



HAL
open science

Des développements méthodologiques en imagerie à l'Inra

Jean-Marie Bonny, Marie Huyez-Levrat

► **To cite this version:**

Jean-Marie Bonny, Marie Huyez-Levrat. Des développements méthodologiques en imagerie à l'Inra. Cahier des Techniques de l'INRA, N° Spécial: Imagerie, 2009. hal-02655978

HAL Id: hal-02655978

<https://hal.inrae.fr/hal-02655978v1>

Submitted on 19 Nov 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

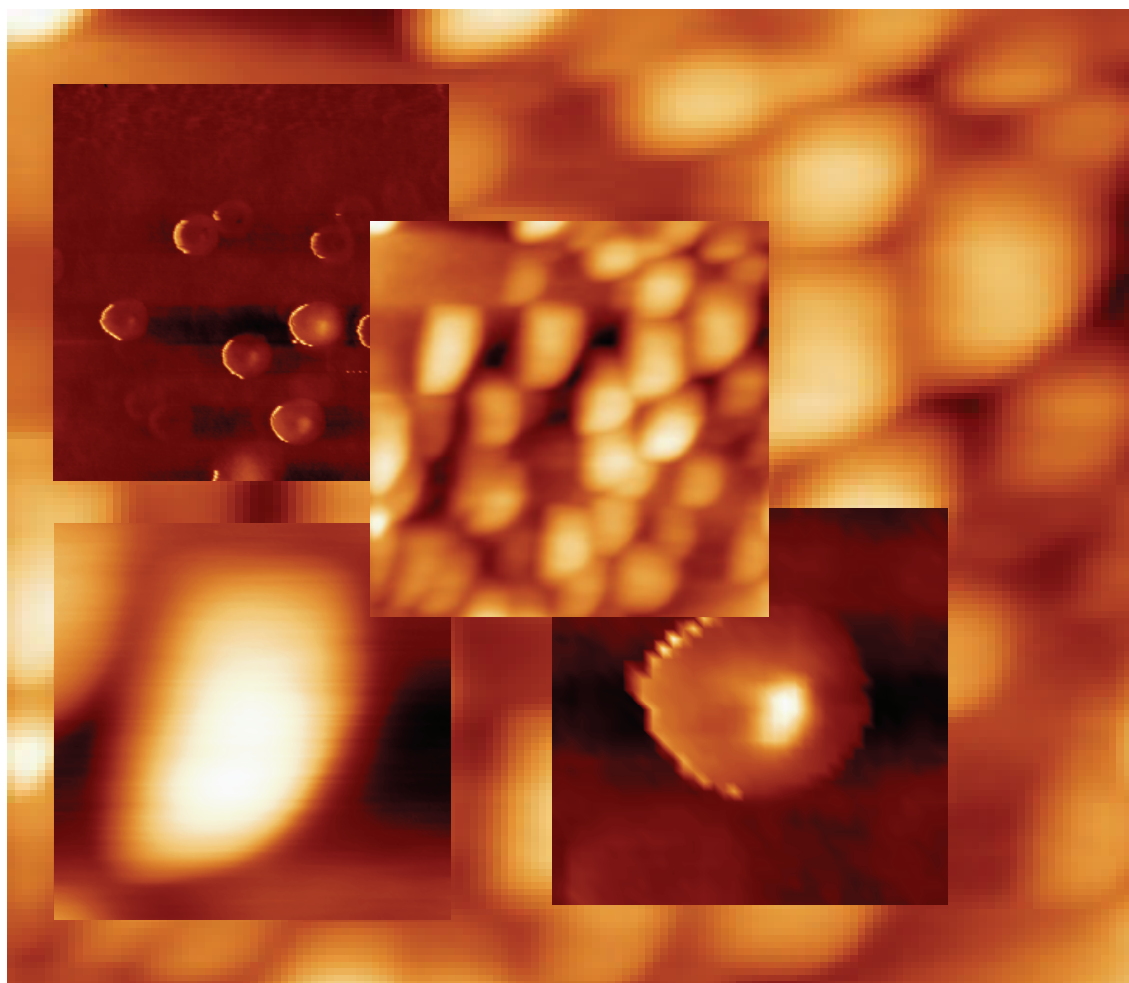


Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

Le Cahier des Techniques de l'Inra



Des développements
méthodologiques
en imagerie à l'Inra



Délégation au Partenariat avec les Entreprises

Institut National de la Recherche Agronomique - 147 rue de l'Université - F-75338 Paris Cedex 07

Des développements méthodologiques en imagerie à l'Inra

Numéro spécial 2009

*Collectif*¹

Responsable scientifique : Jean-Marie Bonny²

Coordonnatrice : Marie Huyez-Levrat³

Sommaire

Titres des articles	p. 02
Préface	p. 03
Chapitre I : Préparation et mise sous contrainte de l'échantillon	p. 05
Chapitre II : Mise au point de protocoles d'acquisition	p. 43
Chapitre III : Analyse d'images	p. 91
Index des auteurs	p. 127

Cet ouvrage est téléchargeable à partir du site de l'Inra

https://intranet.inra.fr/cahier_des_techniques

¹ Le *Cahier des Techniques de l'Inra* est une publication destinée à échanger des méthodes et des savoir-faire. Ce n'est pas une revue à Comité de lecture. Les auteurs sont seuls responsables de leurs textes.

² UR370 Qualité des produits animaux, QuaPA - Structures tissulaires et interactions moléculaires, STIM
INRA - F-63122 Saint Genès Champanelle ☎ 04 73 62 41 52 ✉ jean-Marie.Bonny@clermont.inra.fr

³ UAR1185- Délégation au partenariat avec les entreprises DV/DPE - INRA - F-75338 Paris Cedex 07
☎ 01 42 75 91 65 ✉ marie.huyez@paris.inra.fr

Index des articles

Chapitre 1 - Préparation et mise sous contraintes de l'échantillon

- 7 Détection semi-automatique de cellules de fruits charnus observés par microscopie confocale 2D et 3D, *David Legland et Marie-Françoise Devaux*
- 17 Suivi de la modification des architectures 3D de biopolymères sous sollicitations mécaniques, *Christine Delisée, Jérôme Malvestio et Jérôme Lux*
- 23 Essais mécaniques sous microscope, *Patrice Marchal*
- 35 Réalisation d'une cellule d'imagerie multimodale, *Abdlatif Ben Moussa et Jean-Marie Bonny*

Chapitre 2 - Mise au point de protocoles d'acquisition

- 45 Caractérisation d'émulsions et de suspensions par analyse d'images vidéo, *Bruno Novales, Patrice Papineau, Alain Sire et Monique Axelos*
- 51 Suivi de fermentation de la pâte à pain par imagerie, *Anne-Laure Réguerre, Hubert Chiron, Aomir Shehzad et Guy Della Valle*
- 63 Association d'un microscope à un système de capture d'image : Analyse d'images par le logiciel ImageJ, *Christel Le Bon, Céline Boulard et Pascale Jolivet*
- 69 Imagerie RMN *in utero* pour la détection non invasive de l'hypoxie aigüe sur modèle ratte, *Guy Bielicki, Cécile Keller et Amidou Traoré*
- 75 Mesure de couleur des végétaux, *Éric Pietri, Patrice Reling*
- 81 Étude par microscopie à force atomique de l'organisation cœur-couronne de nanoparticules hétéroxylanes-lignine de synthèse modèles des parois végétales lignifiées, *Cédric Gaillard et Bernard Cathala*

Chapitre 3 - Analyse d'images

- 93 Macrovision et analyse granulométrique en niveaux de gris pour l'analyse histologique de tissus végétaux, *Marie-Françoise Devaux, Alain Sire et Patrice Papineau*
- 101 Méthode de suivi de la taille de particules de caillé dans le lactosérum pendant le processus de fabrication fromagère, *Hervé Guillemain, Thomas Cattenoz et Bruno Perret*
- 115 Recalage d'images multimodales : approche méthodologique et application aux images de muscles bovins acquises par auto fluorescence et par résonance magnétique nucléaire, *Frédéric Peyrin, Jean-Marie Bonny*

Préface

L'imagerie recouvre un ensemble de techniques qui caractérisent la morphologie, la nature et l'agencement des constituants de la matière. Du fait des développements méthodologiques actuels le potentiel de l'imagerie s'est considérablement accru en termes d'échelle, de sensibilité, de spécificité, de caractérisation non destructive et de quantification. L'imagerie joue un rôle croissant dans les recherches pour autant, la conduite d'une expérience d'imagerie n'est pas triviale. Elle requiert généralement trois phases :

- **la préparation et mise sous contraintes de l'échantillon.** L'objectif est d'adapter l'objet d'étude aux contraintes expérimentales des modalités d'imagerie utilisées et, le cas échéant, de soumettre cet objet à des sollicitations externes - mécaniques, chimiques ou thermiques - afin d'analyser leur impact sur la structure ;
- **la mise au point de protocoles d'acquisition.** Il s'agit de mettre en œuvre les dispositifs expérimentaux et d'optimiser le protocole de mesure pour obtenir des images adaptées à l'objet d'étude et à la question de recherche ;
- **l'analyse d'images.** Cette phase consiste à extraire l'information pertinente des images numériques. L'analyse d'images constitue une discipline scientifique à part entière qui fait appel à des outils extrêmement divers. Son importance et sa difficulté sont généralement sous-estimées, ce qui limite d'autant le débit et la pertinence d'une expérience d'imagerie.

