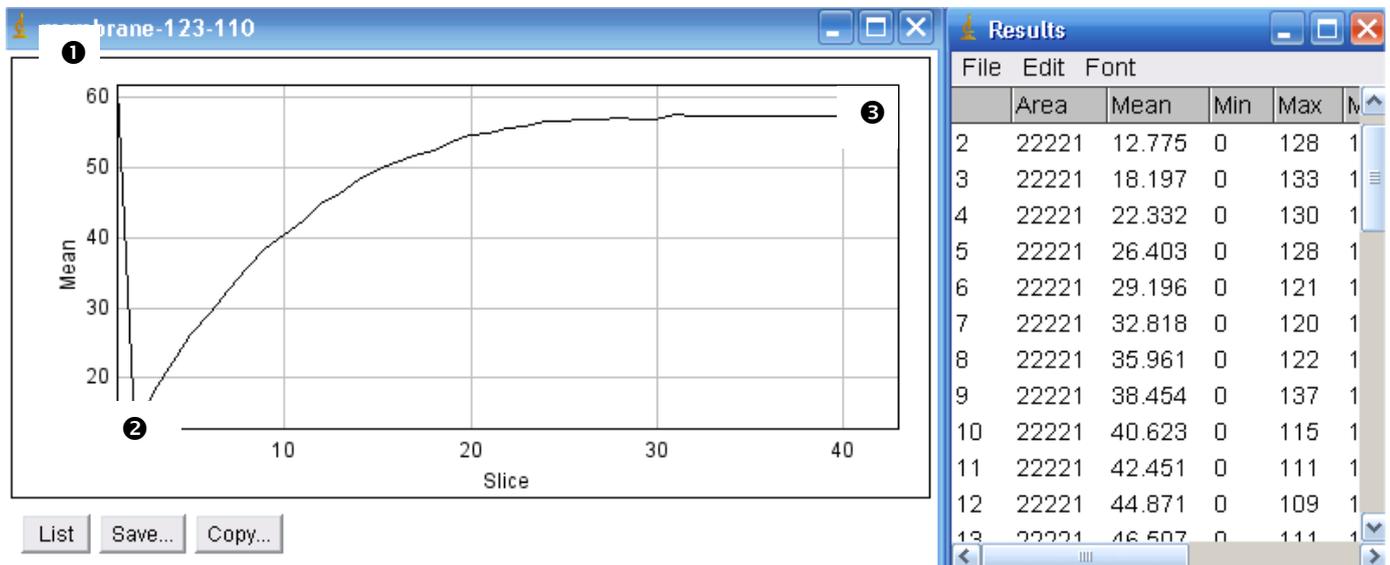
ATELIER IMAGEJ

- Sélectionner la zone à analyser avec l'Outil Freehand selections comme ci-dessous :



Cette sélection est identique pour toutes les images de la pile.

- Pour suivre la réapparition de la fluorescence, utiliser la fonction Plot Z-axis Profile du menu Image > Stacks : une courbe et une série de mesure sont obtenues où on mesure en fonction du temps, l'intensité de la fluorescence qui réapparaît dans la zone d'observation irradiée au laser :
 - ❶ fluorescence initiale (avant irradiation)
 - ❷ fluorescence à $t = 0$ après l'irradiation
 - ❸ fluorescence après réapparition



- Enregistrer vos résultats



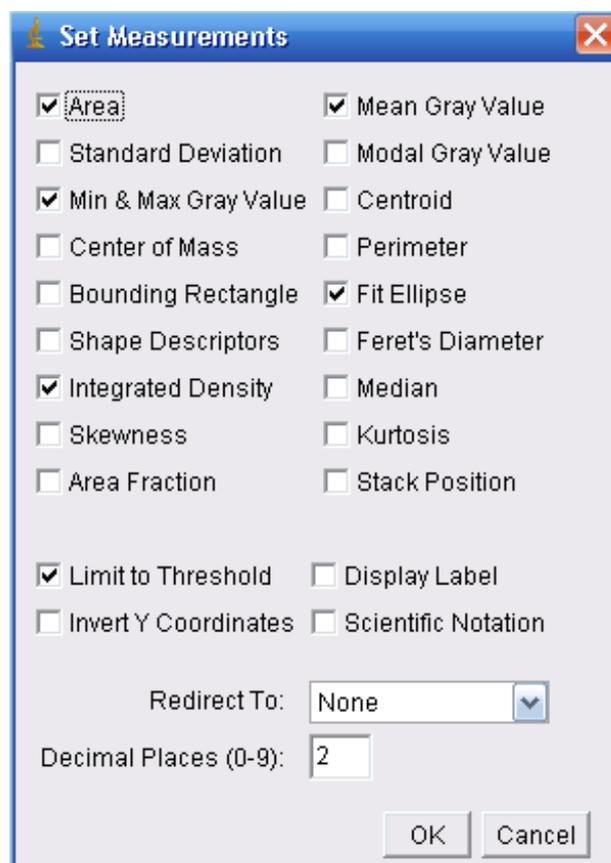
ATELIER IMAGEJ

9. CREATION ET UTILISATION D'UN FICHER MACRO

Une macro est nécessaire à partir du moment où des actions identiques vont être répétées sur des images différentes (lecture de microplaque d'élèves différents).

