

Guide d'utilisation du logiciel ICY & Micro-Manager



Laboratoire Ressources Halieutiques de Boulogne (PDG-RBE-HMMN-LRHBL)

Romain Elleboode • Geoffrey Bled Defruit • Anais Guerinel • Solène Telliez

Aout 2022

| Version | Date | Commentaires |
|----------------|----------------|---------------------|
| 1.0 | 6 Juillet 2022 | Création |

Sommaire

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Pré-requis..... | 4 |
| 1.1 | Exigences de la machine..... | 4 |
| 1.2 | Installation d'Icy..... | 4 |
| 2 | Acquisition d'images normalisées | 7 |
| 2.1 | Acquisition standard..... | 9 |
| 2.2 | Acquisition automatique | 10 |
| 3 | Traitement d'une image provenant d'un scanner « Mosaic processing » | 13 |
| 3.1 | « Load image »..... | 15 |
| 3.2 | « Detection » | 15 |
| 3.3 | « Grid Handling »..... | 20 |
| 3.4 | « Save results » | 22 |
| 4 | Analyses de formes « Shape analysis » | 23 |
| 4.1 | « Load image »..... | 24 |
| 4.2 | Import et groupement d'images de différentes tailles | 24 |
| 4.3 | « Detection » | 25 |
| 4.3.1 | Correction manuelle des résultats de la segmentation. | 27 |
| 4.4 | « Registration »..... | 29 |
| 4.5 | « Binarization »..... | 33 |
| 4.6 | « Statistics report »..... | 34 |
| 5 | Estimation de l'âge « Aging analysis » | 39 |
| 5.1 | « Load a sequence » | 40 |
| 5.2 | « Detection » | 40 |
| 5.3 | « Poly-lines in frame » | 41 |
| 5.4 | « Poly-lines in frame & Poly-lines sorting »..... | 42 |
| 5.5 | « Border snap » | 43 |
| 5.6 | « Intensity profile & Increment points estimation » | 44 |
| 5.6.1 | Focus sur le paramètre « 1st/2 nd ratio »..... | 45 |
| 5.7 | « Report »:..... | 47 |

1 Pré-requis

1.1 Exigences de la machine

Pour faire fonctionner Icy correctement, un ordinateur présentant les caractéristiques minimales suivantes est nécessaire.

Système d'exploitation : Icy a été conçu pour fonctionner avec Mac OS, Linux (Ubuntu, Fedora, LinuxMint, etc.), et Windows (7 ou plus).

Mémoire : Au moins 8 Go de RAM (32 Go recommandés pour le traitement de grandes images).

Espace disque : Icy ne prend que 250 Mo d'espace disque. Cependant, vous devez prendre en compte l'espace utilisé par les images que vous allez utiliser avec Icy (recommandé 1 TB).

1.2 Installation d'Icy

Le plugin Otolith Analysis fonctionne sur Icy version 2.1+. Vous pouvez télécharger Icy à l'adresse <http://icy.bioimageanalysis.org/download/> (cliquez sur "Get previous releases"). Icy fonctionne sur une JVM (Java Virtual Machine) et peut nécessiter la bibliothèque VTK. Pour installer java et trouver des informations sur la façon de configurer VTK sur votre machine, visitez la page de téléchargement d'Icy.

Installer Micro-manager avec l'installateur dans Program Files.

Lancer Micro-manager une première fois, indiquer "Later" dans la boîte de dialogue qui demande l'email de l'utilisateur. Quitter et relancer Micro-Manager une deuxième fois pour indiquer "Never" dans la même boîte de dialogue. Cette boîte ne devrait plus réapparaître et Micro-manager peut maintenant être appelé depuis Icy.

Dézipper Icy et l'installer dans C:\apps\Icy

Lancer Icy

Installer les plugins Apache Commons Math3 et Scale bar (recherche des plugins dans la barre de recherche et clic droit pour les télécharger depuis le site web d'Icy Figure 1).

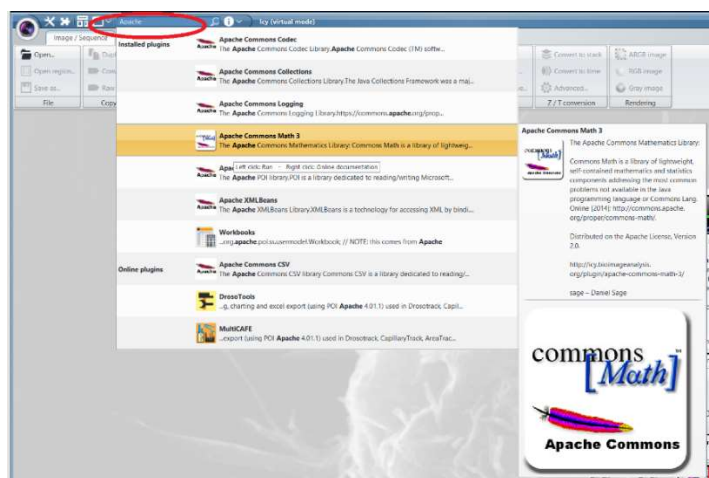


Figure 1: Recherche et installation de plugin

Configurer la mémoire dans le menu préférences (en haut à gauche avec les outils Figure 2).
Pour 32Go de RAM, on peut allouer environ 25Go de RAM pour Icy.

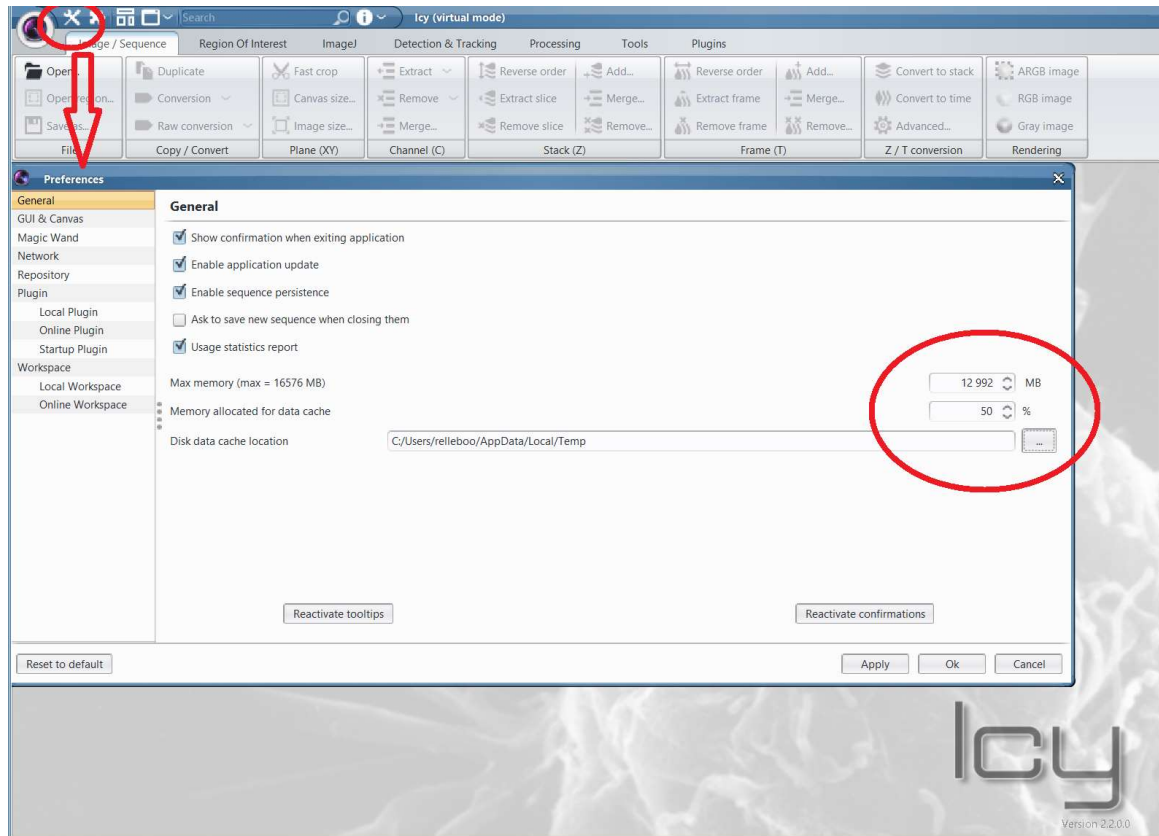


Figure 2: Augmentation mémoire RAM pour Icy

Redémarrer Icy pour prendre en compte le changement d'allocation mémoire.

Configurer le répertoire distant privé pour avoir les mises à jour des plugins OtholithAnalysis et IfremerAcquisition: dans le menu préférences, cliquer sur Repository -> Add et ajouter le répertoire suivant (Figure 3)

Name : IFREMER

Location : <http://icy.bioimageanalysis.org/private/ifremer/repository.xml>

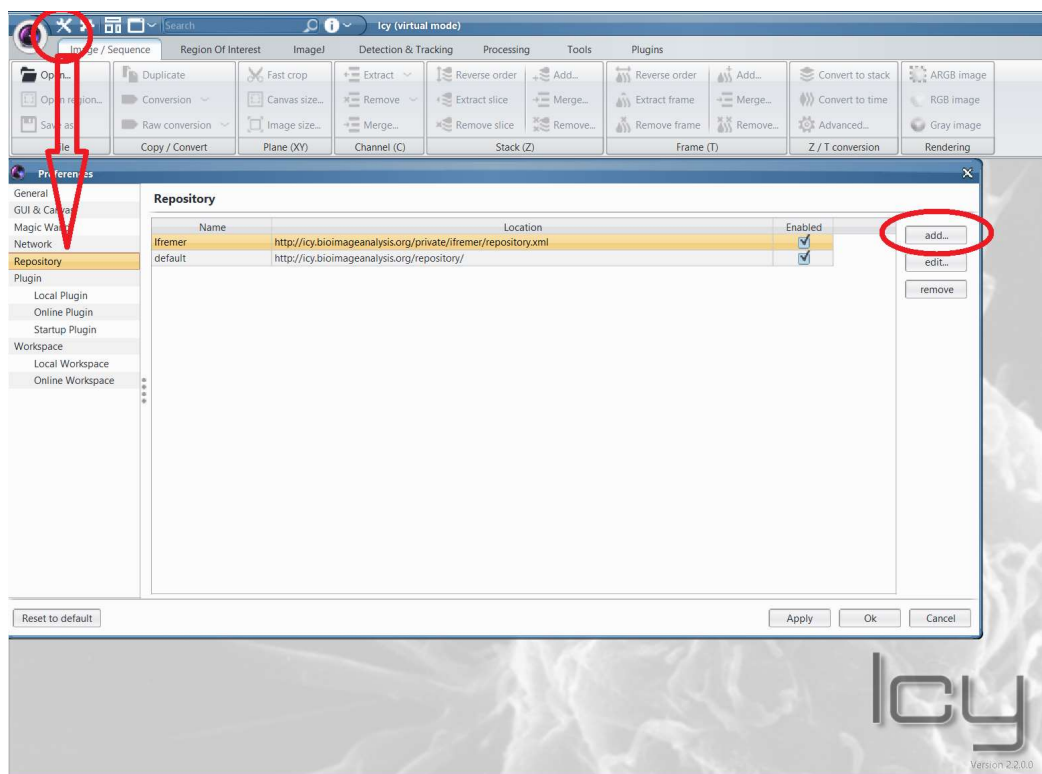


Figure 3: Paramétrer les mises à jour automatiques d'Icy

Pour vérifier l'ajout du répertoire, décocher le répertoire default, cocher le répertoire IFREMER, puis aller dans l'onglet Plugin -> Online plugin. Rafraîchir la liste de plugins si besoin. Il doit y avoir les deux plugins OtholithAnalysis et IfremerAcquisition.

Chercher le plugin Micro-Manager dans la barre de recherche d'Icy et le lancer. Indiquer le chemin de Micro-Manager (chemin qui est du genre C:\Program Files\Micro-Manager-1.4). Ce chemin ne sera pris en compte qu'au redémarrage d'Icy après une extinction correcte du logiciel. Si Icy crashe, le chemin ne sera pas pris en compte. Le plugin micro-manager invite maintenant à commencer les configurations (si on quitte le plugin à ce moment, un message d'erreur apparaît, ce qui est normal).

Le pôle de sclérochronologie utilise principalement des caméras de type CMU 1394 Digital Camera Driver. Pour cette caméra vous pouvez aller sur <http://www.cs.cmu.edu/~iwan/1394/downloads/index.html> -> installation de la version 6.4.6 signée.

Sinon rechercher les informations sur : https://micro-manager.org/Device_Support.

2 Acquisition d'images normalisées

Pour réaliser des images normalisées des pièces calcifiées, en routine ou pour des projets, le plugin IfremerAcquisition (Figure 4) est nécessaire (Cf Pré-requis).

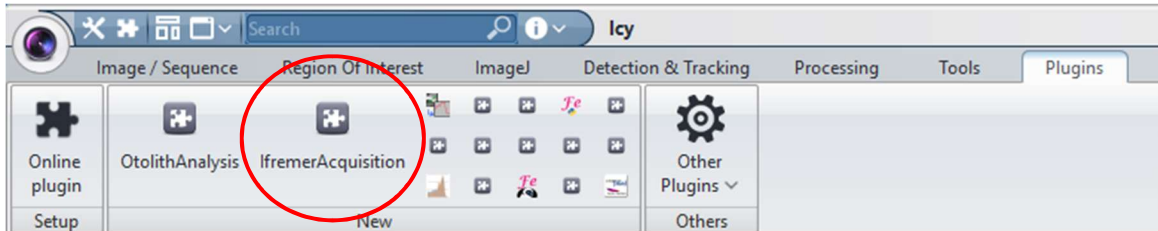


Figure 4: Emplacement du plugin "IfremerAcquisition"

Après avoir cliqué sur le plugin IfremerAcquisition, deux fenêtres vont s'ouvrir permettant de régler les différents paramètres des futures images (Figure 5) :

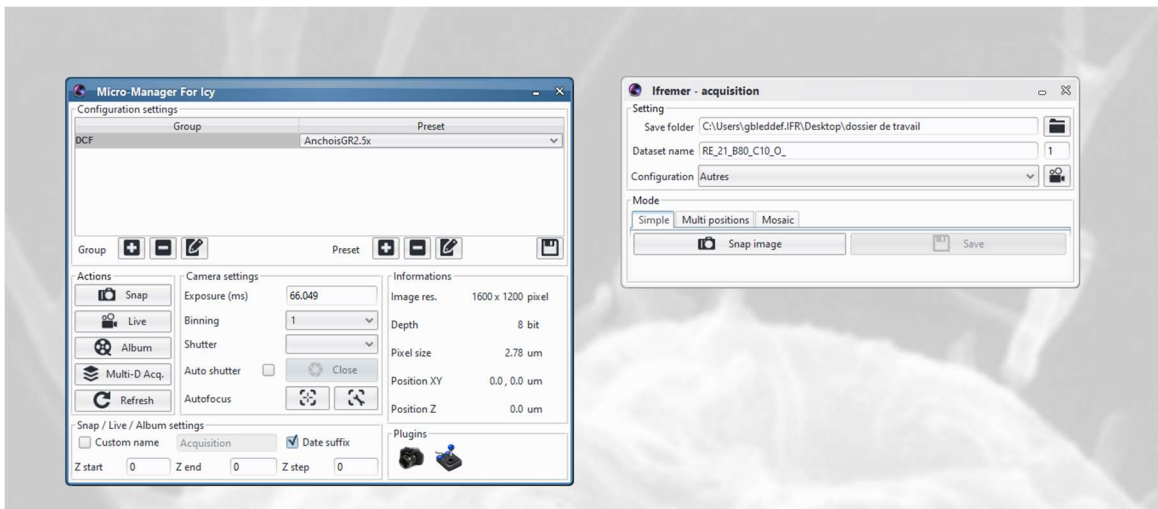
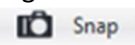
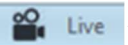



Figure 5: Ecrans à l'ouverture du plugin "IfremerAcquisition"

Dans la fenêtre *Micro Manager For Icy* (Figure 6), plusieurs options vont être disponibles :

Le *Preset* (vert) permet de charger des paramètres d'image. En cliquant dans l'encadré en dessous de *Preset* (flèche verte), on peut choisir l'espèce sur laquelle on va travailler et ainsi connaître le grossissement utilisé.

- L'onglet *Actions* (rouge) permet de réaliser différentes actions, comme prendre une photo (), de visualiser l'échantillon en cours et de régler la position, l'intensité lumineuse et la mise au point avant de prendre la photo () ou encore de lancer des acquisition multi-points ().
- L'onglet *Camera settings* (bleu) permet d'obtenir diverses informations sur les paramètres de la caméra. Ils changent en fonction du preset sélectionné.

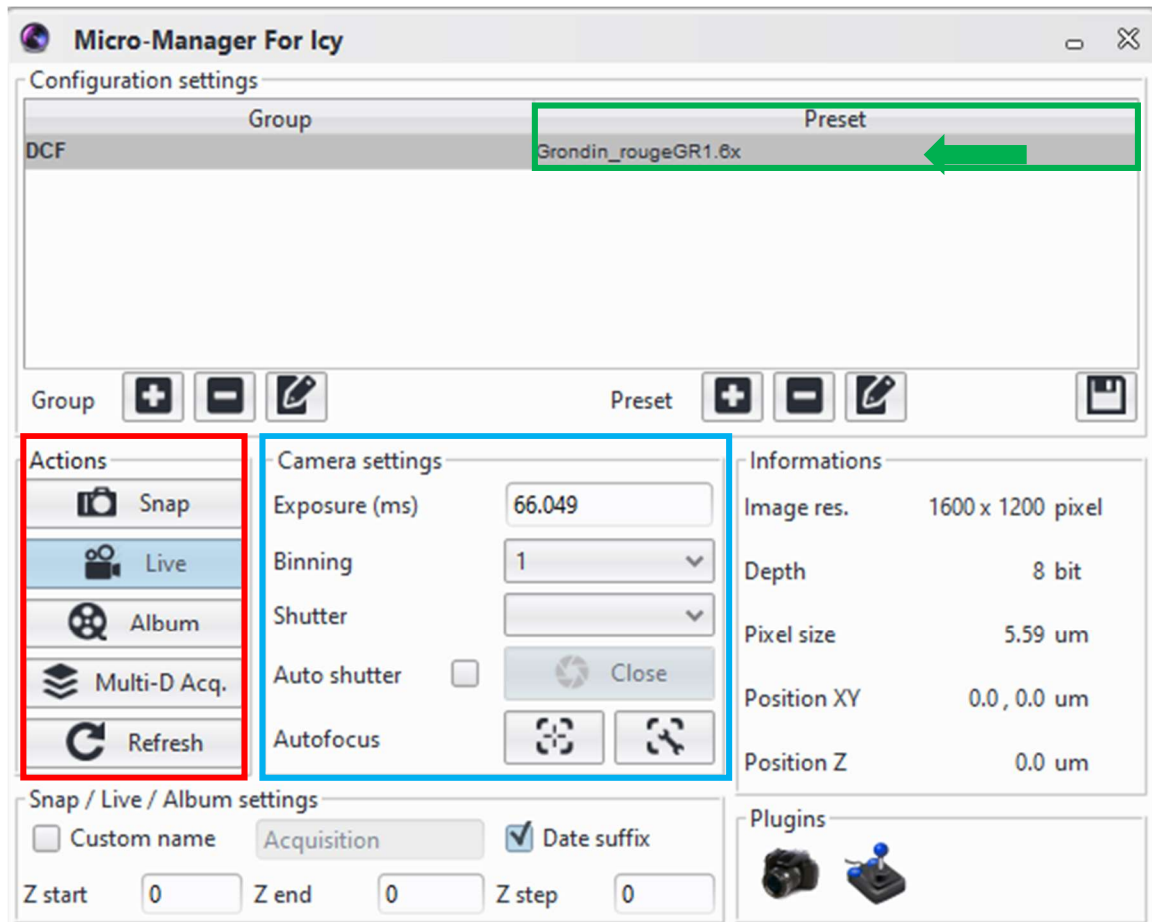


Figure 6 : Fenêtre Micro-Manager For Icy

La fenêtre *Ifremer – acquisition* (Figure 7) permet dans un premier temps de régler les paramètres d'enregistrement. Pour définir le dossier de sauvegarde des images, il suffit de cliquer sur le petit dossier ou de copier/coller le lien du dossier (rouge). Sur la même ligne, la petite règle (flèche bleue) permet de sélectionner, ou non, si l'on veut enregistrer la calibration de nos photos. Celle-ci consiste à enregistrer automatiquement un double des photos avec l'échelle intégrée dessus.