Ce numéro spécial du *Cahier des Techniques de l'Inra* est organisé de façon à expliciter chacune de ces trois phases à partir d'exemples de réalisations menées principalement dans des équipes des départements Caractérisation et élaboration des produits issus de l'agriculture (CEPIA), Ecologie des forêts, prairies et milieux aquatiques (EFPA). Ce numéro n'est pas exhaustif, ni en termes de techniques d'imagerie ni en termes d'objets étudiés. Il met l'accent sur leur diversité et leur complexité et souligne le poids des développements méthodologiques pour adapter nos équipements d'imagerie à nos questions de recherche, en particulier sur les produits agricoles.

Je tiens à remercier chaleureusement les membres *Transversalité « Imagerie »* (cf. p.4) qui regroupe des spécialistes de différents départements de l'Inra : Alimentation humaine (AlimH), Caractérisation et élaboration des produits issus de l'agriculture (CEPIA), Ecologie des forêts, prairies et milieux aquatiques (EFPA), Mathématique et informatique appliquées (MIA), Physiologie animale et chaîne d'élevage (PHASE), et, également des experts du CNRS et Universitaires. Ils ont accompli un important travail de sélection, de relecture et d'accompagnement des auteurs, qui a permis d'harmoniser les articles et d'introduire pour chacun une dimension prospective dans ce domaine en constante évolution.

Enfin, je remercie évidemment les auteurs qui se sont investis avec beaucoup d'énergie pour arriver à un tel résultat.

Jean-Marie Bonny
Animateur de la *transversalité imagerie* CEPIA

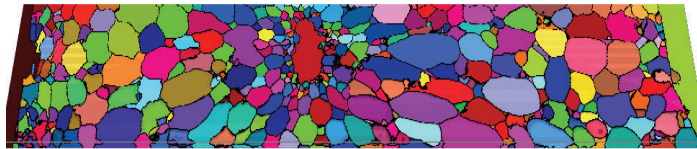
Relecteurs

Membres de la transversalité « imagerie »

Nom	Prénom	affectation
Andrey	Philippe	UMR1197 Neurobiologie de l'olfaction et de la prise alimentaire - INRA- F-78352 Jouy-en-Josas ✉ philippe.andrey@jouy.inra.fr
Badel	Eric	UMR547 Physique et physiologie intégratives de l'arbre fruitier et forestier - INRA - F-63100 Clermont-Ferrand ✉ eric.badel@clermont.inra.fr
Barra	Vincent	ISIMA - LIMOS - UMR CNRS 6158 - Campus Scientifique des Cèzeaux - F-63177 Aubière cedex - ✉ Vincent.Barra@isima.fr
Bonny	Jean-Marie	UR370 Qualité des produits animaux STIM - INRA - F-63122 Saint Genès Champanelle ✉ jean-Marie.Bonny@clermont.inra.fr
Burguet	Jasmine	UMR1197 Neurobiologie de l'olfaction et de la prise alimentaire - INRA- F-78352 Jouy-en-Josas ✉ Jasmine.Burguet@jouy.inra.fr
Clément	Alain	Laboratoire d'ingénierie des systèmes automatisés (EA 4094) Institut universitaire de technologie - F-49016 Angers ✉ alain.clement@univ-angers.fr
Devaux	Marie-Françoise	UR1268 Biopolymères, interactions assemblages - INRA F-44316 Nantes ✉ marie-francoise.devaux@nantes.inra.fr
Kiêu	Kiên	UR341 Mathématiques et informatique appliquées - INRA – F-78352 -Jouy en Josas ✉ Kien.Kieu@jouy.inra.fr
Legland	David	UMR782 Génie et microbiologie des procédés alimentaires - INRA F-78850 Thiverval-Grignon ✉ david.legland@grignon.inra.fr
Lehmann	Gaétan	UMR1198 Biologie du développement et reproduction -INRA- F-78352 Jouy-en-Josas ✉ Gaetan.Lehmann@jouy.inra.fr
Maurin	Yves	UMR1197 Neurobiologie de l'olfaction et de la prise alimentaire INRA - F-78352 Jouy-en-Josas ✉ yves.maurin@jouy.inra.fr
Sarry	Laurent	ER Imagerie Médicale, Centre International de Chirurgie Endoscopique (ERIM-CENTI), Université d'Auvergne Clermont1, F-63001 Clermont-Ferrand ✉ Laurent.Sarry@u-clermont1.fr

Chapitre I

Préparation et mise sous contraintes de l'échantillon



Détection semi-automatique de cellules de fruits charnus observés par microscopie confocale 2D et 3D

David Legland¹, Marie-Françoise Devaux²

Résumé : *Les propriétés mécaniques et sensorielles des fruits charnus tels que la pomme ou la tomate sont étudiées en regard de la taille, de la forme, et de l'organisation spatiale des cellules des tissus constituant le fruit. La microscopie confocale permet d'observer les cellules en 2 ou 3 dimensions et l'analyse d'images offre des outils pour décrire la structure cellulaire en mesurant rapidement des paramètres morphologiques variés (taille, forme, orientation...) sur les cellules. Pour mesurer ces paramètres de manière automatique, il est d'abord nécessaire de détecter précisément l'emplacement des cellules et/ou leurs contours. La méthode proposée ici est une chaîne de traitements d'images dont l'objectif est d'identifier les cellules dans des images microscopiques 2D ou 3D. La chaîne de traitement se décompose en une procédure automatique de recollage des images pour agrandir le champ de vue, une étape de filtrage directionnel de l'image pour mettre en valeur les parois tout en réduisant le bruit, et une étape de segmentation qui délimite les contours de chaque cellule. Les différents traitements ont été implémentés sous la forme de fonctions Matlab. Afin de faciliter leur manipulation, des interfaces graphiques conviviales ont été créées. De plus, une attention particulière a été portée à l'automatisation des traitements, afin de traiter des collections d'images avec les mêmes paramètres.*

Mots clés : Structure cellulaire, analyse d'images, morphologie mathématique, ligne de partage des eaux, filtrage directionnel, collections d'images

Introduction

Les fruits charnus tels que la pomme ou la tomate ont un grand intérêt économique du fait de leur large consommation. Leurs propriétés mécaniques (résistance aux chocs, fermeté...) ainsi que sensorielles (croquant, jutosité...) dépendent en grande partie de la composition physico-chimique au sein du fruit, mais la structure cellulaire des différents tissus semble aussi jouer un rôle. Cette structure cellulaire peut être décrite par la taille, la forme, et l'organisation spatiale des cellules constituant les différents tissus. Notre objectif est de quantifier cette structure cellulaire à partir d'images numériques de tissus végétaux. Pour cela, la première étape est d'identifier les différentes cellules dans les images.

La microscopie confocale est couramment utilisée pour observer les tissus végétaux. Pour des fruits tels que la tomate ou la pomme, le diamètre des cellules peut atteindre 1 mm (Devaux *et al.*, 2008).

¹ Inra UMR782 Génie et Microbiologie des procédés alimentaire - GMPA - 78850 Thiverval-Grignon
☎ 01 30 81 52 54 ✉ David.Legland@grignon.inra.fr

² Inra UR1268 Biopolymères, interactions assemblages – URBIA – 44316 Nantes

Sur une image en grossissement $\times 10$, on observe plusieurs cellules, ainsi que d'éventuels espaces intercellulaires (**figure 1**). Par l'acquisition de plusieurs plans optiques, on accède en partie à la structure 3D des cellules (Gray, 1999).

En revanche, les variations de la structure cellulaire en fonction de la position dans le fruit sont en général peu visibles du fait de la faible étendue du champ de vue. De plus, peu de cellules sont entièrement visibles dans les images 3D : dans le cas de la tomate, l'épaisseur visible est au mieux de $200\ \mu\text{m}$, ce qui est nettement insuffisant pour observer les plus grandes cellules.

L'analyse automatique d'images 2D ou 3D à l'aide de logiciels spécialisés donne rapidement un grand nombre de paramètres décrivant la morphologie des cellules (taille, forme, orientation...). La mesure de ces paramètres nécessite tout d'abord d'identifier dans l'image quels sont les pixels (*picture element*) ou voxels (*volume element*, équivalent des pixels pour les images 3D) qui appartiennent aux cellules, à leurs parois ou aux espaces intercellulaires. Cette identification, appelée *segmentation* de l'image, repose sur une chaîne de traitement d'images, comprenant plusieurs étapes.