8.1Création d'une Macro

- Lancer imageJ
- Ouvrir le fichier microplaque.jpg
- Utiliser la fonction Record du menu Plugins > Macros : une fenêtre Recorder apparait dans laquelle vont s'enregistrer automatiquement les opérations suivantes :
 - + transformer l'image en 8-bits : Image > Type > 8bit
 - + optimisation du contraste : Image > Adjust > Brightness/Contrast ; sélectionner Auto
 - + effectuer une inversion de couleur : Edit > Invert
 - + effectuer le paramétrage de la fonction Set Measurements du menu Analyse



- + sélectionner l'outil de sélection ovale puis sélectionner successivement les 96 cupules dans l'ordre suivant (A1 → H1 puis B2 → H2...) en déplaçant à chaque fois la sélection
- + effectuer l'analyse en utilisant la fonction Measure du menu Analyse pour chaque cupule : copier dans Recorder derrière chaque cupule sélectionnée l'action « run("Measure"); »

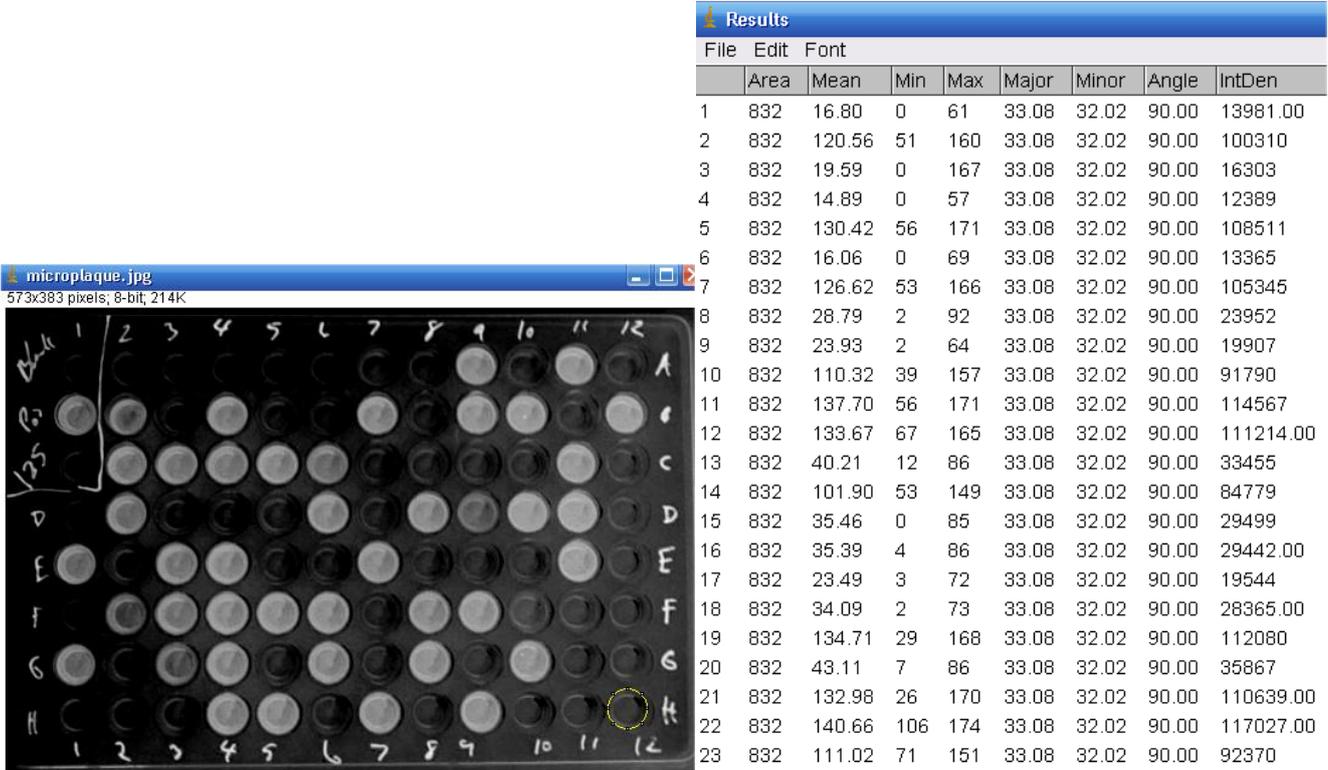
- Enregistrer la macro dans un fichier .txt dans le répertoire macros d'ImageJ présent dans Program Files.



ATELIER IMAGEJ

8.2 Utilisation de la Macro

- Installer la macro en utilisant la fonction Install du menu Plugins > Macros
- Ouvrir le fichier microplaque.jpg et effectuer la macro présente en bas du menu déroulant du menu Plugins > Macros : l'analyse et les résultats sont générés.
- Enregistrer les résultats.



Ressources :

- ✚ Travaux de Gil Voge : http://www.ac-grenoble.fr/disciplines/sti-biotechnologies/file/ImageJ/Stage_ImageJ.htm
- ✚ Travaux de Gabriel Lapointe : <http://gabriellapointe.ca/imagej/>