Remarque : il est préférable de travailler en local pour diminuer les temps de latence.

Le nom des images s'écrit dans la ligne *Dataset name*, les numéros vont s'incrémenter immédiatement après le dernier caractère. On peut choisir de commencer l'incrémentation à un numéro différent de 1, pour cela, il faut le changer dans la case à côté de la ligne *Dataset name* (jaune).

Le choix de la configuration (vert) permet d'avoir toujours le même format d'images pour une espèce donnée. Il est important de vérifier que la configuration sélectionnée dans la fenêtre *Micro Manager For Icy* et dans *Ifremer – acquisition* est bien la même. Le live (flèche verte) peut ensuite être lancé pour régler les différents paramètres de prise de vue (mise au point, emplacement, intensité lumineuse).

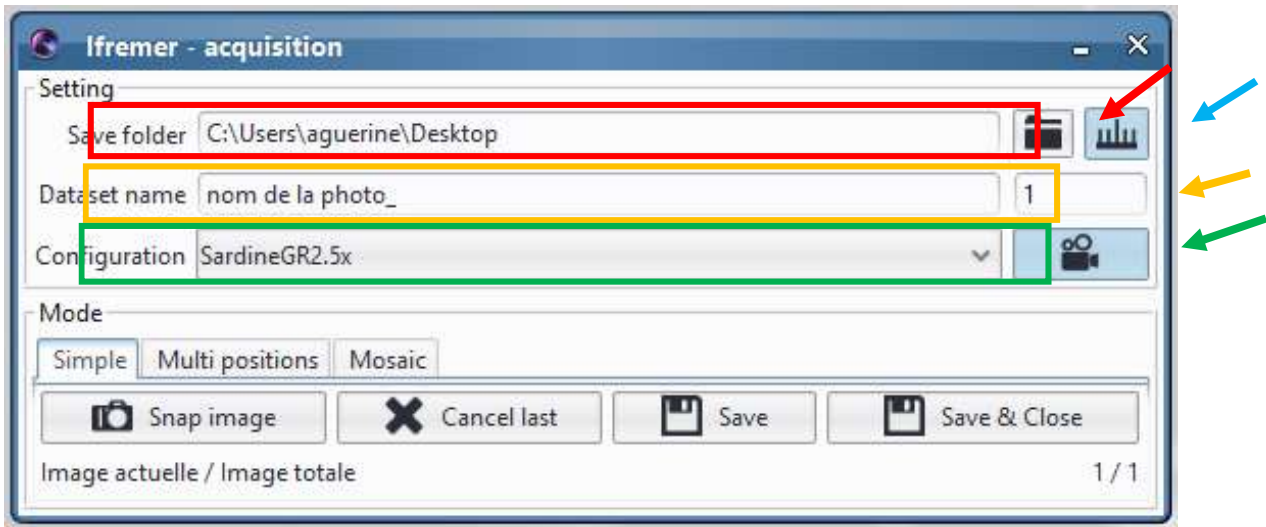


Figure 7: Fenêtre Ifremer - acquisition

Les différents mode d'acquisition se feront dans l'encadré *Mode*.

2.1 Acquisition standard

Les acquisitions standards permettent de prendre des photos individuellement d'un lot d'échantillon (lames ou otolithes entiers)(Figure 8).

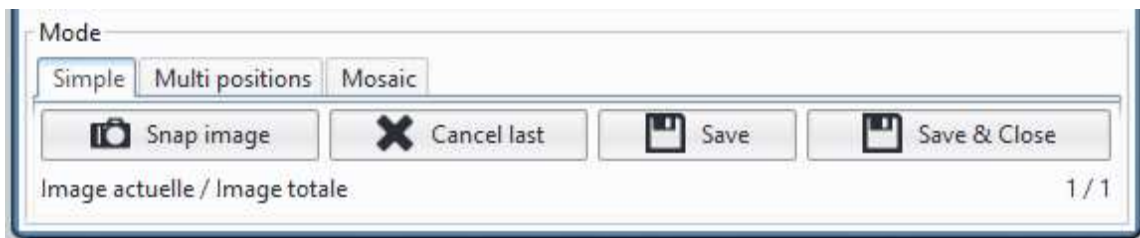

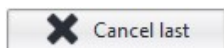


Figure 8: Acquisition standard

Pour réaliser une acquisition standard il faut, après avoir réglé les différents paramètres vus précédemment, cliquer sur l'onglet *Simple* puis sur  **Snap image**. Cette dernière action est à répéter tant que le *Dataset Name* n'a pas besoin d'être changé. Si l'échantillon est sous forme de lames, il faut cliquer sur *Snap Image* tant que tous les otolithes de la lame ne sont pas finis. A chaque changement de lame, il faut cliquer sur *Save & Close*, changer le *Dataset Name* et cliquer à nouveau sur *Snap Image*.

Save correspond seulement à un enregistrement au cours d'une longue session d'acquisition d'images si beaucoup de photos sont prises, afin d'être sûr de ne pas les perdre. *Save & Close* est plus adapté pour changer de *Dataset name* ou bien finir un échantillon.

Remarque : Les images n'apparaîtront dans le dossier de sauvegarde que lorsque celles-ci auront été sauvegardées.



permet d'effacer la dernière photo qui a été prise et celui-ci peut être répéter si plusieurs photos sont à supprimer.

2.2 Acquisition automatique

De la même manière que pour l'acquisition simple d'images, l'acquisition automatique d'images nécessite l'utilisation du plugin IfremerAcquisition (Figure 9).

Après avoir sélectionné celui-ci, deux fenêtres vont s'ouvrir. La fenêtre *Micro Manager For Icy* va permettre d'accéder à *Multi-D Acq.*

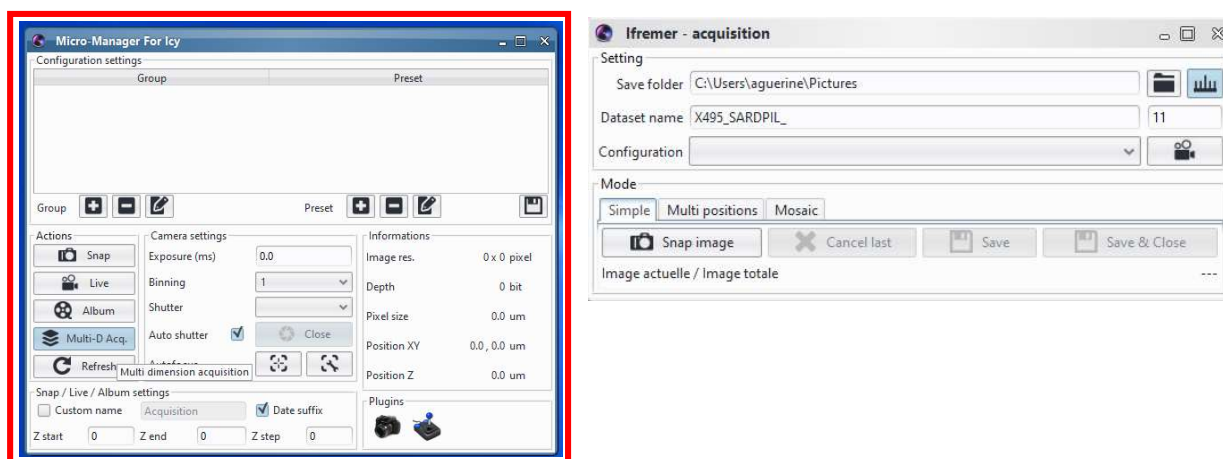


Figure 9: Fenêtre acquisition multiple

En cliquant sur *Multi-D Acq.*, une autre fenêtre s'ouvre : cette fenêtre permet de choisir de quelle manière seront paramétrés les acquisitions multiples (Figure 10).

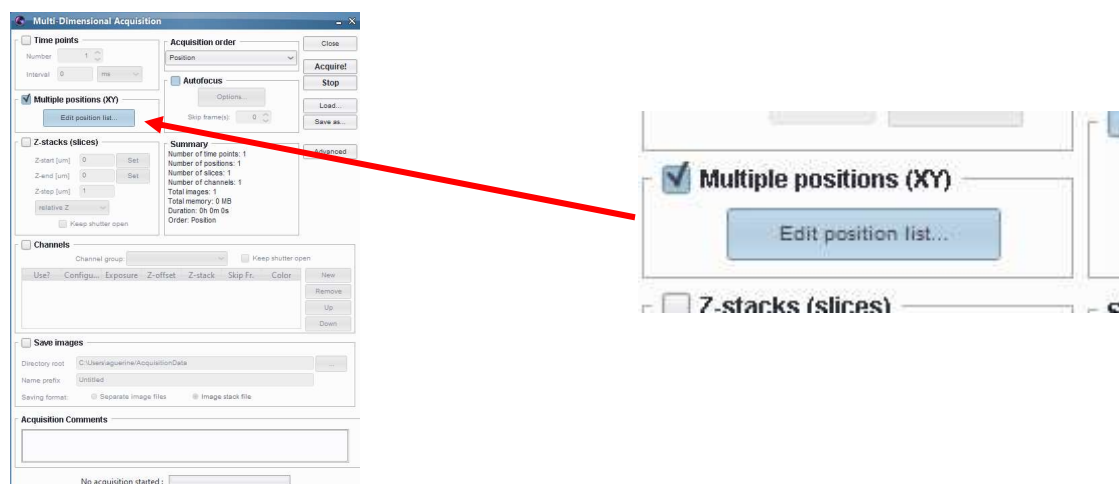
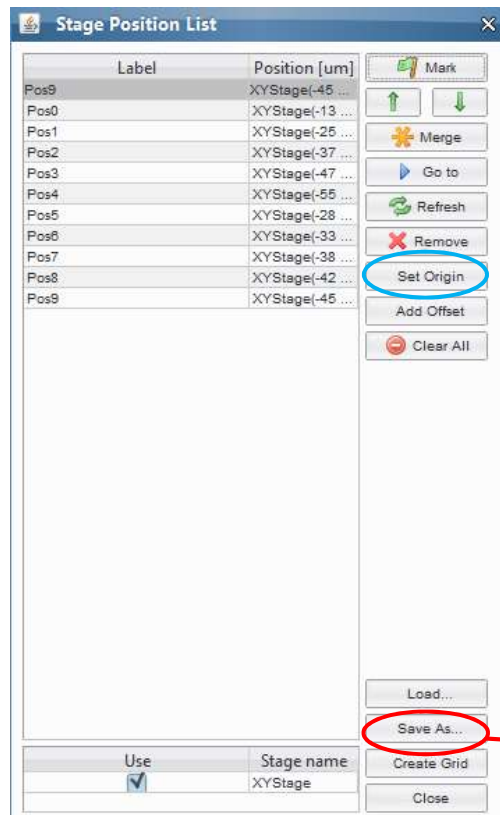


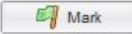
Figure 10: Fenêtre Multi - Dimensional Acquisition

Pour paramétrer une acquisition multiple d'images avec Icy, l'encadré qui nous intéresse est celui qui est montré ci-dessus. La case **Multiple positions (XY)** est cochée si ce n'est déjà fait, pour ensuite pouvoir cliquer sur « Edit position list... ».

Ce type de programmation requiert l'utilisation d'une platine motorisée qui peut se déplacer sur deux axes : axe X et axe Y.

La fenêtre suivante s'ouvre (Figure 11).



La fenêtre *Stage Position List* est la liste de position en X et Y pour lesquelles on veut une prise de photo. Ces positions se choisissent manuellement et se valident grâce au bouton .

Remarque : Il est possible de calibrer la platine motorisée à l'aide du bouton Set Origin (en bleu).

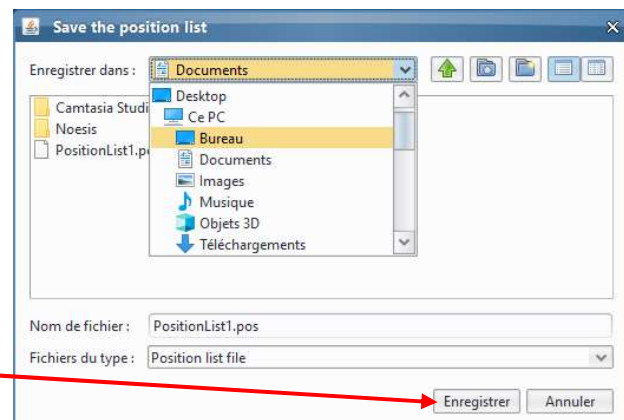


Figure 11: Fenêtre *Stage Position list*

Une fois que toutes les positions pour lesquelles une photo doit être prise sont enregistrées, il suffit d'enregistrer la liste de positions grâce à *Save As...* . Il est ensuite possible d'enregistrer la liste de positions dans le dossier souhaité sur l'ordinateur.

Maintenant que la programmation est faite, il faut revenir sur la fenêtre *Ifremer – Acquisition* pour démarrer les acquisitions multiples. Les différents onglets dans *Setting* sont décrits précédemment, dans la partie *ci-dessus*. Dans *Mode* et *Multi positions* (Figure 12), il faut charger la liste de positions que l'on vient de créer en cliquant sur le petit dossier. Le bouton *Start* permet

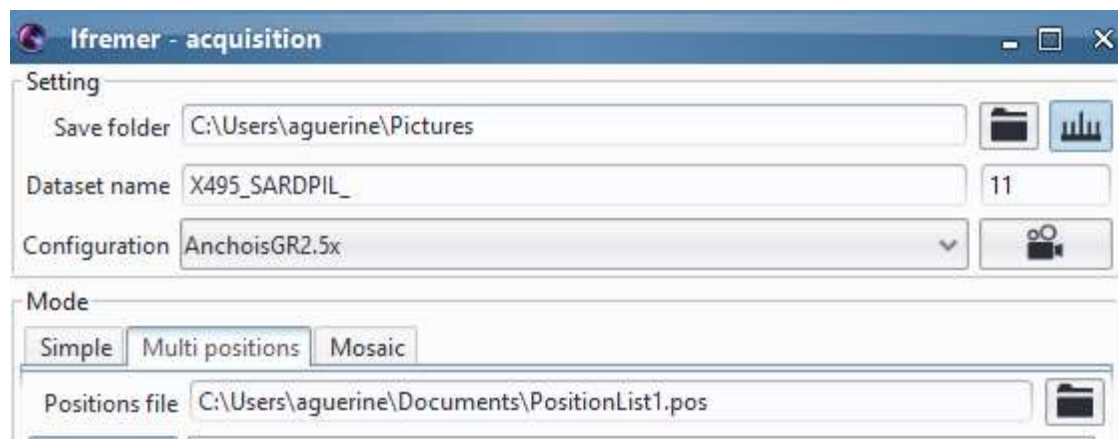


Figure 12: Ecran démarrage acquisition multiple après programmation

ensuite de démarrer l'acquisition multiple et automatique d'images selon les points que l'on a enregistrés.

3 Traitement d'une image provenant d'un scanner « Mosaic processing »

L'ensemble des points abordés dans les chapitres suivants nécessite l'installation du plugin OtolithAnalysis (cf. Pré-requis). Nos exemples sont basés sur des images provenant de scanner de type EPSON 750.

Les pièces calcifiées en premier lieu les otolithes peuvent faire l'objet d'acquisitions d'images par scanner. L'onglet Mosaic processing du plugin OtolithAnalysis, permet le traitement d'images de scanner. Mosaic processing détecte et isole chaque otolithe d'une image global d'entrée. La qualité de l'image est cruciale pour le bon fonctionnement du module. En entrée, l'utilisateur doit fournir une image contenant une grille d'otolithes avec un fond sombre et uniforme. Les otolithes doivent être suffisamment alignés pour que la grille sous-jacente puisse être reconnue par le logiciel. Un exemple d'image acceptable pourrait être le suivant (Figure 13).

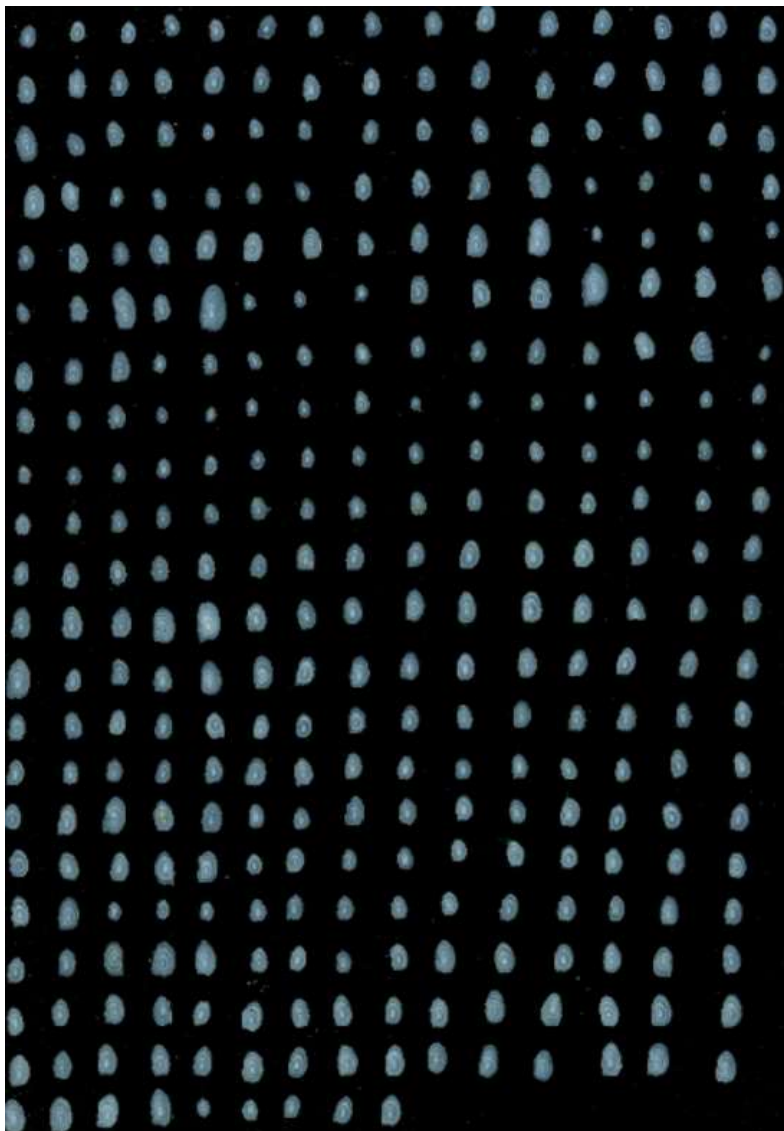


Figure 13: Exemple d'image type provenant d'un scanner.