Dans le cas des fruits charnus, trois étapes ont nécessité des développements spécifiques. Tout d'abord, afin de mieux appréhender l'organisation cellulaire, plusieurs images ont été recollées sous la forme d'images mosaïques afin d'augmenter le champ de vue.

Classiquement, la segmentation des images est réalisée par seuillage des niveaux de gris. Cette procédure nécessite un contraste homogène entre cellules et parois ce qui n'est généralement pas le cas. Une solution alternative et très performante consiste à utiliser la procédure de *ligne de partage des eaux*, un outil issu de la morphologie mathématique particulièrement adapté aux matériaux cellulaires. La méthode étant très sensible au bruit contenu dans les images, une étape de filtrage est souvent nécessaire. Dans le cas des tissus végétaux, les parois ont une épaisseur très fine comparable à la dimension du bruit. Un *filtrage directionnel* des images est proposé pour éliminer le bruit tout en préservant les parois.

L'ensemble de ces outils a été mis au point sous Matlab® (The MATHWORKS, USA), ou sous la forme d'exécutable, avec l'objectif d'être générique : application à des images de différents tissus, en 2D ou en 3D. Des *interfaces utilisateur* conviviales ont été développées pour faciliter leur utilisation.

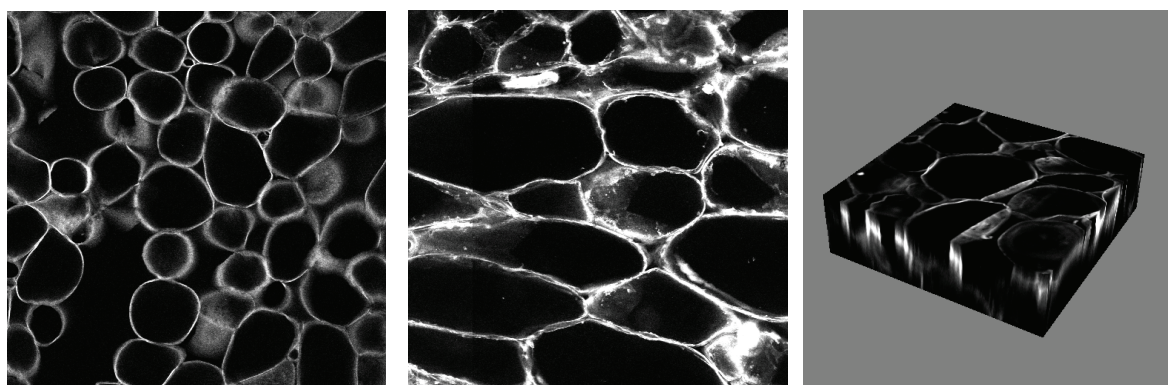


Figure 1 : acquisitions d'images : de pomme (à gauche) et de tomate (au centre). Le champ de vue de chaque image était de $1,28\ \text{mm}$ de côté. A droite, représentation d'une pile d'image 3D

1. Echantillons

1.1 Préparation des coupes

Des images exemples de pomme et de tomate sont utilisées pour illustrer les traitements. Le même protocole d'acquisition d'images a été utilisé pour les pommes et les tomates. Des prélèvements cylindriques sont effectués dans les fruits à l'emporte-pièce (diamètre 15 mm). La manière dont les cylindres sont prélevés dépend de l'information recherchée (position ou orientation dans le fruit). Dans cet article, l'analyse d'image est présentée pour une image de pomme acquise dans la région équatoriale du fruit, et pour une image de tomate acquise à une position choisie aléatoirement à la surface. Dans les deux cas, l'image est perpendiculaire à la surface du fruit. Une coupe d'une épaisseur de 200 microns pour la pomme et de 400 microns pour la tomate, a été prélevée dans chaque cylindre, en utilisant un microtome à lame vibrante (MICROM, HM 650 V). Chaque coupe a été colorée à l'orangé d'acridine, puis rincée à l'eau.

1.2 Acquisition des images

Les images ont été acquises avec un microscope confocal Zeiss LSM410 équipé d'un objectif à air $\times 10$ avec une ouverture numérique de 0,5. L'épaisseur de la section optique dans ces conditions est de $7,5 \mu\text{m}$. La longueur d'onde d'excitation était de 488 nm, et la lumière émise à des longueurs d'onde supérieures à 515 nm a été collectée en utilisant un filtre passe long. Le microscope permet de numériser chaque image sous la forme d'un tableau de pixels de taille 512×512 , avec des niveaux de gris codés entre 0 (noir) et 255 (blanc). La résolution était de $2,5 \mu\text{m}$, ce qui correspond à des images de $1,28 \times 1,28 \text{ mm}$. Dans le cas des tomates, plusieurs coupes optiques, distantes de $7,5 \mu\text{m}$ sur l'axe vertical, ont été acquises successivement pour former des piles d'images 3D.

2. Recollage des images

Afin d'observer une zone de tissu plus large que le champ de vue du microscope, plusieurs images se recouvrant légèrement ont été acquises (**figure 2**). Le décalage entre deux images n'étant pas connu de manière précise, le recollage des différentes images est problématique.

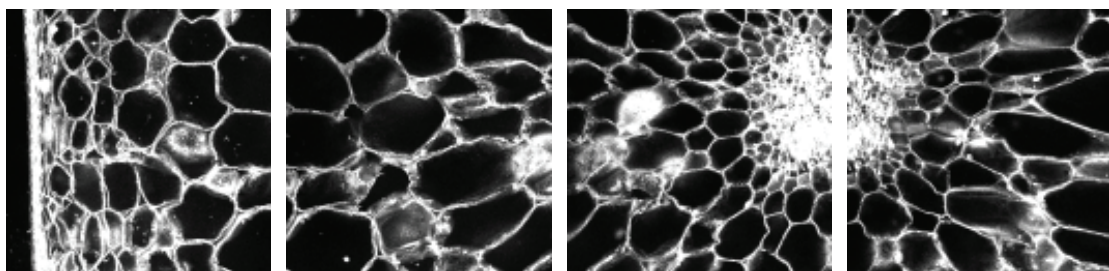


Figure 2 : images de tomate acquises avec un recouvrement d'environ 15 % dans la direction horizontale. Les images font $1,28 \text{ mm}$ de côté

Les méthodes de recalage d'images se basent soit sur un ensemble de points identifiés manuellement, soit sur une mesure de similarité (corrélation) entre deux régions de l'image. La plupart de ces outils n'existent que pour les images 2D. Un logiciel spécifique a donc été développé pour recoller des séries d'images, fonctionnant à la fois en 2D et en 3D (Fromont, 2005). Il est composé de deux parties distinctes : la première calcule les vecteurs de translation à appliquer à chaque image ou pile d'images, tandis que la seconde produit une

image mosaïque (ou une pile d'images) qui est la réunion des images (ou des piles d'images) d'entrée translattées par les vecteurs correspondants.

Le vecteur de translation est calculé en minimisant la somme des carrés des différences entre les régions superposées de deux images adjacentes. Pour réduire les temps de calcul, une approche pyramidale est utilisée : le décalage est d'abord estimé sur une version filtrée et réduite en taille des images, puis il est ajusté en utilisant des images de plus en plus résolues.

Il est ainsi possible d'obtenir des images couvrant un champ de vue plus large que celui du microscope et d'observer, par exemple, l'évolution de la structure cellulaire en fonction de la position dans le fruit. Pour la pomme et la tomate, les variations en fonction de la distance à l'épiderme sont particulièrement informatives.

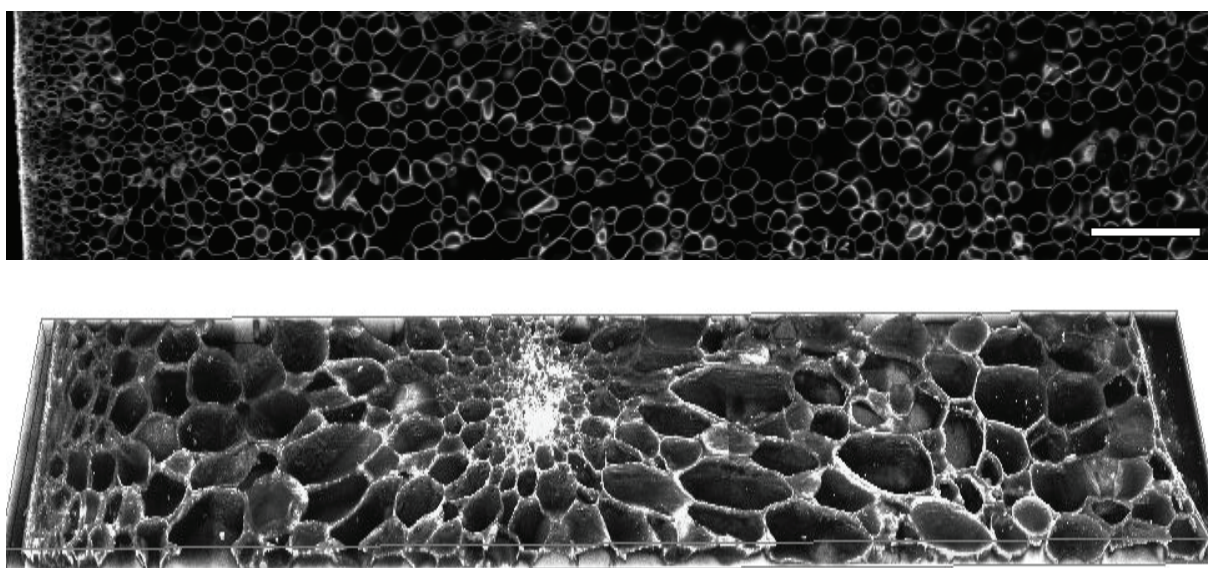


Figure 3 : images mosaïques de pomme (en haut) et de tomate (en bas).

L'épiderme du fruit est à gauche dans chaque cas.

L'image de pomme fait $11,17 \times 2,30$ mm et l'image de tomate $7,63 \times 1,28 \times 0,15$ mm.

La **figure 3** montre le résultat de la création d'images mosaïques pour la pomme et la tomate. L'image de pomme est le résultat d'un double recollage : horizontal et vertical. Les images montrent une forte hétérogénéité dans la taille, la forme et l'orientation des cellules. Dans les deux images, les cellules situées près de l'épiderme sont plus petites. Dans la tomate, les cellules sont plus grosses et allongées radialement dans la partie centrale du péricarpe. Les cellules de l'épiderme externe (à gauche) semblent aplaties parallèlement à l'épiderme. Au centre du péricarpe, on distingue un faisceau de cellules constituées d'un grand nombre de petites cellules et qui oriente localement les cellules en étoile. Dans le cas de la pomme, on observe de nombreux espaces intercellulaires, dont la taille peut être aussi importante, voire plus importante, que celle des cellules.

3. Filtrage directionnel

Dans les images de microscopie, la détection automatique des objets, ici les parois des cellules, est perturbée par la présence de bruit : le fond des cellules n'est pas uniformément noir et les pixels des parois ont des valeurs qui varient beaucoup (**figure 4**). L'objectif du filtrage est d'améliorer l'image des parois en fermant les contours, tout en lissant l'intérieur des espaces cellulaires et intercellulaires.

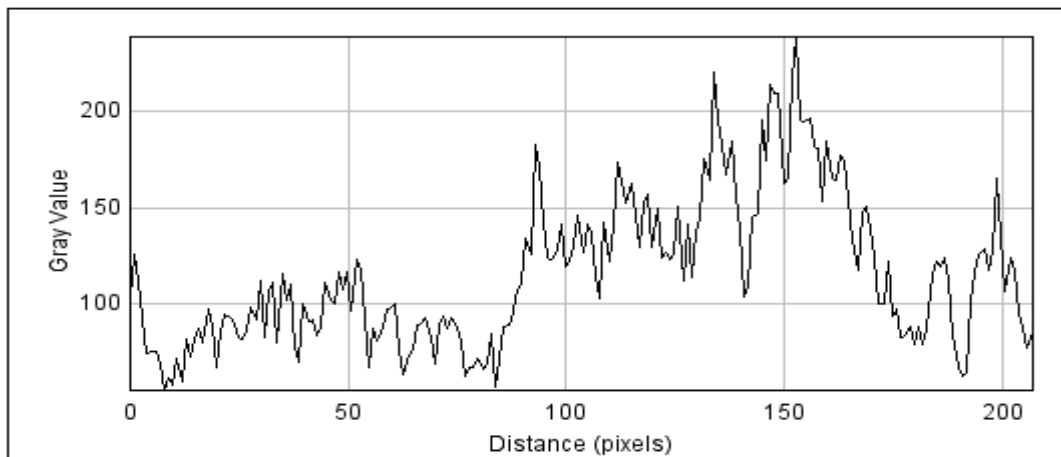
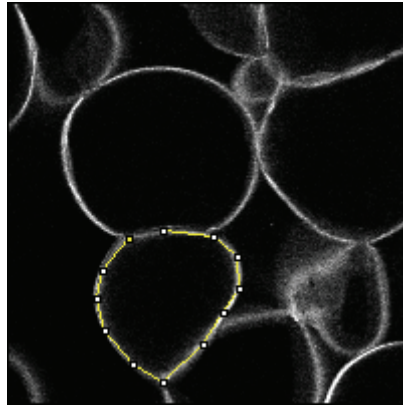


Figure 4 : mesure du profil de niveaux de gris sur le contour d'une cellule de pomme.

La démarche classique du filtrage d'image est de considérer pour chaque pixel, les pixels situés dans un voisinage proche et de calculer la valeur moyenne, médiane ou une moyenne pondérée des niveaux de gris des voisins (Cocquerez, 2000). Le voisinage pris en compte est défini par un élément structurant de taille et de forme donnée : disque, carré, ou noyau gaussien. Le problème qui se pose dans le cas des images de cellules est que les parois sont relativement fines (quelques pixels d'épaisseurs), et qu'un filtrage avec un élément structurant classique les atténue fortement, voire les supprime (**figure 5-b**). Il est donc nécessaire d'utiliser un filtrage tenant compte de la forme des parois et de leur orientation locale dans l'image.

Le filtrage directionnel nécessite des éléments structurants non isotropes. Les filtres de Gabor sont par exemple très utilisés pour la reconnaissance d'empreintes digitales (Hong *et al.*, 1998). Nous avons choisi comme éléments structurants des segments de droite de taille fixe,

mais d'orientation variable, qui sont plus simples à manipuler. La longueur des segments de droite est choisie pour être supérieure à deux fois l'épaisseur visible d'une paroi, soit 25 pixels dans l'exemple de la **figure 5**.

De tels filtres directionnels sont souvent utilisés avec des ouvertures morphologiques (Aufrechtig et Wilson, 1992, Terol-Villalobos *et al.*, 2008). Dans notre cas, l'application d'une ouverture morphologique laissait des « trous » dans les parois, ce qui posait des problèmes lors de la phase ultérieure de segmentation. Un filtre médian a donc été préféré, afin de garder la forme des parois tout en bouchant les trous.

La **figure 5** montre que pour une orientation donnée du masque, seules les parois orientées dans la même direction que le segment de droite sont préservées et les autres sont éliminées comme du bruit (**figure 5-d, 5-e**). En prenant la valeur maximum des niveaux de gris observés pour les orientations horizontales et verticales, on obtient une image avec les parties horizontales et verticales des parois (**figure 5-f**). En considérant 16 orientations et en retenant la valeur maximale observée selon les 16 directions, les parois des cellules sont préservées et lissées (**figure 5-c**). Un filtrage moyenneur avec un élément structurant plat carré de 3 pixels de côté est ensuite ajouté afin de lisser le résultat du filtrage directionnel.