Le premier module du plugin OtolithAnalysis est Mosaic processing (Figure 14).

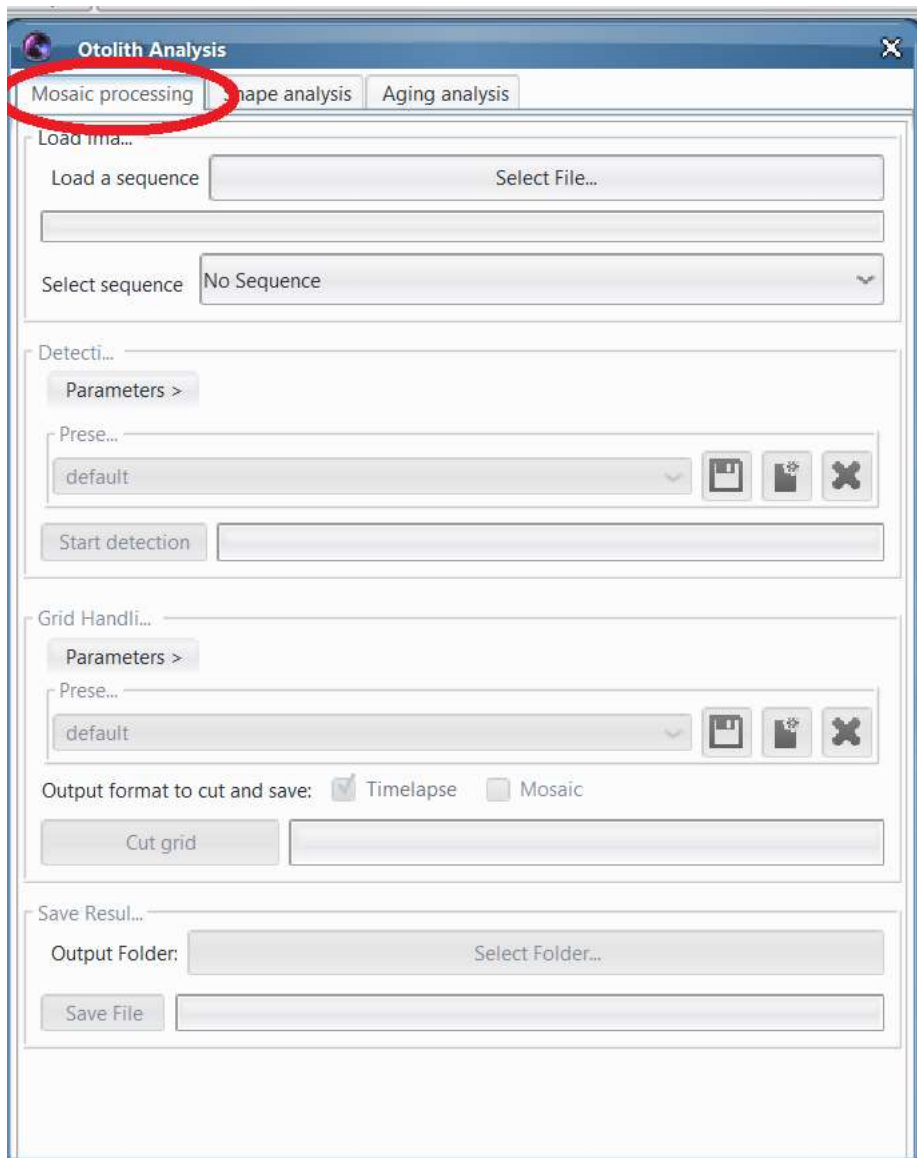


Figure 14: Fenêtre du plugin OtolithAnalysis

L'interface utilisateur de cette onglet contient quatre étapes : Load image, Detection, Grid Handling and Save results (Charger l'image, Détection, Manipulation de la grille et Enregistrer les résultats). Les trois derniers panneaux sont grisés à l'ouverture, et deviennent disponibles pour l'utilisateur une fois qu'une image est chargée et sélectionnée dans Icy.

3.1 « Load image »

Faites glisser le fichier cible et déposer-le sur le bouton Select File comme indiqué ci-dessous (Figure 15) ou réaliser une recherche en cliquant sur Select File.

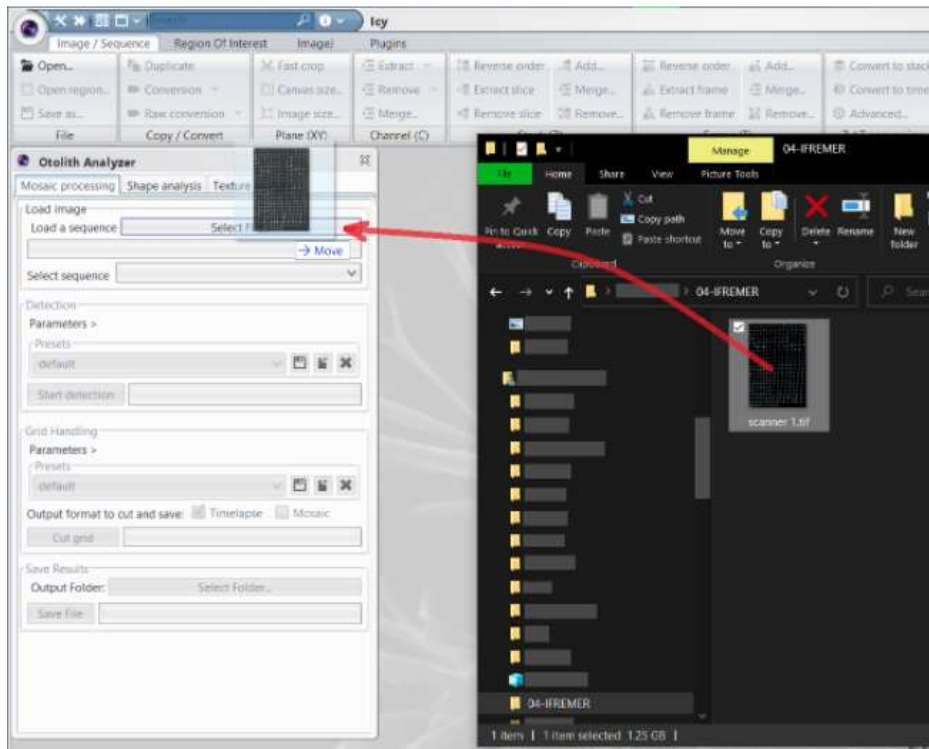


Figure 15: Téléchargement d'une image mosaïque.

Une fois le fichier image déposé sur le bouton, la barre de progression indique l'état du chargement.



Note : Si plus d'une image est ouverte dans Icy, veuillez-vous assurer que l'image cible est sélectionnée dans le menu déroulant "Select sequence".

3.2 « Detection »

C'est l'étape clé de ce module, une série de filtres et d'algorithmes de traitement d'image sont appliqués afin d'identifier les otolithes présents sur l'image cible.

Le panneau de l'étape 2 est composé de trois éléments : Parameters, Presets and a button to Start detection. (Paramètres, Préréglages et un bouton pour démarrer la détection).



1. Création d'un nouveau jeu de paramètres

L'élément Paramètres permet de sélectionner, créer, mettre à jour ou supprimer un ensemble prédéfini de paramètres. Cliquez sur le bouton > pour ouvrir le menu Paramètres (Figure 16).

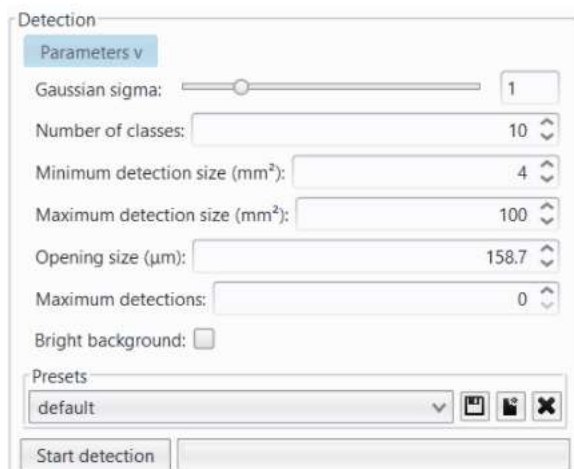


Figure 16: Gestion des paramètres de détection d'otolithes.

Les quatre premiers paramètres sont associés à une segmentation HK-Means appliquée à l'image cible (voir ce lien [<http://icy.bioimageanalysis.org/plugin/hk-means/>] pour en savoir plus sur cette méthode). Les deux autres paramètres sont des méthodes complémentaires pour lisser les résultats et limiter le nombre de détections. La signification de chaque paramètre est expliquée ci-dessous.

Sigma gaussien (pré-filtre) : Pour pré-traiter la séquence avec un filtre gaussien, donnez une valeur entière >0 (sigma du flou gaussien en x,y pour une séquence 2D et x,y,z pour une séquence 3D). Si le sigma du flou gaussien est fixé à 0, aucun filtre gaussien ne sera appliqué.

Nombre de classes (d'intensité) : 10 par défaut. Augmentez cette valeur si les objets d'intérêt (les otolithes) ont des valeurs d'intensité différentes.

Taille minimale de détection (μm^2) : Taille minimale des amas détectés, en micromètres carrés. Pour estimer la taille des objets (par exemple les noyaux) sur une séquence 2D, dessinez un ROI autour d'un objet et vérifiez la valeur de son intérieur.

Taille maximale de détection (μm^2) : Taille maximale des amas détectés, en micromètres carrés. Voir ci-dessus comment estimer la taille des objets.

Taille de l'ouverture (μm) : La taille en micromètres du filtre d'ouverture morphologique (une érosion suivie d'une dilatation) sur les détections résultantes. Ceci permet de lisser la bordure des otolithes lorsque les bordures sont très bruyantes.

Détections maximales : Le nombre limite de détections à présenter par cette étape. Le filtrage est effectué en tenant compte de la circularité de chaque détection. Les détections avec un indice de circularité plus élevé auront une priorité plus élevée pour être conservées. Lorsque la valeur est fixée à zéro (valeur par défaut), aucune limite de détection maximale n'est appliquée.

Fond clair : Indique si le fond de l'image est sombre ou clair (image en réflexion ou transmission) par rapport aux éléments à reconnaître. Si le fond est clair, cette option doit être sélectionnée (par défaut, elle ne l'est pas).



Note : Les paramètres et les résultats peuvent être exprimés en μm , il est donc important que l'information sur la taille des pixels soit correctement configurée dans vos images (Figure 17). Si ce n'est pas le cas, vous pouvez la modifier à partir du panneau

Propriétés de la séquence :

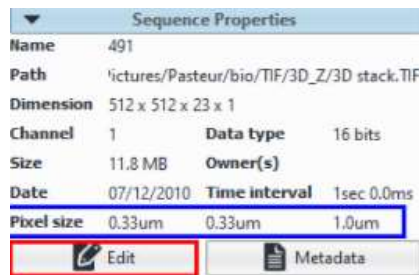

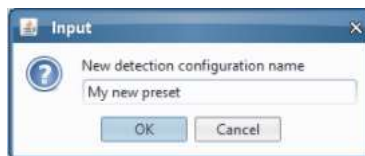


Figure 17 : Fenêtre de vérification et configuration de la taille d'un pixel.

La partie Presets permet de sauvegarder une configuration de paramètres : cliquez sur le bouton nouvelle page . Il vous sera demandé de donner un nom à la présélection, puis de cliquer sur OK.



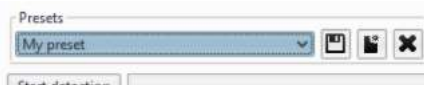
Après cela, la nouvelle configuration devrait être disponible dans le menu déroulant.




Note : Pour tester les paramètres, il n'est pas nécessaire d'enregistrer une nouvelle présélection. Vous pouvez directement lancer la détection.


2. Mise à jour d'un jeu de paramètres existant

Si vous souhaitez modifier l'une des valeurs des pré-réglages, sélectionnez-la d'abord dans le menu déroulant des pré-réglages.



Mettez ensuite à jour la ou les valeurs de paramètre souhaitées, puis cliquez sur le bouton de sauvegarde . Il vous sera demandé de confirmer les modifications en cliquant sur Oui, ces nouvelles valeurs seront sauvegardées pour le preset sélectionné.

3. Suppression d'un jeu de paramètres existant

Pour supprimer un jeu de paramètres existant, sélectionnez-le d'abord dans le menu déroulant de Presets. Cliquez ensuite sur le bouton de suppression . Il vous sera demandé de confirmer la suppression du pré-réglage en cliquant sur Oui. Après cela, le preset sera définitivement supprimé de la liste des presets.



Si vous avez modifié les valeurs du preset par défaut, vous pouvez les récupérer en supprimant le pré-réglage par défaut. Les valeurs originales seront réaffectées au pré-réglage par défaut.

4. Exécution de la détection

Pour lancer le processus de détection, cliquez sur le bouton Démarrer la détection. La barre de progression indique l'état d'avancement de la détection.



Lorsque la détection est terminée, tous les objets détectés sont affichés sur l'image sous forme de **régions d'intérêt** (Regions Of Interest). Celles-ci sont visibles sur l'image en tant qu'objets sélectionnables verts. Vous pouvez les sélectionner sur l'image en cliquant dessus et visualiser leurs propriétés dans l'onglet ROI sur la partie droite de l'interface utilisateur d'Icy (Figure 18).

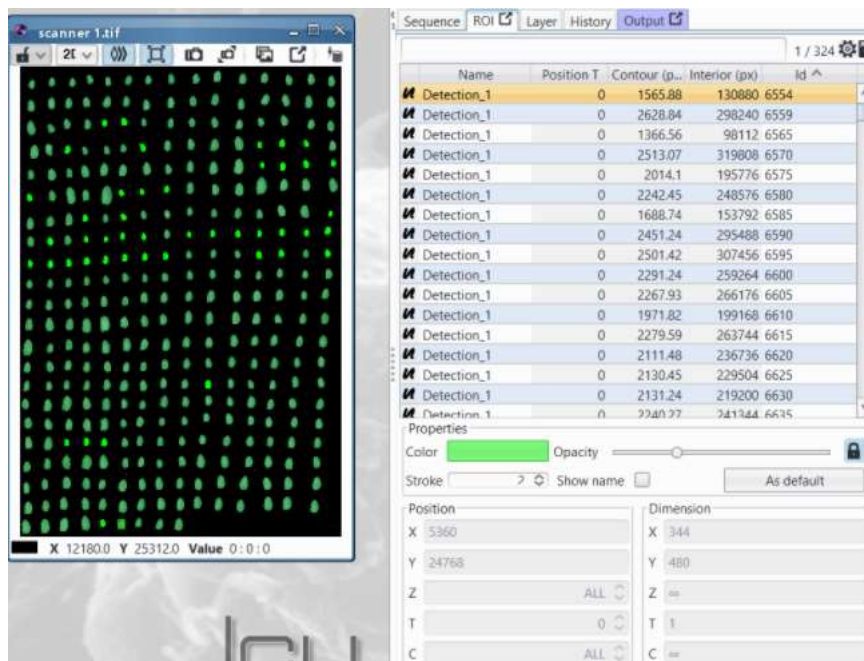



Figure 18: Détection des Regions Of Interest (ROI).



Note : si vous souhaitez masquer les ROIs et voir l'image originale, sélectionnez l'image et appuyez sur la touche L pour masquer toutes les superpositions sur l'image. Vous pouvez également le faire en cliquant sur le bouton Hide/Show layers () en haut de la fenêtre de la séquence.

À ce stade, vous pouvez revoir et supprimer les détections non souhaitées avant que la reconnaissance de la grille et le recadrage ne soient effectués.



Note : A ce stade, les détections n'ont pas d'ordre spécifique. Ceci est abordé à l'étape 3.3 « Grid Handing » (Ordre de la grille et séparation des otolithes). Cela permet aux utilisateurs de filtrer d'éventuelles fausses détections avant de reconnaître l'ordre de la grille sur l'image.

5. Suppression des détections de ROIs non souhaitées

Pour supprimer une ou plusieurs détections, sélectionnez les zones d'intérêt indésirables dans l'onglet ROI ou sur l'image (en maintenant la touche Ctrl enfoncée), assurez-vous qu'elles sont déverrouillées dans l'onglet ROI, puis appuyez sur la touche de suppression (Figure 19).

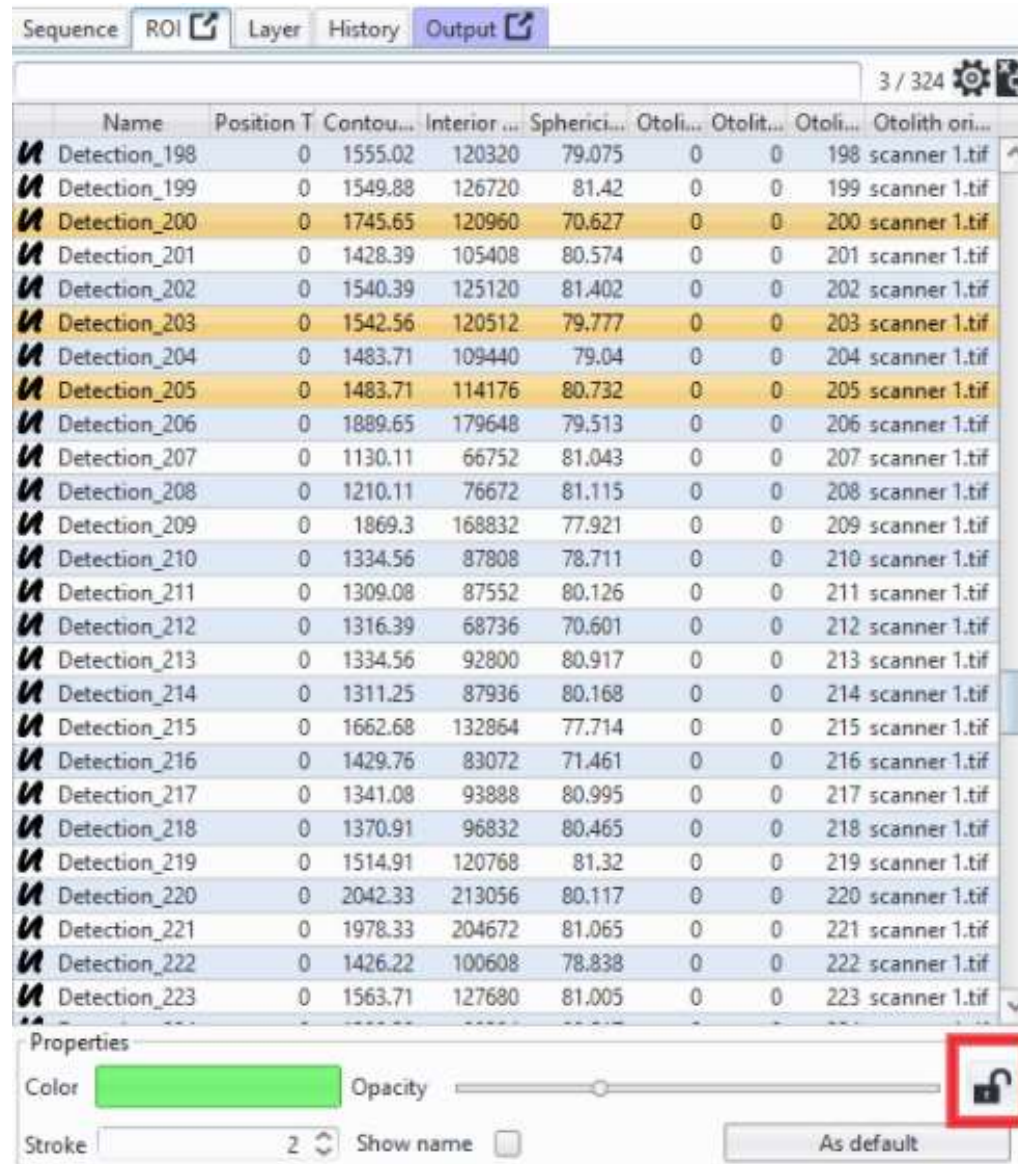


Figure 19 : Suppression de détections ROIs non souhaitées.