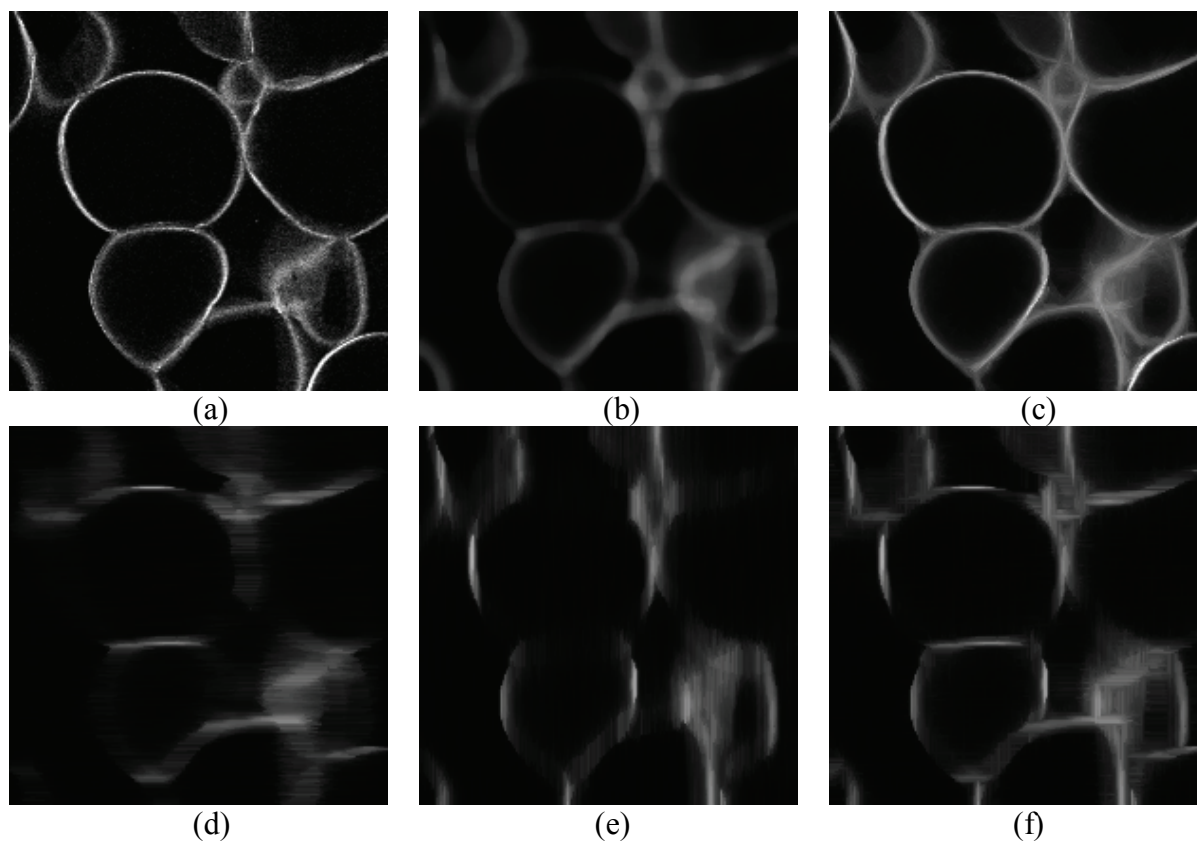


Figure 5 : cellules de pomme.

1^{ère} ligne de gauche à droite : image d'origine, filtrage médian avec un masque carré 10×10, et filtrage directionnel combinant 16 directions.

2^{ème} ligne : filtrage médian avec un masque ligne horizontale, ligne verticale, filtrage directionnel combinant les directions horizontale et verticale.

4. Segmentation par ligne de partage des eaux

Après avoir obtenu une image lissée des parois cellulaires, on cherche à segmenter l'image afin d'identifier les cellules et les espaces intercellulaires. Les algorithmes de segmentation peuvent être classés en deux catégories, selon qu'ils détectent les frontières ou les régions (Cocquerez, 2000). La *ligne de partage des eaux* est un algorithme de détection de régions particulièrement robuste et généraliste issu de la morphologie mathématique (Soille, 2003). Son principe est d'assimiler les niveaux de gris de l'image à des niveaux d'altitude : les minima sont des fonds de vallées ou des bassins versants et la ligne de partage des eaux est l'ensemble des lignes de crête qui délimitent ces bassins.

La ligne de partage des eaux est souvent utilisée sur une image de *contours* obtenue après application d'un *filtre gradient*. Pour des images de cellules végétales, le contraste entre parois et cellules est suffisant pour appliquer la ligne de partage des eaux directement sur les images. Les cellules correspondent à des minima de l'image et les parois à des crêtes de l'image.

L'application directe de la ligne de partage des eaux sur une image génère cependant un grand nombre de régions très petites (**figure 6-a**). Ce phénomène de *sur-segmentation* provient de l'existence de nombreux minima locaux dans l'image qui ne correspondent pas aux minima désirés, mais au bruit de fond dans l'image (**figure 6-b**). Le lissage améliore ce résultat, mais n'élimine pas tous les faux minima (**figure 6-c**). Il est donc nécessaire de détecter les minima significatifs. Une possibilité est de pointer manuellement un minimum pour chaque région, mais le grand nombre de cellules et la difficulté à manipuler des images 3D ne rendent pas cette solution optimale.

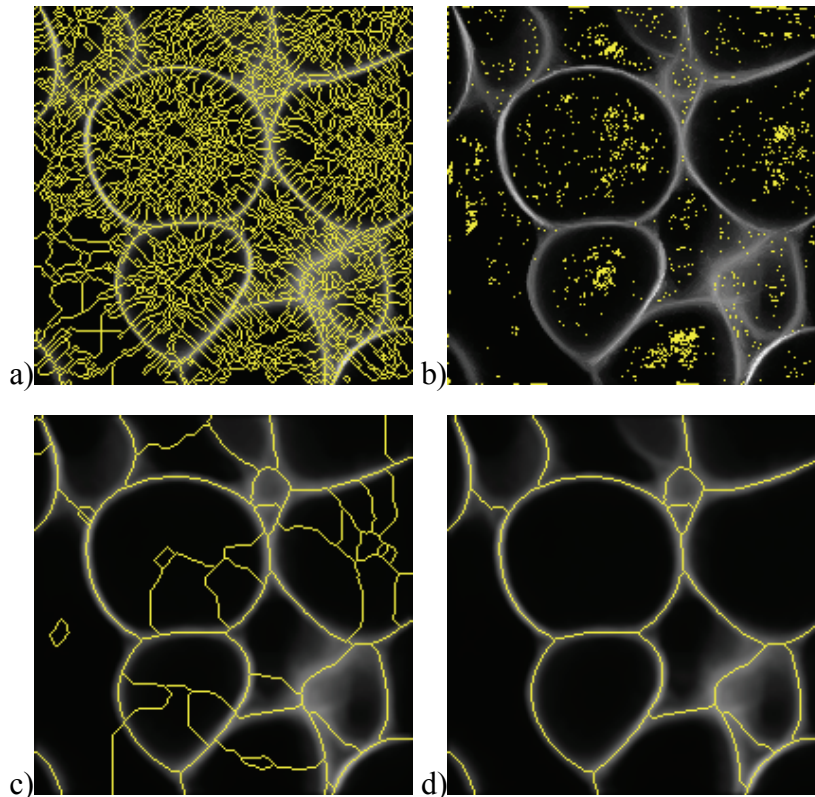


Figure 6 : ligne de partage des eaux sur l'image de la figure 5, et minima locaux en bas, ligne de partage des eaux sur l'image filtrée, et après détection des minima étendus

Nous avons utilisé une détection automatique des minima basée sur les « minima étendus » (Soille, 2003). Les minima ont été filtrés selon leur *dynamique de niveaux de gris* : si on considère les niveaux de gris comme des altitudes, un chemin (suite de pixels voisins) joignant deux minima doit « remonter », et passer une crête avant de redescendre. La dynamique d'un minimum est la plus petite valeur de remontée nécessaire pour atteindre un autre minimum. Le résultat donne pour chaque minimum l'ensemble des pixels dont la hauteur est inférieure à la hauteur du minimum plus la dynamique.

Seuls les minima dont la dynamique était supérieure à un certain seuil ont été gardés pour les images : 10 pour la tomate, 15 pour la pomme. La valeur de ce seuil a été déterminée empiriquement à partir d'une sélection d'images de test : un seuil plus petit produisait plus de région, un seuil plus grand avait tendance à fusionner les cellules. Pour les images de pomme, on obtient ainsi une segmentation correcte (**figure 6-d**).

Pour les images 3D de tomate, quelques traitements ont été rajoutés pour filtrer l'image des minima : une fermeture morphologique directionnelle pour supprimer les trous dans les minima (segments 21 pixels de longs dans 16 directions différentes), suivie d'une ouverture morphologique directionnelle de même taille pour diviser les régions correspondant à plusieurs cellules. La ligne de partage des eaux a ensuite été appliquée en imposant les minima étendus filtrés. Les frontières de chaque cellule sont ainsi précisément détectées (**figure 7**).



Figure 7 : portion d'une image mosaïque 3D, détection des minima 3D et résultat de la ligne de partage des eaux

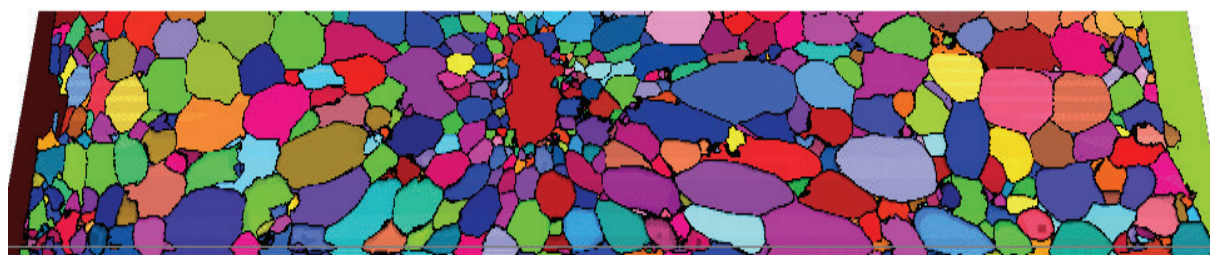
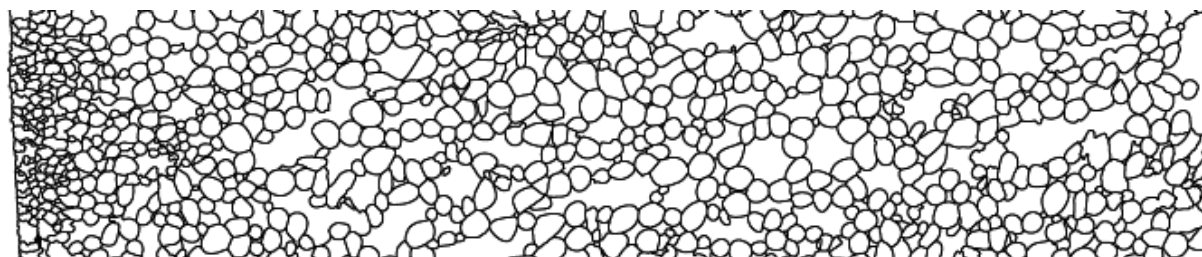


Figure 8 : résultat de la procédure complète (recollage, filtrage directionnel et segmentation par ligne de partage des eaux) sur les deux images témoins de pomme (en haut) et de tomate (en bas).

5. Résultats

Après avoir recollé les images, filtré les niveaux de gris des parois et appliqué la ligne de partage des eaux, on obtient des images 2D ou 3D qui délimitent différentes régions (**figure 8**). Dans le cas des images de pomme, on distingue clairement les cellules et les espaces intercellulaires.

L'utilisation conjointe du filtrage directionnel et de la ligne de partage des eaux donne une segmentation relativement correcte des images. Les limites du traitement apparaissent dans les zones contenant des petites cellules, notamment près des épidermes ou autour des faisceaux de cellules.

Les images de tomates montrent plus de défauts de segmentation. La première raison est que la qualité des images 3D de microscopie confocale diminue très vite avec la profondeur ce qui nécessite d'être plus tolérant vis-à-vis des marges d'erreur. La deuxième raison est que les tomates observées étaient à un stade mature et que des cellules commençaient à se dégrader, ce qui rend difficile leur coupe et leur observation.

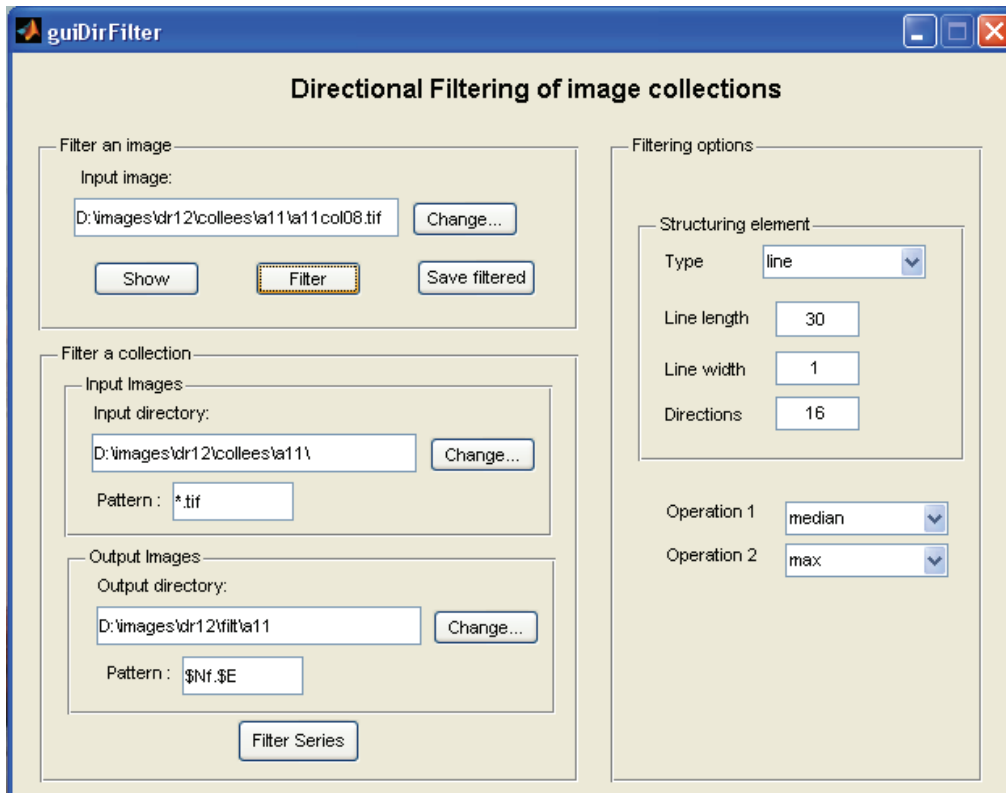


Figure 9 : exemple d'interface graphique développée pour l'utilisation de la procédure de filtrage directionnel. Les différentes zones de l'application permettent de régler les paramètres du filtre (taille de l'élément, opérations à appliquer...), de charger et filtrer une image simple, et d'appliquer le traitement sur une collection d'images en gardant les mêmes options de traitement

Conclusion et perspectives

La microscopie confocale permet d'observer la structure cellulaire des fruits charnus et des tissus végétaux en général. La segmentation automatique des cellules dans les images présente cependant des difficultés. Nous avons développé des outils pour traiter des problèmes récurrents dans le

traitement des images de cellules végétales : recollage des images pour augmenter la taille du champ de vue, amélioration des parois et réduction du bruit par filtrage directionnel, segmentation des cellules par ligne de partage des eaux, avec détection des minima par filtrage morphologique. Ces traitements sont nécessaires afin de pouvoir identifier les cellules et les espaces intercellulaires dans les tissus et quantifier la structure cellulaire.

Les traitements ont été développés pour réaliser une segmentation automatique des images. L'ajustement des paramètres (longueur et nombre de direction des lignes dans le filtrage directionnel, seuil de détection des minima ou taille de filtrage des minima dans la ligne de partage des eaux) dépend de la taille des objets dans l'image. Un étalonnage préalable avec un petit nombre d'images peut être nécessaire avant d'appliquer la méthode à une collection d'images.

Les outils sont génériques et adaptables à d'autres types de structures ayant une morphologie similaire. Des interfaces graphiques conviviales ont été développées afin de permettre leur utilisation par des utilisateurs non informaticiens (**figure 9**). Ces interfaces prévoient en outre le traitement par lot d'une série d'images acquises selon les mêmes modalités.

Bibliographie

- Cocquerez J-P., Philipp S. (2000) *Analyse d'images : filtrage et segmentation*. Masson
- Aufrichtig R., Wilson D.L. (1992) "Marking Arteries and Catheters in X-Ray Fluoroscopy Using Morphological Filtering," *Proc. IEEE EMBS*
- Devaux M-F., Bouchet B., Legland D., Guillon F., Lahaye M. (2008) Macro-vision and grey level granulometry for quantification of tomato pericarp structure. *Postharvest Biol. Technol.* 47: 99-109
- Fromont L., Devaux M-F, Barba D. (2005) Three-dimensional assembling of confocal images using multiresolution pyramids. In *Proc. 9th European Congress for stereology and image analysis*, 10-13 May 2005, Zakopane (Poland)
- Gray J.D., Kolesik P., Hoj P.B., Coombe B.G. (1999) Confocal measurement of the three-dimensional size and shape of plant parenchyma cells in a developing fruit tissue. *Plant J* 19: 229-236
- Hong L., Wan Y., Jain A. 1998 Fingerprint image enhancement: algorithm and performance evaluation, *IEEE Trans. Pattern Anal. Machine Intel.*, 20, 777-789
- Luengo Hendriks C.L., van Vliet L.J. (2003) Discrete morphology with line structuring elements, in: N. Petkov, M.A. Westenberg (eds.), *Computer Analysis of Images and Patterns – CAIP* (Proc. 10th Int. Conf., Groningen, NL, Aug.25-27), Lecture Notes in Computer Science, vol. 2756, Springer Verlag, Berlin, 2003, 722-729
- Najman L., M. Schmitt M. (1996) Geodesic saliency of watershed contours and hierarchical segmentation. Dans *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, Vol. 18, (12) 1163-1173
- Soille P., Talbot H. (2001) Directional Morphological Filtering, *IEEE Trans. Pattern Anal Machine Intel.* 23 (11): 1313-1329
- Soille P. (2003) *Morphological Image Analysis*. Springer, 2nd edition
- Terol-Villalobos I., Morales-Hernandez L. A., Herrera-Ruiz G. (2008) Directional structures detection based on morphological line-segment and orientation function, in *Discrete Geometry for Computer Imagery*, Springer-Verlag Berlin, LNCS: 458-469
- Vincent L., Soille P. (1991) Watersheds in digital spaces: an efficient algorithm based on immersion simulations, dans *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, Vol. 13, (6) 583-598

Suivi de la modification des architectures 3D de biopolymères sous sollicitations mécaniques

Christine Delisée¹, Jérôme Malvestio¹, Jérôme Lux²

Résumé : On s'intéresse au comportement sous sollicitations mécaniques de matériaux poreux à base de biopolymères destinés à l'isolation des bâtiments. Ces contraintes, s'exerçant de manière temporaire ou permanente lors de l'élaboration ou au cours de l'utilisation des matériaux, induisent des modifications de structure qui impactent leurs propriétés macroscopiques. Afin de comprendre et de caractériser les mécanismes en jeu, nous avons mis en œuvre un montage expérimental d'essais de compression sous microtomographie X. Les matériaux concernés par les premières expérimentations sont des fibres de bois utilisées industriellement pour la réalisation de panneaux isolants. Afin d'exploiter les images volumiques obtenues, on développe des outils adaptés de caractérisation locale des déformations 3D et de suivi des modifications de structure (contacts inter-fibres, morphologie des phases poreuse et solide, orientations locales).