Maintenant que tous les otolithes ont été détectés, il est possible de procéder à la procédure de position d'une grille et de séparation des images.

3.3 « Grid Handling »

La reconnaissance d'une grille sous-jacente sur les détections, nécessite que les otolithes soient alignés sur l'image. Ce processus est effectué automatiquement lorsque le processus de séparation est lancé. Pendant cette procédure, les détections seront étiquetées (sur les séquences d'entrée et de sortie), en fonction de leur position sur l'image d'entrée. Ensuite, elles sont soit séparées pour générer une séquence timelapse (série d'image rassemblée les une à la suite des autres un album), soit alignées pour générer une image globale normalisée (Figure 20).



Note : Si plusieurs séries format des grilles sont présentes sur la même image, veuillez diviser l'image en sous-images contenant chaque grille séparément. Réalisation d'un timelapse par lot de pièces calcifiées.

L'interface utilisateur de la séparation des otolithes est composée de trois éléments, Estimate crop size, Output format to cut and save, Cut grid (Estimation de la taille des images, Sélection du format de sortie, Lancement du traitement).

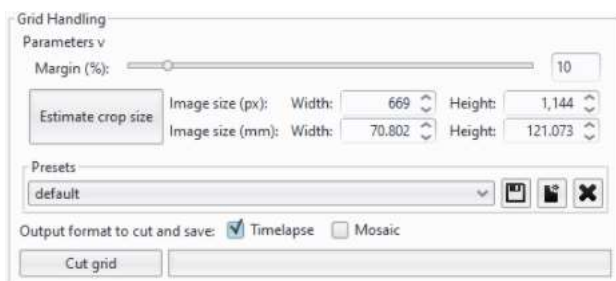


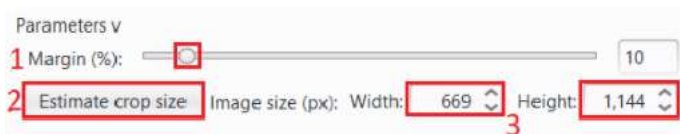
Figure 20 Paramétrage de la grille de découpe de l'image global.

1. Estimate crop size

La partie de traitement de la grille découpe l'image mosaïque autour de chaque otolithe en utilisant une taille de découpe donnée.

L'estimation de la taille du découpage peut être effectuée en suivant les étapes suivantes :

- Fournir un pourcentage de marge (une marge supplémentaire, dont la taille correspond à un pourcentage des valeurs Largeur et Hauteur des ROIs).
- Cliquez sur le bouton Estimer la taille de la culture et, si nécessaire.



- Ajustez manuellement la taille de la coupe en modifiant les valeurs de la largeur et de la hauteur (en pixels ou en millimètres). Lors de l'ajustement manuel de la taille, il est recommandé de définir la taille de découpe au moins aussi grande et large que le plus grand otolithe sur l'image.



Note : Vous pouvez enregistrer la taille de recadrage comme un preset pour utiliser la même taille sur les images futures. Ceci est pratique par exemple lorsqu'on traite des types spécifiques d'otolithes (**un preset par espèces est idéal pour normaliser les images**) et/ou lorsqu'une taille d'image spécifique est nécessaire. Vous pouvez suivre les mêmes

étapes que dans la section création d'un nouveau jeu de paramètres pour les paramètres de détection. Veuillez noter que seules la largeur et la hauteur de la coupe sont enregistrées. La marge n'est pas sauvegardée car elle est déjà incluse dans la taille du crop. Après avoir effectué une détection et si le preset de la taille de découpe est par défaut, une estimation automatique de la taille de découpe sera effectuée en utilisant la valeur actuelle du taux de marge.

2. Output format to cut and save

Les images résultantes sont disponibles en deux formats : Une séquence chronologique avec chaque détection ordonnée dans album (Timelapse); ou une séquence mosaïque avec une seule image avec toutes les détections réalignées et recadré. Vous pouvez choisir l'un ou l'autre, ou les deux, comme sortie pour cette étape.



Note : En cliquant sur le bouton Couper la grille, les détections sur l'image d'entrée seront organisées (même si ni timelapse ni mosaïque n'est sélectionné). Ces détections se verront attribuer une position sur la grille en x et y ainsi qu'un numéro d'otolithe.

3. Cut grid

Pour créer la ou les images de résultat, cliquez sur le bouton Découper la grille. Vous pouvez voir la progression du processus de découpe sur la barre de progression située à côté du bouton.

Lorsque le traitement est terminé, les images générées sont affichées sur l'espace de travail. Ces images contiennent également les détections (ROIs) (Figure 21).

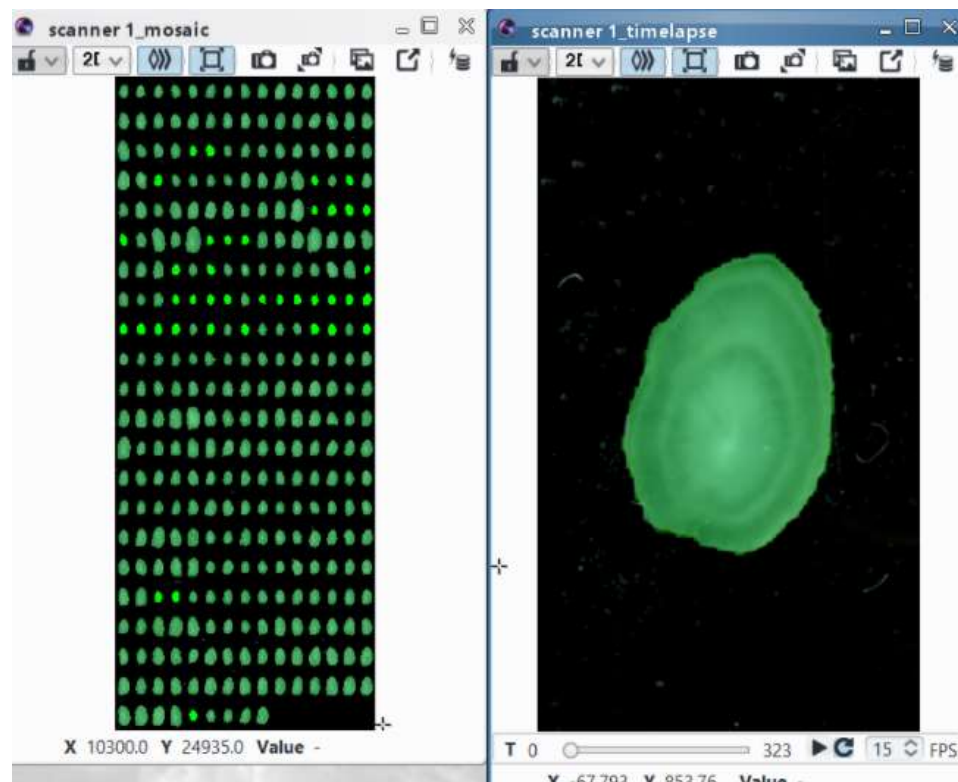


Figure 21: Image mosaic (à gauche) et timelapse (à droite).



Note : chaque ROI contient les informations suivantes : numéro d'otolithe, ligne et colonne de l'image originale, et nom de l'image originale. Ces informations peuvent être affichées dans l'onglet ROI, en sélectionnant ces propriétés dans le paramètre de la table

ROI.

3.4 « Save results »

Une fois que les images sont générées, elles deviennent disponibles sur Icy (sur la mémoire RAM). Cependant, elles ne sont pas directement enregistrées sur un stockage local. Dans la quatrième étape de ce module, vous pouvez choisir le dossier cible, où les images générées seront enregistrées.



Note : lorsque vous chargez une image à la première étape de ce module, le dossier de sortie est automatiquement ajusté pour correspondre au même dossier que l'image d'entrée. Si c'est l'endroit où vous souhaitez placer ces images, vous n'avez pas besoin de modifier le dossier de sortie car il est déjà spécifié. (2) Les longs chemins ne seront pas affichés entièrement. Passez la souris sur le chemin pour voir le texte complet.

Une fois le répertoire cible choisi, cliquez sur le bouton Enregistrer le fichier. La barre de progression située à côté du bouton indiquera que l'enregistrement est en cours. En outre, pour chaque image générée, une barre de progression apparaîtra dans le coin inférieur droit de l'espace de travail, indiquant la progression de l'enregistrement de cette image spécifique. Une fois ce processus d'enregistrement effectué, les fichiers seront disponibles à l'emplacement sélectionné. En fonction des images générées, un ou deux répertoires seront créés dans le dossier de sortie sélectionné (Figure 22).

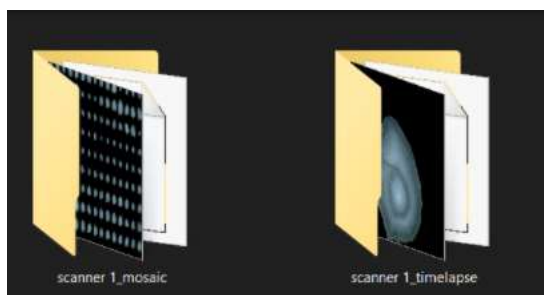


Figure 22 : Exemple de dossier sauvegardé.

Si le timelapse est sélectionné comme sortie : le répertoire généré contiendra chaque détection d'otolithe sur un fichier image .tiff énuméré séparé et un fichier .xml supplémentaire contenant toutes les informations ROI liées à chaque détection (position xy de l'otolithe, fichier d'origine, ...).

Si la mosaïque est sélectionnée comme sortie : le répertoire généré contiendra un seul fichier image .tiff avec la mosaïque d'otolithes, et un fichier .xml supplémentaire avec les informations ROI liées aux détections d'otolithes.

4 Analyses de formes « Shape analysis »

La finesse de définition du bord de l'otolithe peut influencer beaucoup le résultat des analyses de forme. Alors que la segmentation de l'onglet Mosaic processing du module 1 est plutôt grossière et conçue pour détecter les otolithes et les recadrer, la segmentation de l'onglet Shape analysis du module 2 est plus précise et conçue pour les analyses de forme (Figure 27). Si la segmentation doit être utilisée pour des analyses de forme, nous recommandons de segmenter ou re-segmenter les otolithes avec le module 2.

Pour ouvrir ce module, cliquez sur l'onglet Analyse de forme en haut du plugin (Figure 23).

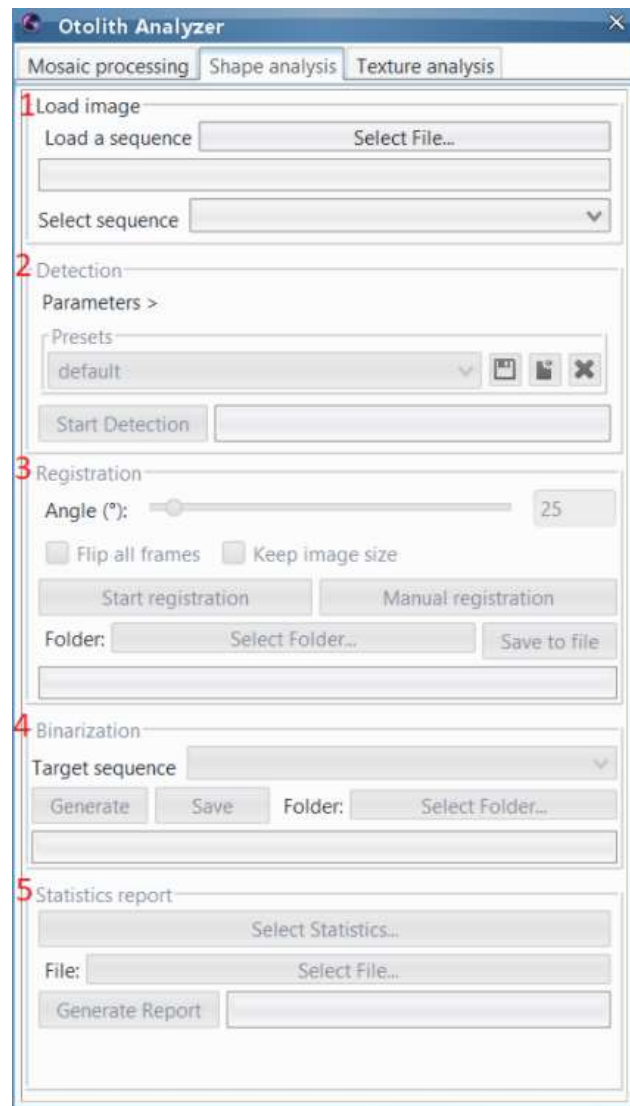


Figure 23 : Onglet Shape analysis.

L'interface utilisateur de ce module contient 5 panneaux (étapes) : Charger l'image, Détection, Enregistrement, Binarisation et Rapport de statistiques. Les quatre derniers panneaux sont grisés à l'ouverture, et deviennent disponibles à l'utilisateur une fois qu'une image est chargée et sélectionnée dans Icy.

4.1 « Load image »

Comme dans la première étape du module 1, l'image cible doit être soit chargée dans Icy, soit sélectionnée si elle est déjà chargée. Il n'est pas nécessaire de fermer et de rouvrir les images recadrées dans le module 1, il suffit de sélectionner la séquence si elle n'est pas déjà sélectionnée.

Pour charger une séquence dans Icy, faites glisser le dossier contenant la séquence d'images cible et déposez-le sur le bouton Select File le fichier.

Pour charger une seule image, faites glisser le fichier image cible et déposez-le sur le bouton Select File. La barre de progression située sous le bouton vous indiquera l'état du chargement.

Lorsque la séquence est chargée, elle devient disponible dans une fenêtre de visualisation à l'intérieur de l'espace de travail d'Icy.

Si la séquence cible est déjà disponible dans l'espace de travail, assurez-vous qu'elle est sélectionnée comme séquence cible pour ce module (Figure 24).

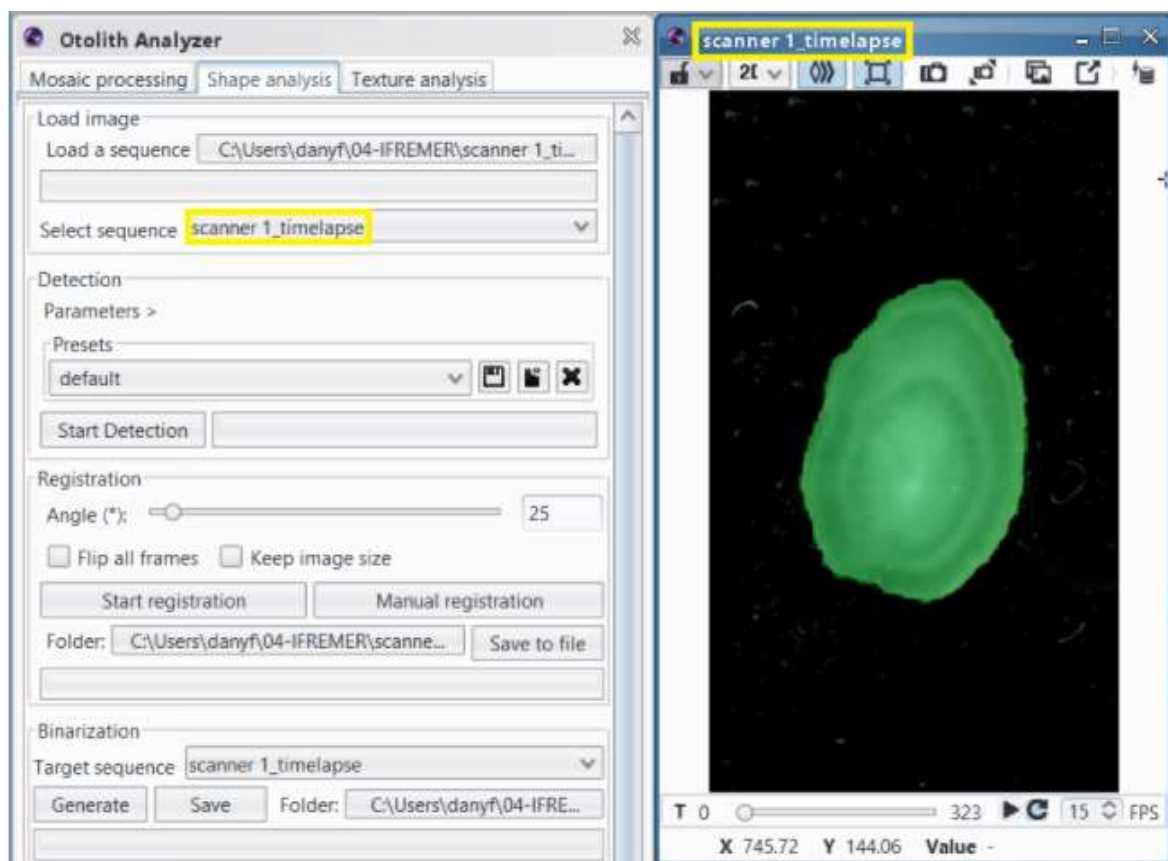


Figure 24: Verification de la séquence sélectionné.

4.2 Import et groupement d'images de différentes tailles

Il est possible de charger un set d'images de différentes tailles à partir d'un seul dossier. Cela est possible grâce un outil qui se présente sous la forme d'un script graphique (protocol) à exécuter dans ICY.

Pour lancer le protocole, il faut glisser-déposer le fichier « Import-Images.protocol » directement dans ICY.