Mots clés : bois, composite, compression, fibres, microstructure, microtomographie rayons X, morphologie, squelette 3D

Introduction

Le développement pour le bâtiment de nouveaux matériaux à base de biopolymères s'inscrit dans une démarche de qualité environnementale et dans un contexte où l'industrie cherche à diversifier les potentialités d'application. Ainsi, les fibres végétales, dont les fibres de bois, présentent un intérêt croissant. Outre les procédés classiques d'élaboration des panneaux (procédé papetier par voie humide et procédé par voie sèche avec pré-encollage des fibres), des procédés textiles non tissés permettent aujourd'hui de produire des matériaux à base de fibres de bois susceptibles de concurrencer les isolants de type laines de verre ou de roche. Dans tous les cas, il est essentiel, pour prévoir, contrôler et optimiser les architectures des réseaux fibres/pores et des interfaces liées à un type de procédé, de les comprendre et de les caractériser à toutes les étapes de la fabrication et de l'utilisation, depuis la consolidation des mats de fibres jusqu'à l'utilisation en service.

Aux capacités d'observation statique de la tomographie par rayons X, se sont ajoutées des possibilités de suivi non destructif *in situ* de phénomènes ou de processus physiques, tels que des sollicitations mécaniques (Badel *et al*, 2003). A partir d'images tridimensionnelles acquises lors d'une première phase exploratoire d'expérimentation sur la ligne ID19 de l'installation européenne de rayonnement Synchrotron (ESRF, Grenoble) (Badel *et al*, 2008), nous avons pu identifier le processus local de compression en relation avec les modifications de structure d'un panneau d'isolation de forte porosité. Afin de poursuivre et d'étendre cette étude à d'autres matériaux, nous avons développé à l'unité mixte de recherche « Sciences du

¹ UMR927 Sciences du bois et des biopolymères US2B INRA - F- 33405 Talence Cedex

☎ 0557122814 ✉ delisee@lrbb3.pierroton.inra.fr

² EA4226 Laboratoire d'étude des phénomènes de transfert et de l'instantanéité : agro-industrie et bâtiment LEPTIAB - F- 17042 La Rochelle Cedex 1

bois et des biopolymères» (US2B) de l'Inra, un montage expérimental simplifié pour l'acquisition d'images microtomographiques par rayons X de matériaux soumis à des sollicitations mécaniques incrémentées. L'objet d'études est cette fois le matériau dans sa phase non consolidée, se présentant comme un réseau de fibres individuelles enchevêtrées mais dont la cohésion n'est pas encore assurée. L'objectif est de comprendre les phénomènes mis en jeu lors de la compression du matelas afin d'identifier en particulier et d'alimenter des modèles théoriques de consolidation mécanique. Nous nous intéresserons plus particulièrement au suivi des modifications de structure à partir d'une représentation simplifiée du réseau fibreux sous forme d'un squelette 3D, pour mettre en évidence l'évolution du nombre et de la répartition des points de contacts entre les fibres.

1. Matériel et méthodes

L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'un nanotom Phoenix X-ray. L'appareil, équipé d'une source conique X microfocus et d'un détecteur 2D de 2304×2304 capteurs, donne des résolutions spatiales de $0,9$ à $32 \mu\text{m}$ selon la taille des échantillons testés. Dans notre cas, les fibres sont placées dans un cylindre de plexiglas de 10 mm de diamètre intérieur sur lequel on adapte une vis pour ajuster le taux de compression souhaité (**figure 1**). La résolution obtenue est de $8,2 \mu\text{m}$ par pixel. Les scans sont réalisés aux taux successifs 0% , 23% et 49% .

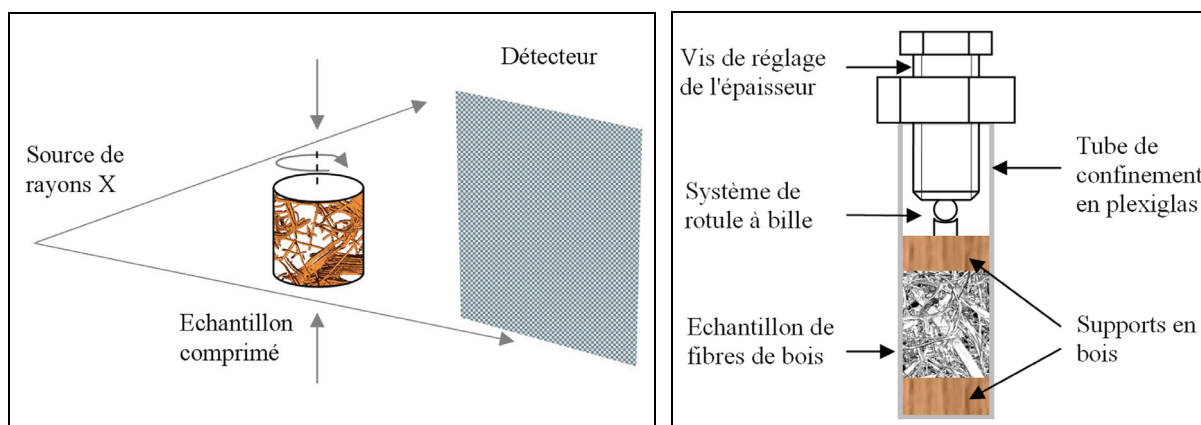


Figure 1 : Dispositif expérimental d'essais de compression développé à l'US2B (à droite) sous microtomographie X (à gauche). Taille de l'échantillon : $\Phi=10 \text{ mm}$, $h_{\text{initiale}}=18 \text{ mm}$

Après reconstruction des images volumiques obtenues aux différents taux de compression, on extrait le volume total des fibres du cylindre de plexiglas en utilisant un masque de section circulaire (**figure 2**). La résolution finale, réduite à 4 fois la résolution initiale afin d'obtenir des tailles de fichiers exploitables, est égale à $32,8 \mu\text{m}$. A cette résolution, la porosité interne des fibres (ou lumens) n'est plus accessible : les mesures sont donc réalisées sur des fibres rebouchées. On notera toutefois que lors de travaux exploratoires menés précédemment (Badel *et al*, 2008) à des taux de compression similaires, il avait été montré que la porosité interne, et donc les dimensions des fibres, n'étaient pas modifiées sous la sollicitation. Après filtrage des images pour en extraire le bruit et segmentation par seuillage des phases solides (fibres) et poreuse (**figure 2**) (Lux *et al*, 2006, Badel *et al*, 2008), les mesures 3D sont réalisées à l'aide d'outils issus de la morphologie mathématique (Matheron, 1967, Serra, 1982).

Les modifications de structure induites par la sollicitation peuvent être suivies à partir d'une représentation simplifiée du réseau fibreux sous forme d'un squelette 3D. L'algorithme de squelettisation développé au laboratoire (Lux *et al*, 2006) est basé sur une approche de type *amincissement homotopique* parallèle avec sous-itérations directionnelles qui garantit la symétrie et la finesse du squelette. Cette approche est particulièrement bien adaptée aux objets 3D étudiés ici (fibres de bois), dont les contours sont très rugueux et qui peuvent présenter des dimensions de très petite taille ; de l'ordre de quelques dizaines de microns. Les fibres individuelles sont ensuite identifiées à partir de la labellisation des branches du squelette puis de leur reconstruction dans l'image initiale. On accède entre autre à la répartition spatiale et aux nombres de contacts entre les fibres.