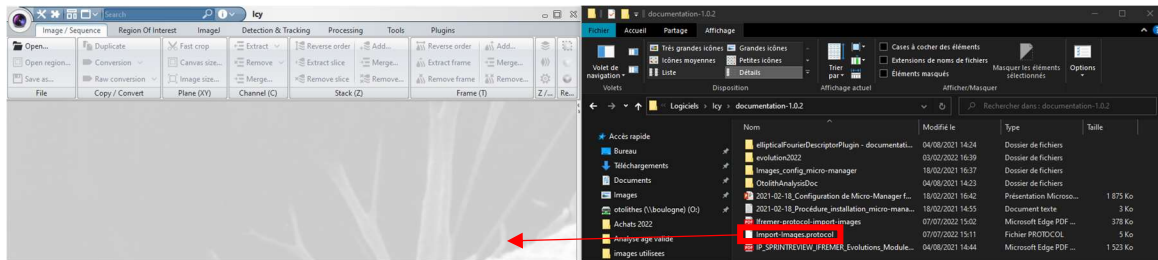


Figure 25: Ouverture du protocole de groupement d'images

Il faut ensuite compléter les informations comme indiqué ci-dessous :

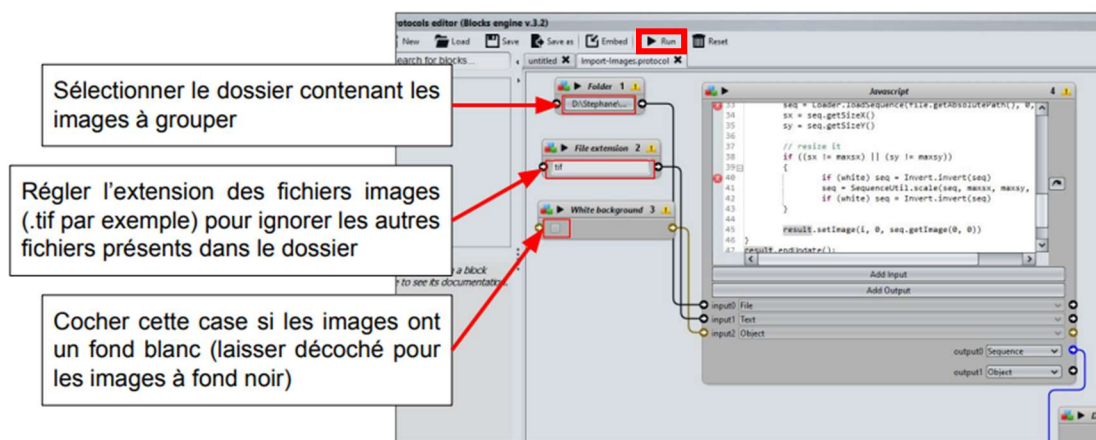


Figure 26: Modification des paramètres d'entrée et lancement du protocole

Et enfin cliquer sur le bouton run pour lancer le protocole. Une nouvelle fenêtre faisant apparaître le résultat des images groupées (en timelapse) doit s'ouvrir. Il est possible d'enregistrer directement le timelapse si le set d'image a besoin d'être ré-utilisé.

4.3 « Detection »

La qualité de la segmentation joue un rôle essentiel dans ce module car toutes les mesures enregistrées dans le rapport final sont basées sur la forme des détections produites par la segmentation. Il est donc vital que la segmentation soit aussi précise que possible et aussi proche que possible de la forme réelle des otolithes dans la séquence cible. A titre d'exemple, regardez les images suivantes présentant la différence entre les détections à faible et à fort détail (c'est-à-dire la superposition verte) sur un otolithe (Figure 27).

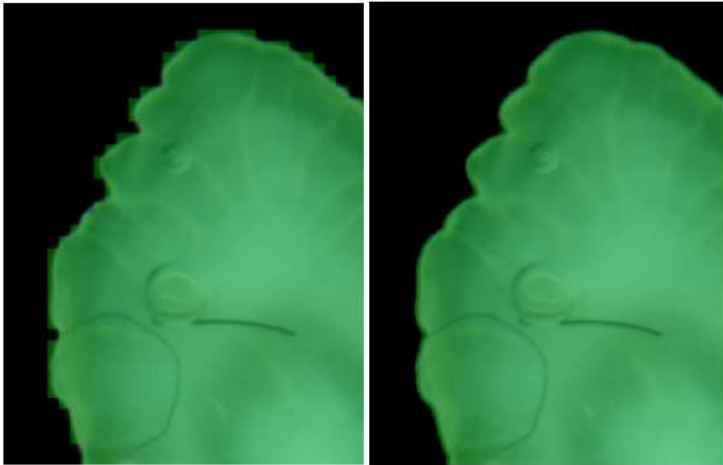


Figure 27 : Différence de segmentation en fonction des onglets.

Comme présenté dans le module 1, l'étape de détection avait pour but de localiser approximativement les otolithes sur l'image brute de la grille, afin qu'ils puissent être découpés en images individuelles (une séquence timelapse). Cela signifie que les formes des otolithes détectés sont approximatives, comme l'image de gauche de l'exemple précédent. En revanche, l'étape de détection de ce module est axée sur la détection fine du contour de chaque otolithe présent sur la séquence. Par conséquent, ce module suppose que les otolithes ont déjà été séparés et sont disposés sur une timelapse.

Alternativement, ce module accepte également des images d'otolithes uniques sans approximation comme entrée. Dans ce cas, la détection dans ce module se chargera d'approximer l'emplacement de l'otolithe et d'affiner son contour.

Les paramètres utilisés pour cette étape doivent être presque identiques à ceux du module 1. Veuillez vous référer à l'étape 2 du module 1 pour avoir des informations sur la signification de chaque paramètre (3.2« Detection »).



Note : Comme dans le module 1, vous pouvez créer, sélectionner, mettre à jour et supprimer des pré-réglages de paramètres pour optimiser le processus de segmentation sur plusieurs images du même type.

Une fois les paramètres définis, cliquez sur le bouton Start Detection pour effectuer la segmentation. La segmentation peut être suivie sur la barre de progression située à côté du bouton. Lorsque la segmentation est terminée, toutes les détections sont affichées sur la séquence cible sélectionnée.

Dans l'image suivante, vous pouvez voir une comparaison des résultats de détection entre le module 1 ("avant") et le module 2 ("après") (Figure 28) . La pixellisation du contour de l'otolithe dans l'image "avant" est due à un sous-échantillonnage effectué lors de la détection sur le module 1 afin d'améliorer ses performances en temps de traitement. Par conséquent, nous recommandons de segmenter ou re-segmenter avec le module 2 si votre objectif est de faire des analyses de forme sur les détections.

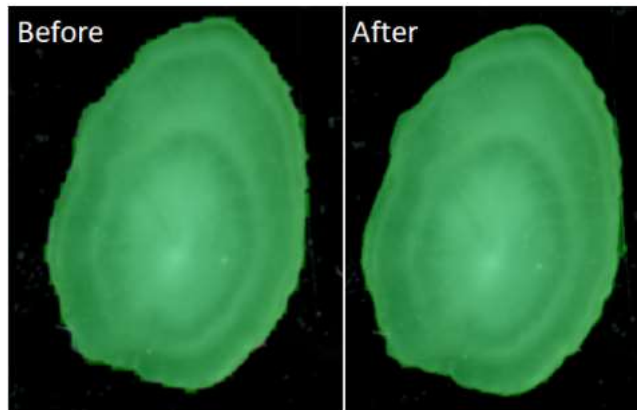


Figure 28 Comparaison d'une segmentation pour analyses de forme.

4.3.1 Correction manuelle des résultats de la segmentation.

Il est possible de corriger manuellement les résultats de la segmentation. Pour ce faire, allez dans le cadre contenant la segmentation à modifier, et sélectionnez le ROI cible en cliquant sur sa boîte englobante. Vous pouvez également cliquer sur les ROIs directement dans l'onglet ROI. Si vous double-cliquez sur un ROI dans l'onglet ROI, le focus de la visionneuse sur l'image cible se déplacera pour se centrer sur le ROI sélectionné. Ici, vérifiez que le ROI est activé (avec une icône de verrouillage ouverte). Si ce n'est pas le cas, cliquez sur le bouton de verrouillage pour le déverrouiller (Figure 29).

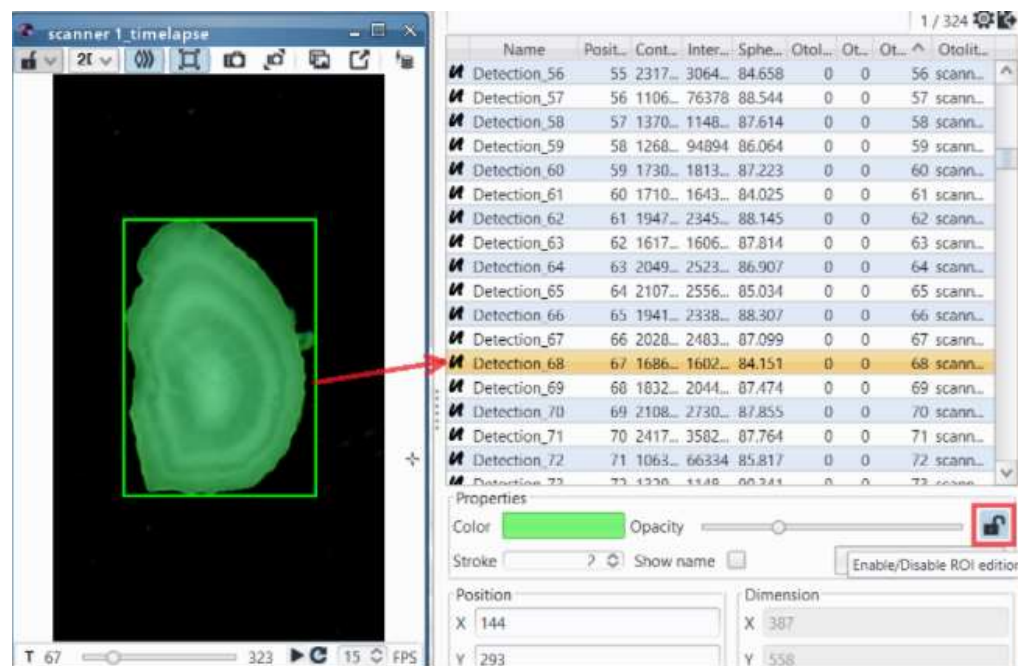


Figure 29 : Déverrouiller un ROI voulu.

Ensuite, vous pourrez ajuster le ROI en faisant un clic gauche pour ajouter des pixels ou un clic droit pour en retirer (Figure 30).

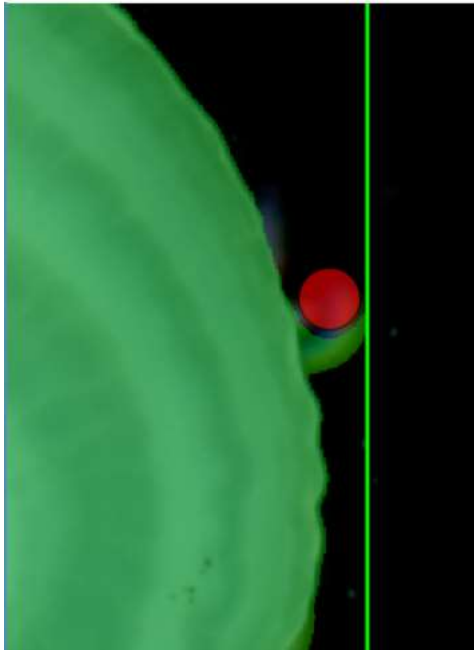


Figure 30: Illustration de l'enlèvement de pixels sur le bord d'une ROI.



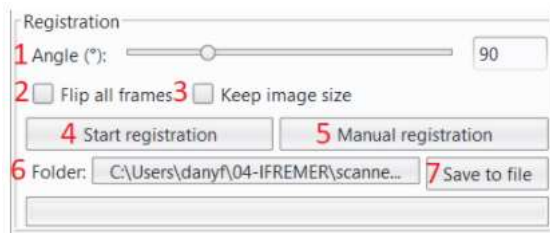
Vous pouvez utiliser les touches + et - pour ajuster la taille du pinceau lors de l'édition d'une ROI.

Après avoir modifié la ROI cible, veillez à désactiver l'édition du ROI dans l'onglet ROI en cliquant à nouveau sur le verrou.

4.4 « Registration »

Pour normaliser la présentation des détections d'otolithes, vous pouvez appliquer à cette étape un enregistrement automatique des otolithes. Cet enregistrement fera pivoter et centrer les images et les ROIs, pour chaque otolithe, en prenant l'axe principal de la ROI associée, en faisant pivoter l'image pour qu'elle corresponde à l'angle désiré, et en recentrant l'otolithe.

L'interface utilisateur pour cette étape contient 7 éléments :



Plus précisément,

1. **Angle cible** : L'orientation cible pour l'axe principal de tous les otolithes enregistrés dans la séquence. Cet angle est fourni en degrés.
2. **Effectuer un miroir de toutes les images** : Si cette option est cochée, tous les otolithes détectés dans la séquence sont inversés pendant le processus d'enregistrement.
3. **Conserver la taille de l'image** : Si coché, la taille de la séquence (largeur et hauteur) de la séquence d'entrée sera préservée. Sinon, la taille de la séquence résultante sera ajustée pour contenir tous les pixels des images tournées.
4. **Démarrer la rotation** : Lorsque vous cliquez dessus, la rotation automatique est effectuée pour toutes les images de la séquence cible. Seules les images contenant des détections (ROIs) seront enregistrées.
5. **Rotation manuel** : Après la rotation de la séquence cible, vous pouvez ajuster manuellement l'angle pour chaque image de la séquence. En outre, vous pouvez retourner des images individuelles avec cet outil.
6. **Dossier de sortie** : Vous pouvez spécifier ici le dossier dans lequel la séquence résultante doit être enregistrée. Remarque : Ce champ est prérempli lorsque la séquence cible est sélectionnée.
7. **Enregistrer dans le fichier** : Ce bouton lance l'enregistrement de la séquence enregistrée à l'emplacement fourni. Le processus peut être suivi sur la barre de progression située sous le bouton.

Une fois les paramètres sélectionnés, vous pouvez cliquer sur le bouton **Start registration** pour créer la séquence enregistrée. La progression est affichée sur la barre de progression en bas du panneau de Registration.

Lorsque la rotation de la séquence est terminée, la séquence est affichée dans une nouvelle fenêtre.

L'image d'exemple suivante a été modifiée sans conserver la taille originale de la séquence. Par conséquent, sa taille est passée de 669 x 1144 pixels à 1113 x 1316 pixels pour contenir tous les pixels tournés (Figure 3131).

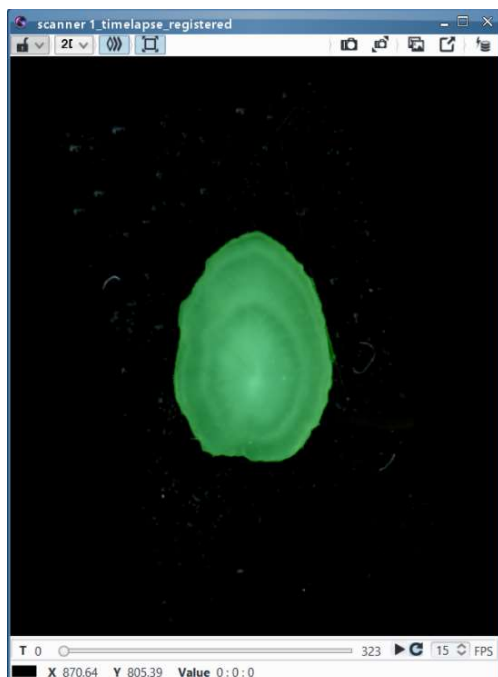


Figure 31 : Exemple d'image n'ayant pas conservé sa taille original.

L'exemple ci-dessous a été enregistré avec l'option "flip all" cochée, de sorte que tous les otolithes ont été reflétés autour de l'axe y (Figure 322).

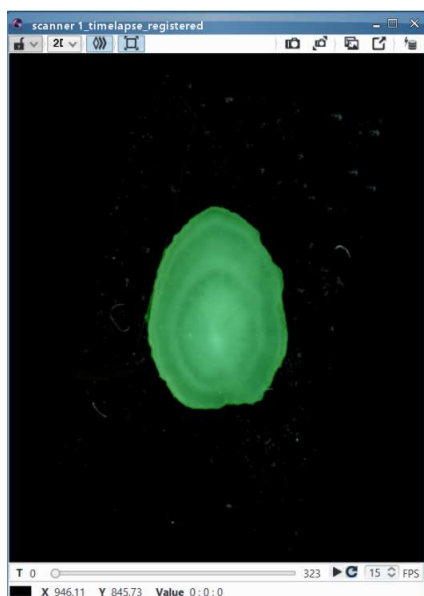


Figure 32 : Exemple d'un timelapse ayant eu un flip (effet miroir) sur l'ensemble des images

Dans ce dernier exemple, l'otolithe a été enregistré en conservant la taille de l'image originale (Figure 333).

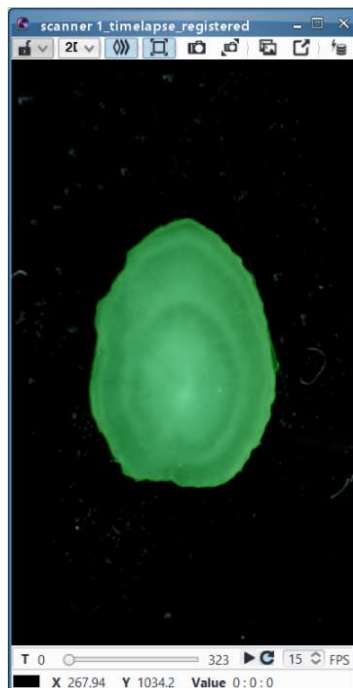


Figure 33 Exemple d'un timelapse ayant conservé la taille original.

Rotation manuel des otolithes

Lorsque la rotation automatique est terminée, les utilisateurs peuvent ajuster les images individuelles en utilisant Manual registration. Tout d'abord, allez sur l'image désirée et cliquez sur le bouton. Les commandes de rotations manuel apparaîtront dans la fenêtre de la séquence (Figure 344).

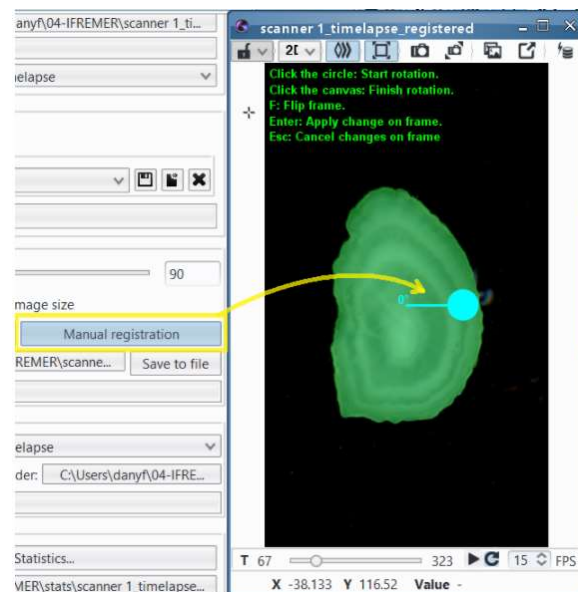


Figure 34 : Exemple de rotation manuel.

Pour modifier l'angle de l'otolithe, cliquez une fois sur le cercle cyan, puis déplacez le curseur sur l'angle souhaité. Pour fixer l'angle, cliquez une fois de plus sur le cercle cyan. Un aperçu de l'image tournée sera disponible avant de valider l'angle.

En option, vous pouvez retourner l'image autour de l'axe des y sur des images individuelles à ce moment-là en appuyant sur la touche F.

Pour valider l'angle sélectionné (et l'option de retournement) sur l'image actuelle, appuyez sur la touche Entrée. Si vous souhaitez annuler les modifications, appuyez sur la touche Echap.

Vous pouvez répéter ce processus autant de fois que vous le souhaitez en vous déplaçant le long de toutes les images de la séquence.

Pour terminer le mode de rotation manuel sur la visionneuse, appuyez sur la touche Echap pour retirer les commandes de la visionneuse (Figure 35).

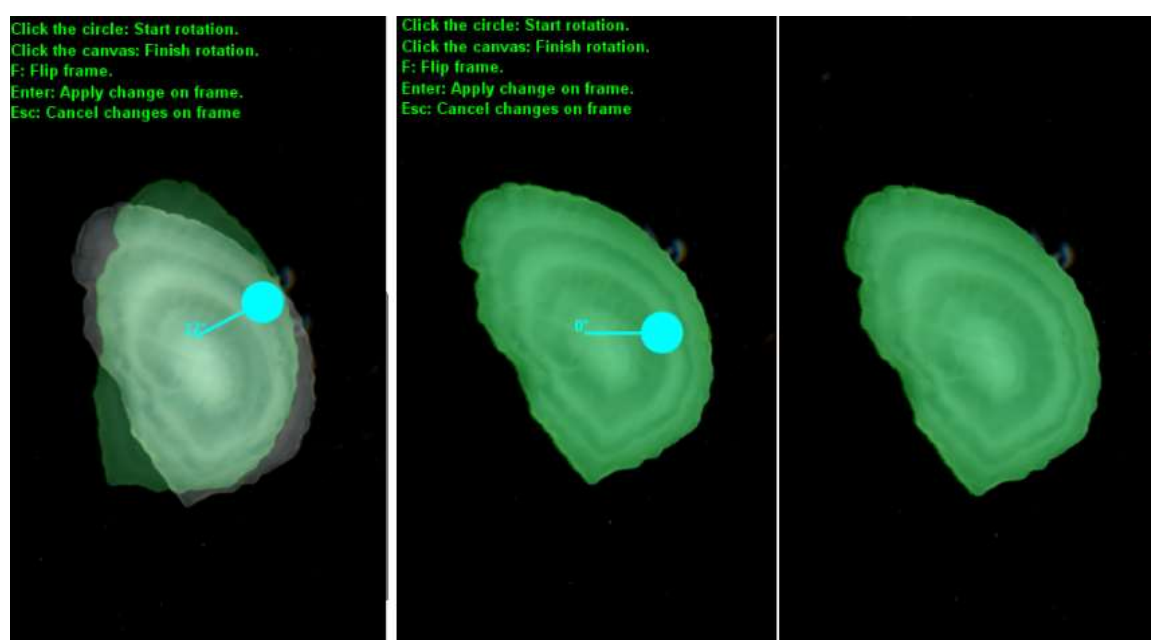


Figure 35: Exemple d'une séquence de rotation manuel.

Sauvegarde des résultats de l'enregistrement

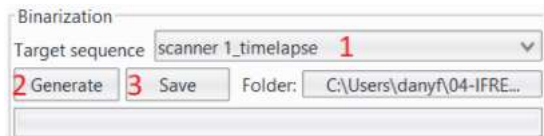
Lorsque vous êtes satisfait des résultats de l'enregistrement, la séquence de résultats peut être sauvegardée sur un stockage local. Vous pouvez passer la souris sur le chemin du dossier à côté de Folder pour vérifier l'emplacement de sauvegarde. Par défaut, il est rempli avec le même chemin que le dossier de la séquence d'entrée. Pour modifier l'emplacement d'enregistrement, cliquez sur le chemin et sélectionnez un nouveau dossier pour enregistrer les résultats de l'enregistrement.

Cliquez sur le bouton Enregistrer dans le fichier pour lancer la procédure d'enregistrement. La progression de l'enregistrement peut être suivie grâce à la barre de progression située sous le bouton Enregistrer dans le fichier et à la barre de progression située dans le coin inférieur droit de l'espace de travail. Une fois terminé, le dossier contenant les images enregistrées sera disponible dans le dossier sélectionné.

4.5 « Binarization »

Vous avez ici la possibilité de convertir les ROIs en une séquence binaire et d'enregistrer cette séquence dans un stockage local.

L'interface pour cette étape optionnelle est divisée en trois parties.



Tout d'abord, vous devez sélectionner la séquence à binariser parmi les séquences ouvertes (fenêtres ouvertes) disponibles dans l'espace de travail à l'aide du menu déroulant Target sequence.

Ensuite, cliquez sur le bouton Générer pour créer une version binarisée de la séquence entière (Figure 366).

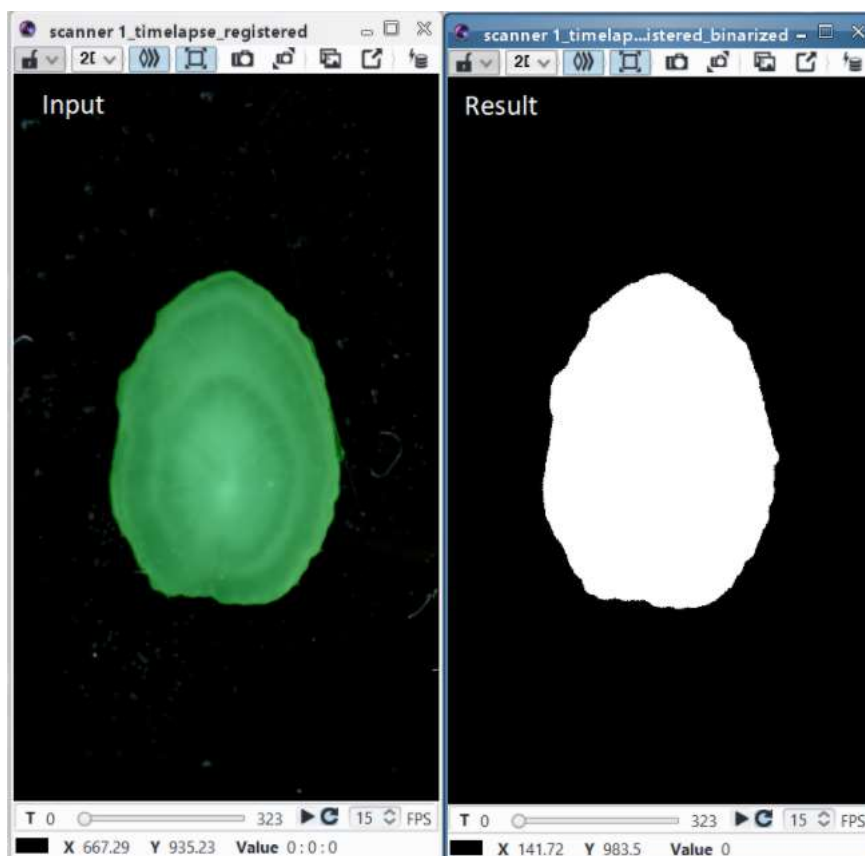


Figure 36: Création d'une séquence binarisée.

Enfin, enregistrez la séquence binarisée. Vous pouvez passer la souris sur le chemin du fichier à côté de Folder pour vérifier l'emplacement de sauvegarde. Par défaut, il est rempli avec le même chemin que le dossier de la séquence d'entrée. Pour modifier l'emplacement d'enregistrement, cliquez sur le chemin et sélectionnez un nouveau dossier pour enregistrer les résultats de l'enregistrement. Pour enregistrer la séquence binarisée, cliquez sur le bouton Enregistrer. La progression peut être suivie sur la barre de progression située sous le bouton. Une fois terminé, les fichiers seront disponibles dans le dossier sélectionné.

4.6 « Statistics report »

Icy peut calculer plusieurs descripteurs de ROI qui peuvent être utilisés pour caractériser les détections d'otolithes. Dans cette étape, vous sélectionnez les descripteurs d'intérêt, les calculez sur toutes les détections de la séquence enregistrée et les enregistrez dans un rapport.

L'interface utilisateur est composée de quatre éléments (Figure 37: Fenêtre de création d'un rapport d'analyses..Figure 37).

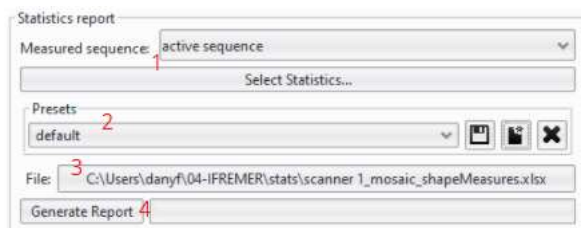


Figure 37: Fenêtre de création d'un rapport d'analyses..

Tout d'abord, sélectionnez la séquence sur laquelle les mesures seront calculées. Ensuite, cliquez sur le bouton Select Statistics... . Une boîte de dialogue s'affiche avec les descripteurs disponibles et leur position sur le rapport (Figure 388) Vous avez la possibilité de forcer la position d'une colonne de descripteurs dans le rapport final en modifiant la valeur à droite du nom du descripteur. Par défaut, les descripteurs sont classés par ordre alphabétique. Pour effectuer une recherche dans la liste des descripteurs, vous pouvez réordonner les descripteurs par nom ou par position, en cliquant respectivement sur "Nom" ou "Position" dans l'en-tête de la colonne.

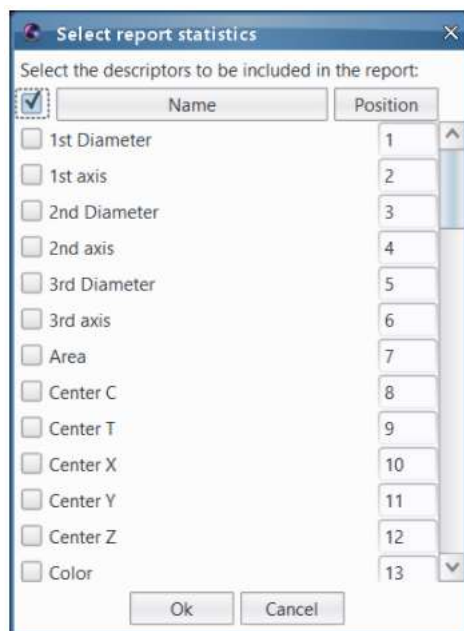


Figure 38: Descripteurs de forme des ROIs.

Une fois les descripteurs sélectionnés et ordonnés, cliquez sur le bouton OK. Les descripteurs sélectionnés seront utilisés pour générer le rapport.



Note : Vous pouvez créer plusieurs préréglages des descripteurs sélectionnés de la même manière que les préréglages des paramètres de segmentation. Cela s'avère pratique lorsque vous produisez des rapports pour plusieurs images. Veuillez consulter la section Créer un nouveau jeu de paramètres sur le module 1 pour plus d'informations.

Vous pouvez maintenant enregistrer le rapport en validant l'emplacement d'enregistrement du rapport. Par défaut, le rapport est enregistré avec un suffixe "_shapeMeasures" dans un dossier stats situé dans le dossier de la séquence d'entrée. Pour modifier l'emplacement d'enregistrement, cliquez sur le chemin et sélectionnez un nouveau dossier pour enregistrer les résultats de l'enregistrement. Enfin, cliquez sur le bouton Generate Report pour calculer les descripteurs et générer le fichier de rapport (Figure 39).

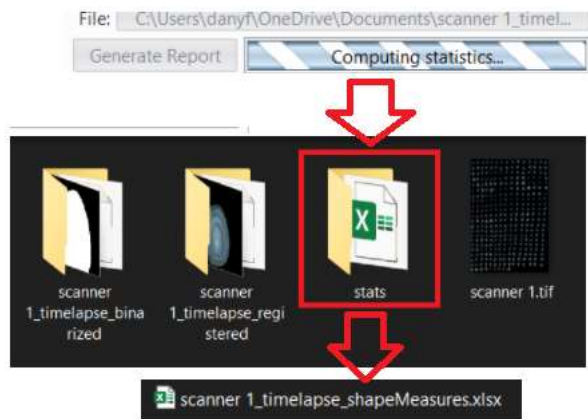


Figure 39 : Obtention du rapport d'analyses.



Ce fichier contiendra tous les descripteurs sélectionnés en colonnes et toutes les détections en lignes (Figure 40).

| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | |
|----|---------------------|----------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----|
| 1 | Otolith origin file | Otolith number | Otolith x | Otolith y | Perimeter | Area | Sphericity | Center X | Center Y | Elliptic Four | Elliptic Fox | Elliptic Fox | Elliptic Fox | Elliptic Fox | Ell |
| 2 | scanner 1.tif | 1 | 0 | 17.01925189 | 16.96540126 | 85.03003413 | 332.0700580 | 586.3870179 | 0 | 1 | 0.022451 | 0.039397 | 0.019294 | 0.4 | |
| 3 | scanner 1.tif | 3 | 1 | 16.94362658 | 15.23809678 | 81.67297599 | 312.7987225 | 588.7633815 | 0 | 1 | 0.096418 | 0.040848 | 0.016305 | 0.4 | |
| 4 | scanner 1.tif | 5 | 2 | 16.50493396 | 15.47779163 | 84.40784613 | 328.6482495 | 585.3750235 | 0 | 1 | 0.027674 | 0.036709 | 0.026054 | 0 | |
| 5 | scanner 1.tif | 7 | 3 | 17.03832327 | 15.84663049 | 82.82215383 | 336.4822553 | 586.3764375 | 0 | 1 | 0.020266 | 0.032453 | 0.020017 | -0 | |
| 6 | scanner 1.tif | 9 | 4 | 16.62069986 | 15.48339197 | 83.99372404 | 330.7315388 | 583.3982465 | 0 | 1 | 0.012791 | 0.031572 | 0.02071 | -0 | |
| 7 | scanner 1.tif | 11 | 5 | 19.25074543 | 18.93936624 | 80.13829573 | 330.5936389 | 584.2700025 | 0 | 1 | 0.01762 | 0.030364 | 0.02541 | -0 | |
| 8 | scanner 1.tif | 13 | 6 | 16.6355736 | 16.11208695 | 85.53484059 | 331.3021085 | 582.0177895 | 0 | 1 | 0.025965 | 0.034473 | 0.02275 | -0 | |
| 9 | scanner 1.tif | 15 | 7 | 18.36769493 | 19.14937926 | 84.45433921 | 328.5220338 | 590.1561071 | 0 | 1 | 0.035101 | 0.041689 | 0.02728 | -0 | |
| 10 | scanner 1.tif | 17 | 8 | 18.73643819 | 20.2482794 | 85.1357487 | 328.5860867 | 586.4060417 | 0 | 1 | 0.031146 | 0.033648 | 0.024328 | -0 | |
| 11 | scanner 1.tif | 19 | 9 | 22.07686952 | 24.08754143 | 78.80679848 | 326.7151227 | 592.7434365 | 0 | 1 | -0.00954 | 0.036635 | 0.020047 | 0.4 | |
| 12 | scanner 1.tif | 21 | 10 | 19.14736436 | 22.26059916 | 87.3502849 | 324.8306355 | 590.7385869 | 0 | 1 | 0.027257 | 0.034628 | 0.023868 | -0 | |
| 13 | scanner 1.tif | 23 | 11 | 20.04946219 | 21.870924 | 82.68672104 | 322.7616048 | 583.9599857 | 0 | 1 | 0.021004 | 0.030994 | 0.02675 | -0 | |
| 14 | scanner 1.tif | 25 | 12 | 19.03577472 | 20.24458317 | 83.78934495 | 328.2178836 | 584.492127 | 0 | 1 | 0.035963 | 0.041481 | 0.021503 | -0 | |
| 15 | scanner 1.tif | 27 | 13 | 18.91609944 | 22.0015241 | 87.9021964 | 324.540807 | 588.2768111 | 0 | 1 | 0.00987 | 0.034126 | 0.018848 | -0 | |
| 16 | scanner 1.tif | 29 | 14 | 18.90381598 | 21.44014529 | 86.82990246 | 329.2154709 | 589.1834833 | 0 | 1 | 0.022637 | 0.040705 | 0.023195 | 0.4 | |
| 17 | scanner 1.tif | 31 | 0 | 15.63860016 | 23.24905744 | 87.03563039 | 334.7519849 | 588.6702093 | 0 | 1 | 0.023123 | 0.038817 | 0.014217 | 0.4 | |

Figure 40: Exemple de rapport d'analyses.

Note : Les utilisateurs peuvent choisir le format du rapport parmi les formats de fichiers compatibles suivants :

- xlsx : Feuille de calcul Excel
- txt : Rapport au format texte avec des valeurs séparées par des virgules.
- csv : Un fichier texte avec des valeurs séparées par des virgules.

Les descripteurs suivants sont disponibles pour être inclus dans le rapport généré à la fin de l'analyse des détections.

- **1er, 2e et 3e diamètres** : Diamètres de l'ellipse la mieux ajustée le long des premier, deuxième et troisième axes principaux. Dans les images 2D, le troisième diamètre est toujours égal à 0. Plus d'informations sont disponibles sur <https://doi.org/10.1109/ICPR.1996.546029>.
- **1er, 2ème et 3ème axe** : Premier, deuxième et troisième axes principaux de l'ellipse la mieux ajustée. Dans les images 2D, le troisième axe principal est toujours [0, 0, 1]. Pour plus d'informations, consultez le site <https://doi.org/10.1109/ICPR.1996.546029>.
- **Aire** : La surface de la ROI en micromètres.
- **Centre (X, Y, Z, T, C)** : Le centre de masse de la ROI le long de chaque axe. Dans les images 2D, le centre sur l'axe Z est 0.
- **Color** : La couleur utilisée pour afficher la ROI.
- **Conteneue** : Nombre de ROI(s) contenue(s) à l'intérieur de la ROI décrite.
- **Contour** : Le nombre de pixels trouvés sur les bords de la ROI décrite.
- **Convexité** : Le rapport entre la surface de la ROI décrite et son enveloppe convexe. Cette valeur est exprimée en pourcentage et vaut 100 pour un objet purement convexe.
- **Coefficients de Fourier elliptiques (A, B, C, D)** : Les premiers coefficients A, B, C et D des 99 premières harmoniques décrivant le ROI cible à l'aide d'ellipses périodiques. Voir une description détaillée de ces valeurs dans [https://doi.org/10.1016/0146-664X\(82\)90034-X](https://doi.org/10.1016/0146-664X(82)90034-X).
- **Allongement** : Rapport entre les premier et deuxième diamètres principaux du ROI cible. La valeur sera de 1 si l'ellipse ajustée est un cercle parfait. Sinon, la valeur sera inférieure à 1.
- **Flatness3D** : Rapport entre le premier et le troisième diamètre principal de la ROI cible. La valeur sera de 1 si la ROI est parfaitement plate. Sinon, la valeur sera inférieure à 1.
- **Icône** : l'image de l'icône utilisée pour identifier le type de ROI.
- **Id** : L'identifiant interne donné à la ROI.
- **Centre d'intensité (X, Y, Z)** : Le centre de masse pondéré en intensité de la ROI cible sur chaque axe.
- **Intérieur** : Le nombre de pixels contenus dans la ROI cible.
- **Intersection** : Nombre de ROI(s) intersectées avec tout pixel de la ROI décrite.
- **Diamètre maximal du feret** : La distance maximale entre 2 points quelconques de la surface.
- **Intensité maximale** : Intensité maximale trouvée sur chaque canal parmi les pixels à l'intérieur du ROI.
- **Intensité moyenne** : Intensité moyenne de chaque canal des pixels à l'intérieur du ROI.
- **Nom** : Nom du ROI
- **Opacité** : Facteur d'opacité pour afficher le contenu du ROI (0 = transparent, 1 = complètement opaque).
- **Numéro d'otolithe** : L'identifiant de l'otolithe donné lors de l'étape de détection sur le plugin d'analyse des otolithes.
- **Fichier d'origine des otolithes** : Le nom du fichier de l'image à partir duquel le ROI otolithe cible a été pris.
- **Otolith frame file** : Le nom du fichier image associé au ROI otolithique cible une fois la séquence enregistrée.
- **Otolithe (X, Y)** : La position de la grille de l'otolithe sur le fichier d'origine.

- **Périmètre** : La longueur de la bordure du ROI cible en micromètres.
- **Tangage** : L'angle dans le sens inverse des aiguilles d'une montre de l'axe principal de l'objet sur le plan x-z (autour de l'axe y+) ; il est égal à 0 lorsqu'il est aligné sur le plan x-y, le signe suit l'axe z. Voir (https://en.wikipedia.org/wiki/Ship_motions)
- **Position (X, Y, Z, T, C)** : La position du coin supérieur gauche de la boîte englobante autour du ROI le long de chaque axe.
- **Lecture seule** : Vrai si la ROI est verrouillée, ce qui empêche de modifier la ROI. Faux sinon.
- **Roulis** : L'angle dans le sens inverse des aiguilles d'une montre autour de l'axe principal de l'objet. Voir (https://en.wikipedia.org/wiki/Ship_motions)
- **Roundness (arrondi)** : Le rapport normalisé entre le rayon du cercle (ou de la sphère) inscrit au minimum et celui du cercle inscrit au maximum, exprimé en pourcentage (100 % pour un cercle ou une sphère).
- **Taille (X, Y, Z, T, C)** : La taille de la boîte de délimitation contenant le ROI le long de chaque axe.
- **Sphéricité** : Le rapport normalisé entre le contour et l'intérieur, exprimé en pourcentage (100 % pour un cercle ou une sphère).
- **Écart type** : L'écart type de la distribution de l'intensité pour chaque canal à l'intérieur du ROI.
- **Intensité totale** : La somme de la distribution d'intensité pour chaque canal à l'intérieur du ROI.
- **Surface Area (Surface)** : Uniquement disponible pour les ROIs 3D. La surface de l'élément, en utilisant généralement les pixels du contour.
- **Second moment angulaire de la texture** : L'énergie, également appelée deuxième moment angulaire et uniformité, est une mesure de l'uniformité texturale d'une image. L'énergie atteint sa valeur la plus élevée lorsque la distribution des niveaux de gris a une forme constante ou périodique. Une image homogène contient très peu de transitions de tons de gris dominantes et, par conséquent, la matrice de cooccurrence des niveaux de gris (GLCM) de cette image aura moins d'entrées de grande amplitude, ce qui se traduira par une grande valeur pour la caractéristique d'énergie. En revanche, si la GLCM contient un grand nombre de petites entrées, la caractéristique d'énergie aura une valeur plus faible. Pour plus d'informations, consultez le site <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04151-4>.
- **Contraste de texture** : Mesure des variations locales (voisines) du niveau de gris. Calculée à l'aide d'une matrice de cooccurrence des niveaux de gris. Pour plus d'informations, voir <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04151-4>
- **Entropie de la texture** : Décrit le désordre d'une image et atteint sa plus grande valeur lorsque tous les éléments de l'image sont égaux. Lorsque l'image n'est pas texturalement uniforme, de nombreux éléments de la matrice de cooccurrence des niveaux de gris (GLCM) ont des valeurs très faibles, ce qui implique que l'entropie est très grande. Par conséquent, l'entropie est inversement proportionnelle à l'énergie GLCM. Pour plus d'informations, consultez le site <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04151-4>.
- **Homogénéité de la texture** : elle peut être décrite comme l'inverse du contraste d'une image, car seules les entrées proches de la diagonale de la GLCM (matrice de cooccurrence des niveaux de gris) ont un impact important sur la valeur de l'homogénéité. Plus d'informations sont disponibles sur le site <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04151-4>
- **Volume** : Uniquement disponible pour les ROIs 3D. Le volume donné en unités réelles est calculé à partir des informations sur la taille des pixels de l'image.

- **Yaw (lacet)** : L'angle dans le sens inverse des aiguilles d'une montre de l'axe principal de l'objet sur le plan x-y (autour de l'axe z+) ; il est égal à 0 lorsqu'il est aligné avec l'axe x positif. Voir (https://en.wikipedia.org/wiki/Ship_motions)

5 Estimation de l'âge « Aging analysis »

Ce module est dédié à l'identification de manière semi-automatique des incréments présents sur les otolithes et à la mesure de la distance entre le centre de l'otolithe (noyau) et chaque incrément.

Pour ce faire :

- Traçage d'une ou plusieurs lignes (polylignes ROI) le long de l'axe d'interprétation allant du centre au bord de l'otolithe,
- Utilisation d'un estimateur automatique pour obtenir une première approximation de la position des incréments,
- Ajustement manuel de ces positions
- Génération d'un rapport avec les mesures de distance.

Pour accéder à ce module, cliquez sur l'onglet « Aging analysis » du plugin d'analyse des otolithes. L'interface utilisateur de ce module contient 7 étapes Figure 41:

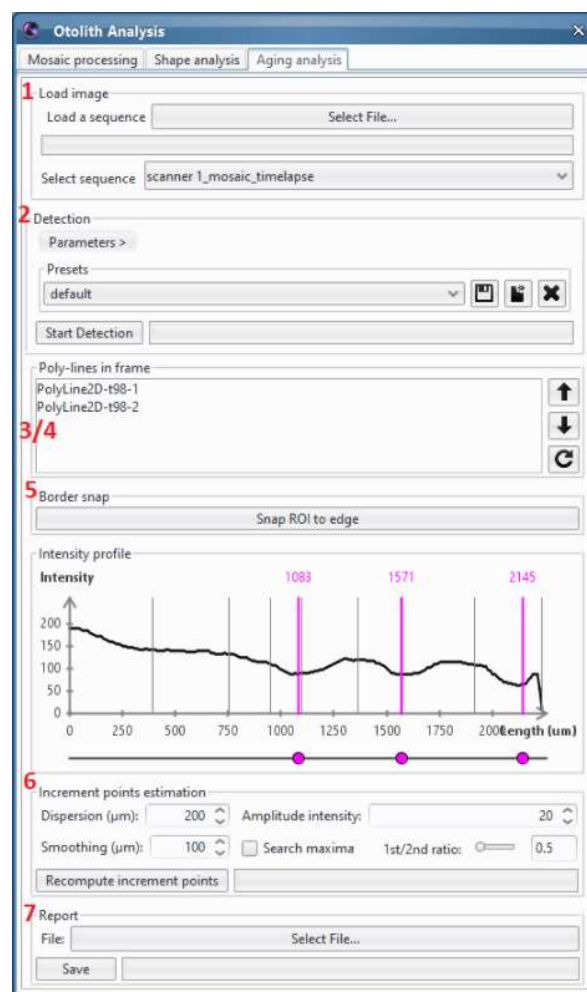


Figure 41 : Fenêtre Aging analysis.

Plus précisément, ces étapes sont :

- 1- « **Load a sequence** » : pour charger une image dans Icy ou, si elle est déjà chargée, sélectionner l'image de la mosaïque avec le menu déroulant Sélectionner la séquence.
- 2- « **Detection** » : Cette étape est facultative si des otolithes ont déjà été détectés sur la séquence.
- 3- « **Poly-lines in frame** » : pour dessiner plusieurs lignes sur chaque otolithe afin d'indiquer l'axe d'interprétation. Cette fenêtre permet aussi de trier les lignes de la plus proche à la plus éloignée du noyau.
- 4- « **Poly-lines sorting** » : pour dessiner plusieurs lignes sur chaque otolithe afin d'indiquer l'axe d'interprétation. Cette fenêtre permet aussi de trier les lignes de la plus proche à la plus éloignée du noyau.
- 5- « **Border snap** » : pour ajuster la ligne sur le bord du ROI de la liste triée à la bordure de l'otolithe.
- 6- « **Intensity profile & Increment points estimation** » : pour estimer les positions des incréments en utilisant le profil d'intensité des lignes dessinées (maxima/minima sur le profil). Les positions peuvent être ajustées manuellement après une première estimation en faisant glisser les points de contrôle (rose) soit sur le profil, soit directement sur l'image.
- 7- « **Report** » : pour créer et sauvegarder un rapport contenant toutes les distances entre les noyaux des otolithes et chaque point d'incrémentation.

Chaque étape sera présentée en détail ci-après.

5.1 « Load a sequence »

Cette première étape est similaire à l'étape 1 des modules 1 et 2. Vous pouvez faire glisser le dossier ou le fichier de l'image cible, et le déposer sur le bouton Select File. La séquence sera chargée et rendue disponible sur une fenêtre de visualisation dans l'espace de travail d'Icy. Si vous avez une séquence timelapse générée dans l'un des modules 1 ou 2 qui est toujours ouverte sur Icy, elle sera automatiquement sélectionnée comme séquence cible pour ce module (« Load image »). Si l'image est déjà chargée, elle peut être sélectionnée à l'aide du menu déroulant Sélectionner la séquence. Veuillez vous assurer que la séquence souhaitée est correctement sélectionnée (Figure 24).

5.2 « Detection »

Cette étape est exactement la même que celle de l'étape de détection du module 2. Si vous avez déjà effectué cette étape, vous pouvez sauter celle-ci. Sinon, veuillez-vous référer à la section Étape 2 du module 2. Améliorer les détections ou générer des détections fines pour plus d'informations sur la façon de détecter correctement les otolithes sur votre image (« Detection »).

5.3 « Poly-lines in frame »

Dans cette étape, vous pouvez dessiner un ou plusieurs chemins depuis le noyau de l'otolithe jusqu'à sa bordure (suivant l'axe de lecture défini) en utilisant l'outil ROI poly-ligne. Ces axes seront utilisés pour estimer la position des points d'incrément dans les étapes suivantes.

Tout d'abord, sélectionnez l'image sur laquelle vous voulez travailler dans la séquence. Ensuite, sélectionnez l'onglet Région d'intérêt dans le menu du ruban supérieur d'Icy, et cliquez sur le bouton Polyline 2D. Vous pouvez maintenant dessiner une polyligne ROI point par point. Cliquez sur l'image pour ajouter des points. Appuyez sur la touche Echap pour arrêter le dessin. Pour dessiner plusieurs lignes sans cliquer à chaque fois sur le bouton Polyline 2D : maintenez la touche contrôle enfoncée, cliquez une fois sur le bouton Polyline 2D, cliquez (à gauche) sur l'image pour dessiner la première ligne, cliquez à droite pour arrêter de dessiner la première ligne (un menu déroulant apparaît, ignorez-le), puis cliquez (à gauche) à nouveau sur l'image pour commencer une deuxième ligne, etc. Relâchez la touche de contrôle et appuyez sur Echap lorsque vous avez terminé la dernière ligne (Figure 42).

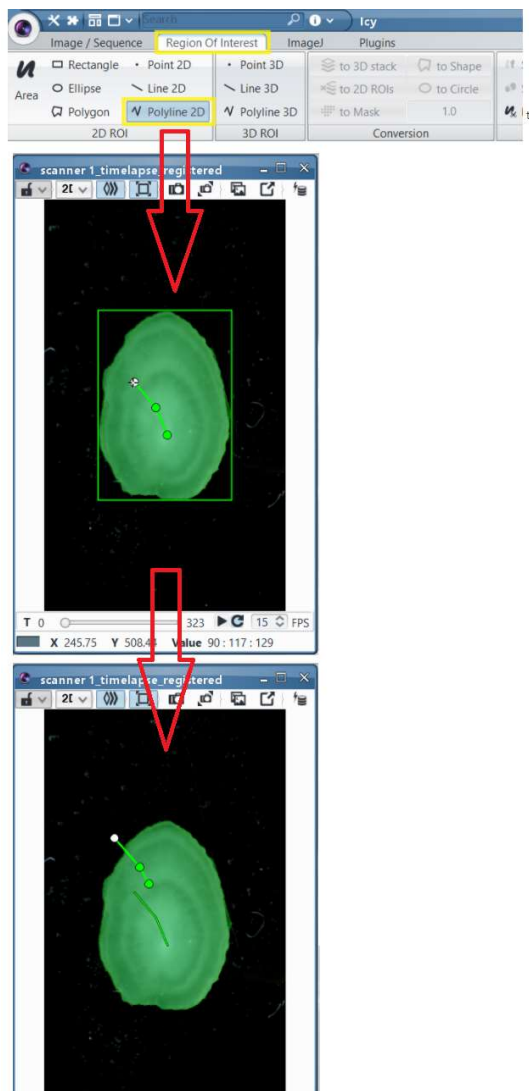




Figure 42: Exemple de réalisation d'un axe d'interprétation.


Vous pouvez modifier les ROIs de polygones (axe d'interprétation) déjà créés, il suffit de sélectionner le ROI cible, de maintenir la touche Ctrl enfoncée et d'ajouter des points à la ligne. Pour supprimer des points d'une polygone ROI existante, sélectionnez la ROI et déplacez le curseur sur le point que vous souhaitez supprimer (il doit devenir blanc), puis appuyez sur la touche Suppr pour supprimer ce point.

 Note : Veuillez tracer les lignes en partant du point le plus proche du noyau. Chaque nouveau point doit être situé plus loin du centre de l'otolithe que le précédent. Sinon, le profil d'intensité fournira des informations incorrectes.

 Note : pour supprimer des points des polygones, sélectionnez la ROI de la polygone en cliquant dessus, et déplacez le curseur de la souris sur le point à supprimer. Lorsque le point devient blanc, appuyez sur la touche Suppr pour le supprimer. Si vous faites une erreur, utilisez Ctrl+Z pour annuler l'opération.

5.4 « Poly-lines in frame & Poly-lines sorting »

Dans le cas où vous n'avez pas dessiné les polygones du plus proche au plus éloigné du noyau de l'otolithe au bord, ou si l'ordre actuel n'est pas correct lors du rafraîchissement de la liste ; les boutons de tris permettent de placer les lignes correctement ordonnées pour les analyser. La liste doit être réorganisée de manière à ce que la première polygone soit la plus proche du noyau de l'otolithe et que la dernière soit à la limite de l'otolithe (Figure 43).

D'abord, cliquez sur le bouton Rafraîchir  la liste à droite de la liste des polygones. La liste sera rafraîchie et affichera toutes les polygones ROIs dessinées dans l'image actuelle de la séquence cible.

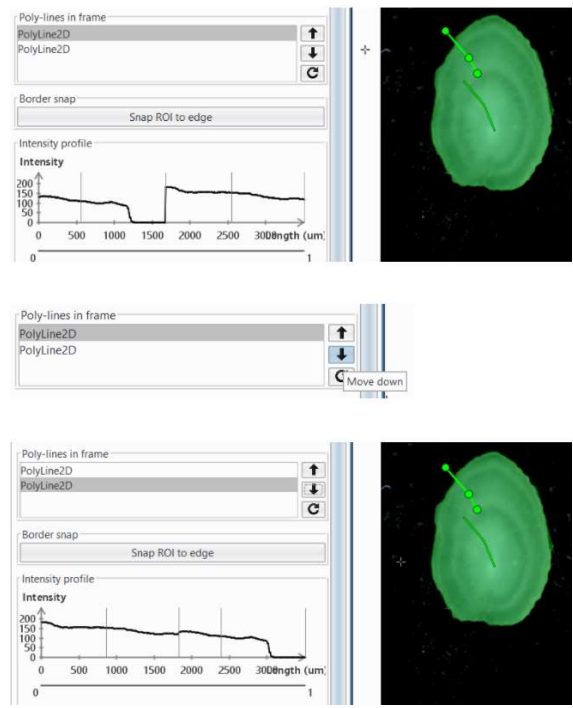


Figure 43: Exemple d'ordonnement d'une axe de lecture multiple.

⚠ S'il existe des ROIs de polylignes vides ou à point unique, un message d'erreur s'affiche : "La liste des ROIs de la polyligne cible contient un ou plusieurs ROIs vides ou à point unique" Cela se produit parce que ces ROIs ne sont pas supportés par ce module, seules les polylignes avec plus d'un point de contrôle sont acceptées. Si cela vous arrive, supprimez tous les ROIs vides ou à point unique et réessayez.

5.5 « Border snap »

Une fois que toutes les lignes sont triées, cliquez sur le bouton Snap ROI to edge pour ajuster la longueur de la dernière ROI de la liste (la plus proche du bord de l'otolithe).

L'ajustement au bord du ROI le plus proche du bord (axe de lecture) fonctionne de deux façons. Soit le dernier point est situé à l'intérieur de l'otolithe, dans ce cas la ligne est étendue pour atteindre le bord; soit le dernier point est situé à l'extérieur de l'otolithe, dans ce cas la ligne est tronquée au point d'intersection avec le bord de l'otolithe.

⚠ Si aucune polyligne ROI n'est présente sur le cadre actuel de l'otolithe et que vous essayez d'accrocher une ROI, un message d'erreur sera affiché : "Aucune poly-ligne détectée sur le cadre actuel".

Dans l'image ci-dessous, un exemple d'accrochage est présenté. La ligne est tronquée car le dernier point est situé en dehors de l'otolithe (Figure 44).

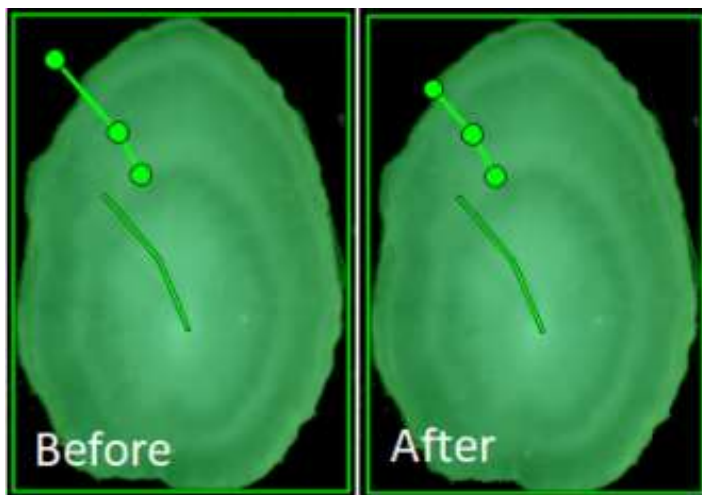


Figure 44: Exemple d'un axe de lecture tronquée au bord de l'otolithe.

5.6 « Intensity profile & Increment points estimation »

Une fois que toutes les lignes sont ordonnées de la plus proche à la plus éloignée du noyau et que la ligne la plus éloignée est fixée au bord, les points d'incrémentation peuvent être approximés sur le profil d'intensité. Le profil d'intensité montre de manière ordonnée toutes les intensités de l'image à chaque point des lignes tracées. Dans cette étape, un estimateur recherche les minima/maxima locaux et détecte ces points comme points d'incrément. Les détections peuvent ensuite être ajustées manuellement.

Pour estimer l'emplacement des points d'incrémentation, les paramètres suivants doivent être spécifiés (Figure 45):

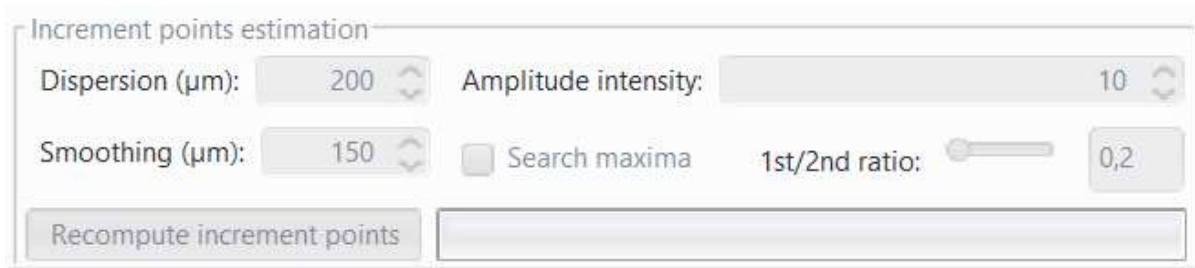


Figure 45: Paramétrage de l'auto détection des anneaux.

- « **Dispersion (um)** » : Indique la distance minimale (en micromètres) autorisée entre deux incréments sur la ligne de profil. En coulisses, ce paramètre applique un filtre gaussien au profil d'intensité pour le lisser et supprimer les hautes fréquences (c'est-à-dire les petits points extrema locaux).
- « **Amplitude intensity** » : Indique la différence d'intensité minimale requise entre les points minima et maxima locaux voisins pour considérer un point comme "point d'incrémentation".
- « **Smoothing (um)** » : lissage du profil d'intensité.
- « **Search maxima** » : Indique si les points d'incrément sont situés à des positions d'intensité maximale (points les plus clairs sur la ligne), ou à des positions d'intensité minimale (points les plus sombres sur la ligne).
- « **1st/2nd ratio** » : Dicte le rapport de distance minimum entre la distance du noyau au premier point détecté et la distance du premier point détecté au second point détecté. Cette valeur est uniquement utilisée pour influencer l'emplacement du premier point d'incrémentation. Une valeur égale ou supérieure à 1 signifie que la deuxième distance doit être au moins aussi longue que la première. Une valeur inférieure à un signifie que la première distance peut être plus petite que la seconde selon le rapport donné.

Lorsque les paramètres sont définis, cliquez sur le bouton Recalculer les points d'incrément pour estimer l'emplacement des points d'incrément (Figure 46).

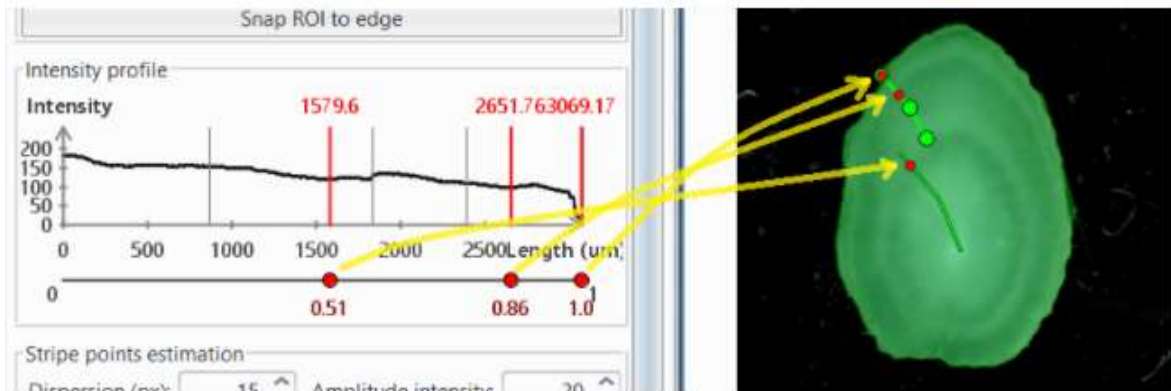


Figure 46 : Exemple d'auto estimation des structures.

Une fois les points d'incrémentation calculés, vous pouvez les déplacer de manière interactive, soit sur le panneau du profil d'intensité en utilisant les points rouges sous la courbe, soit directement sur l'image en faisant glisser les points rouges le long des polygones.

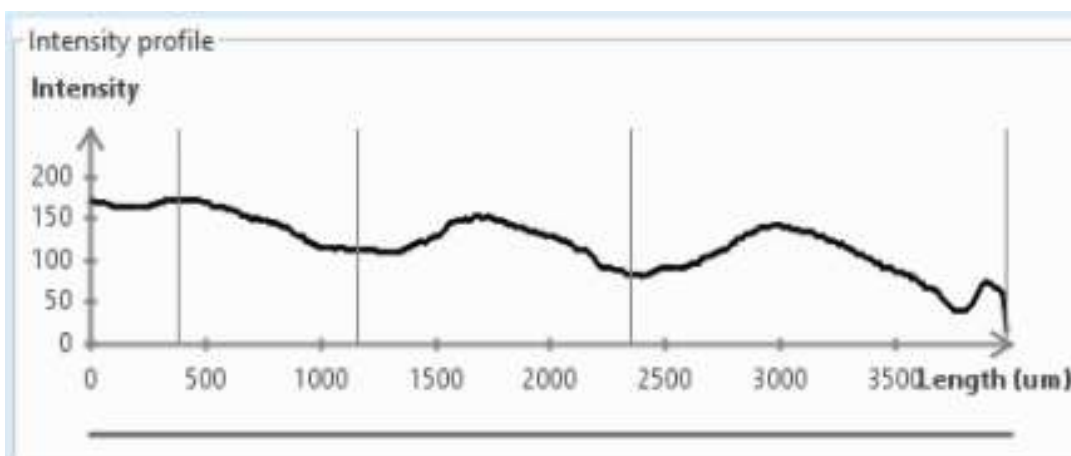


Note : vous pouvez ajouter ou supprimer des points d'incrémentation à la fois sur le panneau de profil et sur l'image. Pour ajouter un point sur le panneau du profil, maintenez la touche Ctrl enfoncée et cliquez (gauche) à l'endroit souhaité sur la ligne noire sous le graphique du profil. Pour ajouter un point sur l'image, maintenez la touche Ctrl enfoncée et cliquez à l'endroit souhaité sur la polygone. Si un point existe déjà à cette position, il sera supprimé.

Cette procédure peut être répétée pour chaque otolithe (chaque image) de la séquence.

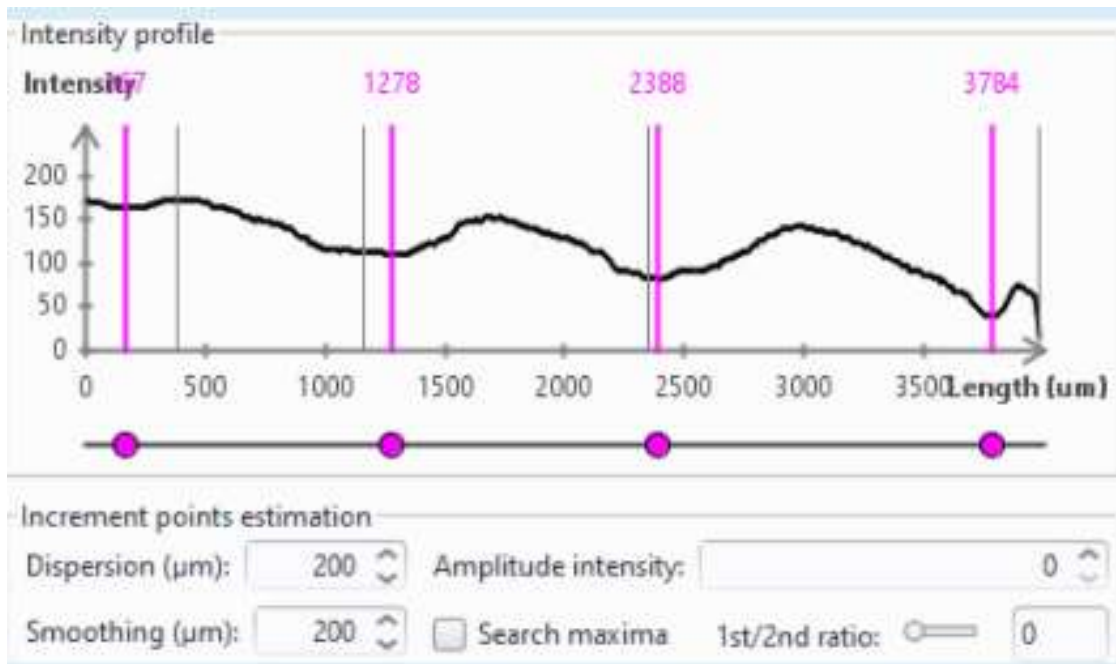
5.6.1 Focus sur le paramètre « 1st/2nd ratio ».

Pour comprendre le paramètre du 1er au 2ème rapport, prenons l'exemple de profil suivant :

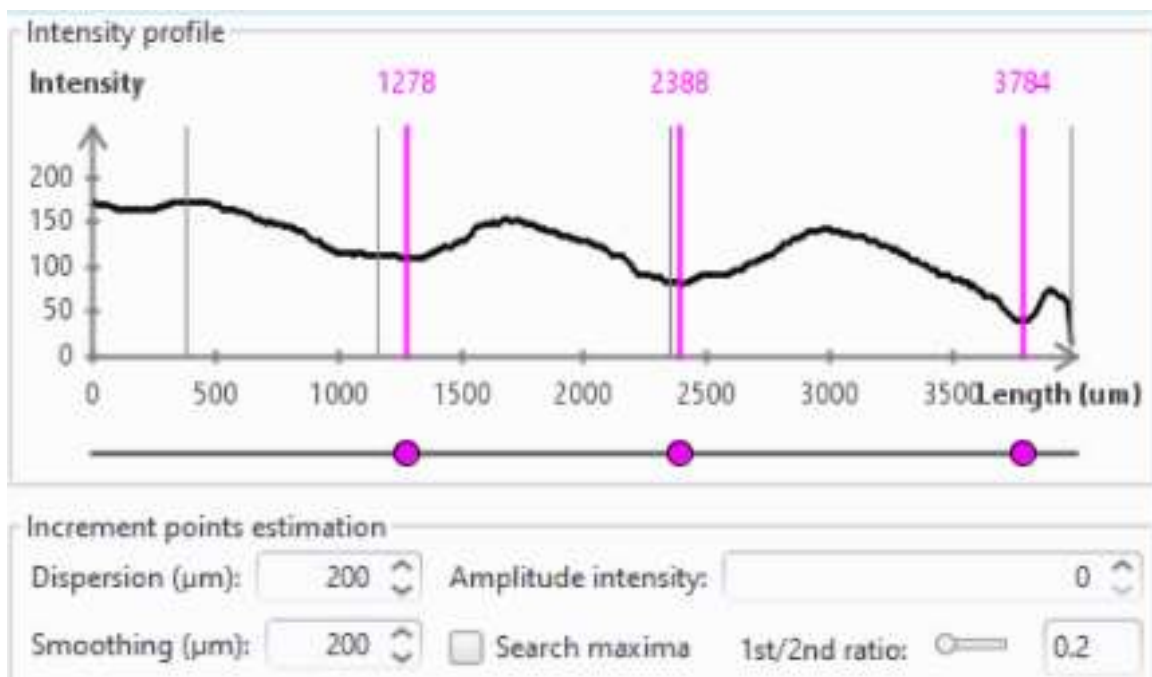


Nous nous attendrions probablement à 3 incréments pour ce profil.

Cependant, avec le paramètre de rapport réglé sur 0, le résultat est de 4 incréments. Ceci est dû au fait qu'il y a un minimum local près de la distance d'origine (à 167 µm).



Avec le paramètre 1st to 2nd ratio, vous pouvez vous assurer que la distance entre l'origine et le 1er incrément détecté est au moins un rapport donné, proportionnel à la distance entre le 1er et le second incrément. Dans le cas de cet exemple, un rapport fixé à 0,2 (la distance du 1er incrément au 0 doit être au moins égale à 20% de la distance entre le 1er et le second incrément) est suffisant pour filtrer l'incrément indésirable.



5.7 « Report »:

La longueur totale de la trajectoire dessinée, ainsi que la position de chaque point d'incrémentation pour chaque otolithe analysé peuvent être enregistrées dans un rapport à l'aide du dernier panneau (Figure 47).

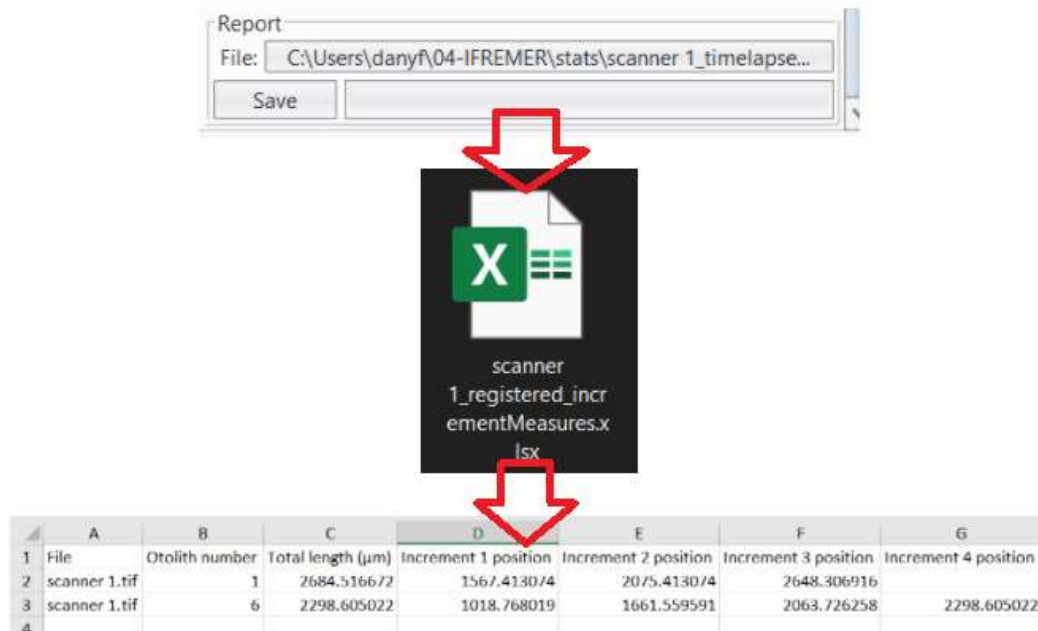


Figure 47 Processus de sauvegarde des mesures inter anneaux.

Par défaut, le rapport est enregistré avec un suffixe "_incrementMeasures" dans un dossier stats (même répertoire que le fichier de mesures de forme) situé dans le dossier de la séquence d'entrée.

Pour vérifier l'emplacement d'enregistrement du rapport, passez la souris sur le chemin du fichier à côté de File . Pour modifier l'emplacement d'enregistrement, cliquez sur le chemin et sélectionnez un nouveau dossier pour enregistrer les résultats de l'enregistrement.

Cochez le chemin pour enregistrer le fichier de sortie, puis cliquez sur le bouton Enregistrer pour créer et enregistrer le rapport. La progression de l'enregistrement peut être suivie sur la barre de progression située à côté du bouton.

Lorsque l'enregistrement est terminé, le fichier est disponible à l'emplacement indiqué.

Le rapport contient, pour chaque otolithe : le fichier image original, le numéro de l'otolithe, la longueur totale de la ligne de profil et la distance entre les nucléus et chaque incrément. Ces mesures sont exprimées en micromètres.

Table des illustrations

| | |
|--|----|
| Figure 1: Recherche et installation de plugin | 4 |
| Figure 2: Augmentation mémoire RAM pour Icy | 5 |
| Figure 3: Paramétrer les mises à jour automatiques d'Icy | 6 |
| Figure 4: Emplacement du plugin "IfremerAquisition" | 7 |
| Figure 5: Ecrans à l'ouverture du plugin "IfremerAcquisition" | 7 |
| Figure 6 : Fenêtre Micro-Manager For Icy | 8 |
| Figure 7: Fenêtre Ifremer - acquisition | 9 |
| Figure 8: Acquisition standard | 9 |
| Figure 9: Fenêtre acquisition multiple | 10 |
| Figure 10: Fenêtre Multi - Dimensional Acquisition | 10 |
| Figure 11: Fenêtre Stage Position list | 11 |
| Figure 12: Ecran démarrage acquisition multiple après programmation..... | 11 |
| Figure 13: Exemple d'image type provenant d'un scanner. | 13 |
| Figure 14: Fenêtre du plugin OtolithAnalysis | 14 |
| Figure 15: Téléchargement d'une image mosaïque..... | 15 |
| Figure 16: Gestion des paramètres de détection d'otolithes. | 16 |
| Figure 17 : Fenêtre de vérification et configuration de la taille d'un pixel..... | 17 |
| Figure 18: Détection des Regions Of Interest (ROI)..... | 18 |
| Figure 19 : Suppression de détections ROIs non souhaitées. | 19 |
| Figure 20 Paramétrage de la grille de découpe de l'image global | 20 |
| Figure 21: Image mosaic (à gauche) et timelapse (à droite). | 21 |
| Figure 22 : Exemple de dossier sauvegardé..... | 22 |
| Figure 23 : Onglet Shape analysis. | 23 |
| Figure 24: Vérification de la séquence sélectionné..... | 24 |
| Figure 25: Ouverture du protocole de groupement d'images..... | 25 |
| Figure 26: Modification des paramètres d'entrée et lancement du protocole..... | 25 |
| Figure 27 : Différence de segmentation en fonction des onglets..... | 26 |
| Figure 28 Comparaison d'une segmentation pour analyses de forme..... | 27 |
| Figure 29 : Déverrouiller un ROI voulu..... | 27 |
| Figure 30: Illustration de l'enlèvement de pixels sur le bord d'une ROI..... | 28 |
| Figure 31 : Exemple d'image n'ayant pas conservé sa taille original..... | 30 |
| Figure 32 : Exemple d'un timelapse ayant eu un flip (effet miroir) sur l'ensemble des images.... | 30 |
| Figure 33 Exemple d'un timelapse ayant conservé la taille original..... | 31 |
| Figure 34 : Exemple de rotation manuel..... | 31 |
| Figure 35: Exemple d'une séquence de rotation manuel..... | 32 |
| Figure 36: Création d'une séquence binarisée. | 33 |
| Figure 37: Fenêtre de création d'un rapport d'analyses..... | 34 |
| Figure 38: Descripteurs de forme des ROIs. | 34 |
| Figure 39 : Obtention du rapport d'analyses. | 35 |
| Figure 40: Exemple de rapport d'analyses..... | 35 |
| Figure 41 : Fenêtre Aging analysis. | 39 |
| Figure 42: Exemple de réalisation d'un axe d'interprétation. | 41 |
| Figure 43: Exemple d'ordonnancement d'une axe de lecture multiple. | 42 |
| Figure 44: Exemple d'un axe de lecture tronquée au bord de l'otolithe..... | 43 |
| Figure 45: Paramétrage de l'auto détection des anneaux..... | 44 |
| Figure 46 : Exemple d'auto estimation des structures. | 45 |

Figure 47 Processus de sauvegarde des mesures inter anneaux 47