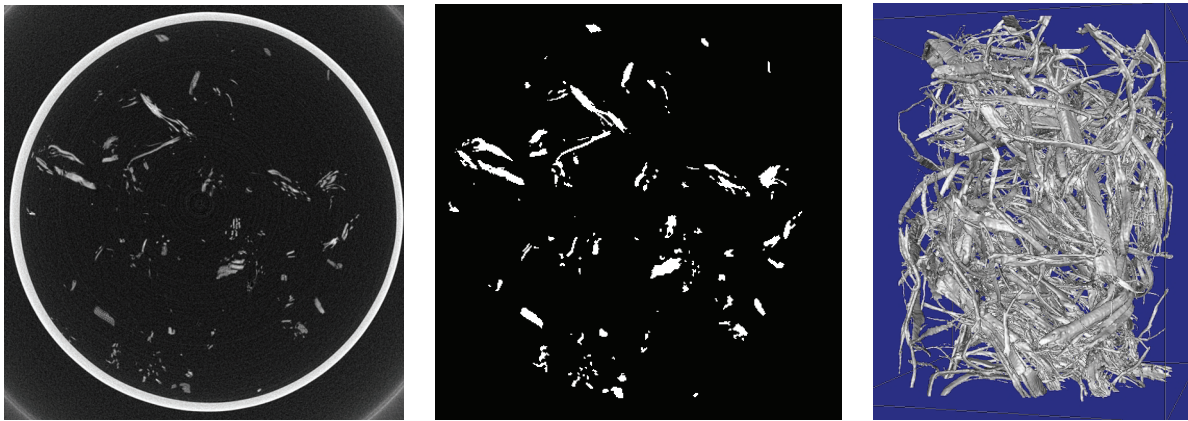


Figure 2 : *Images microtomographiques. A gauche, coupe transverse en niveaux de gris. Au centre, coupe transverse après sous-échantillonnage, recadrage, nettoyage et seuillage (450×450 pixels de $32,8 \times 32,8 \mu\text{m}^2$). A droite, rendu volumique dans l'état comprimé 1.*

2. Résultats

Les mesures sont réalisées sur les images volumiques binaires aux taux de compression 0 %, 23 % et 49 %, de hauteurs successives 18 mm, 13,9 mm et 9,2 mm. La porosité externe varie de 96 % (état initial) à 95 % et 91 % (états comprimés). Cette porosité ne prend pas en compte la porosité interne des fibres puisqu'elle est mesurée sur les fibres rebouchées.

Les squelettes 3D extraits des images ont une longueur totale quasi constante aux 3 taux de compression. On observe, notamment au niveau des bûchettes de plus grandes dimensions, des branches parasites qui doivent être éliminées (**figure 3**). L'algorithme de segmentation du squelette permet d'identifier par un label ses différentes partitions : branches, points terminaux et intersections des branches. Les branches adjacentes à un nœud y sont fusionnées selon des critères d'orientation et forment alors des fibres. Les paramètres qui optimisent le résultat sont :

- une longueur seuil de branche parasite à éliminer ;
- une longueur seuil qui indique à partir de quelle longueur 3 branches qui se croisent sont affectées du même label ou pas ;
- une longueur seuil de branche entre 2 intersections qui seront alors fusionnées.

Si les premières mesures montrent l'importance du calage des 3 paramètres de la segmentation pour obtenir des résultats significatifs, par exemple en rapport avec les dimensions des fibres, on observe une même évolution des résultats avec le taux de compression pour les différents jeux de paramètres. Un autre exemple : si le nombre de contacts est sensible à une augmentation de la valeur du paramètre de longueur des branches entre 2 nœuds, correspondant à une augmentation du nombre de contacts fusionnés, ce nombre d'intersections entre fibres, pour un jeu de paramètres donnés, est constant aux 3 états de compression. Ramené au volume total des fibres (ou à la longueur totale du squelette), on obtient un nombre volumique (ou linéique) d'intersections qui ne dépend pas de l'état de compression. Ainsi, en ramenant au volume total du cylindre défini entre les supports, on obtient une densité de contacts stable vis-à-vis des taux de compression appliqués et du paramétrage de la segmentation. En effet, on observe des variations de 20 % et 51 % de la densité de contacts, comparables aux taux de compression égaux à 23 % et 49 %, et cela quel que soit le jeu de paramètres testé.

Après réglage des paramètres, on obtient un nombre linéique d'intersections respectivement égal aux 3 taux de compression à $0,89 \text{ mm}^{-1}$, $0,92 \text{ mm}^{-1}$ et $0,93 \text{ mm}^{-1}$. Ces valeurs, qui seront à conforter et à valider par d'autres mesures avec une optimisation de la segmentation, sont à comparer au nombre linéique moyen d'intersections dans l'espace ; estimé à 5 mm^{-1} dans le cas de matériaux fibreux décrits par un modèle théorique de droites de Poisson (Delisée *et al*, 2001), de porosité équivalente mais de tailles de fibres sensiblement plus courtes et plus fines.

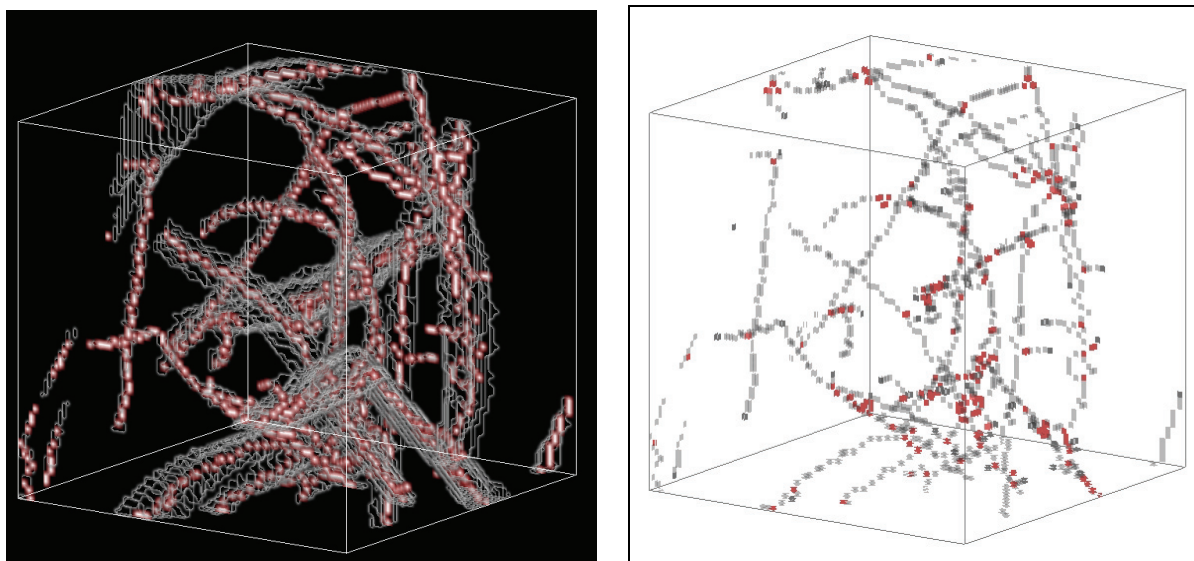


Figure 3 : Extraction du squelette 3D (à gauche) et des points de contact des fibres (à droite)

Conclusion et perspectives

Nous avons mis en œuvre au laboratoire des essais de compression sous microtomographie X afin de suivre l'évolution des microstructures de matériaux à base de biopolymères sous sollicitations mécaniques. Nous avons mené les premiers essais sur un échantillon de fibres de bois enchevêtrées mais non encore liées, utilisées pour l'élaboration de panneaux isolants du

bâtiment. Pour ce type de matériaux, nous avons envisagé une représentation simplifiée du réseau des fibres sous forme d'un squelette 3D pour mettre en évidence des paramètres de structure comme les intersections entre les fibres et leur évolution sous la sollicitation de compression. Un algorithme de segmentation du squelette a permis ensuite d'identifier les fibres individuelles ainsi que leurs intersections. Si les résultats dépendent des paramètres de réglage de la segmentation (élimination des branches parasites, fusion des intersections), on obtient des évolutions comparables pour un choix de paramètres donné. Ainsi, on a montré que le nombre de contacts était constant aux 3 taux de compression. Il s'agira de compléter ces mesures avec des essais à des taux de compression supérieurs afin de voir comment ce nombre de points évolue. Compte tenu des nombreuses applications possibles, nous poursuivons l'exploitation d'une représentation du réseau sous forme d'un squelette et de sa segmentation en fibres individuelles. De plus, des mesures réalisées sur un réseau fibreux théorique dont la population des fibres est bien identifiée, permettront de valider l'ensemble de la démarche.

Bibliographie

- Badel E., Delisée C., Lux J. (2008) 3D structural characterisation, deformation measurements and modelling of low-density wood fibreboards under compression. The use of microtomography. *Composites Science and Technology* 68:1654-166
- Badel E., Letang J.M., Peix G., Babot D. (2003) Quantitative microtomography: measurement of density distribution in glass wool and local evolution during a one-dimensional compressive load. *Measurement Sciences and Technology*, 14, 410-420
- Delisée C., Jeulin D., Michaud F. (2001) Caractérisation morphologique et porosité en 3D de matériaux fibreux cellulosiques. *C. R. Acad. Sci. Paris* 329 (Série II b) : 179-185
- Lux J., Delisée C., Thibault X. (2006) 3D characterization of wood based fibrous materials: an application. *Image Analysis and Stereology* 25:25-35
- Matheron G. (1967) *Eléments pour une théorie des milieux poreux*. Paris, Masson
- Serra J. (1982) *Image analysis and mathematical morphology*. New-York, Academic Press

Essais mécaniques sous microscope

Patrice Marchal¹

Résumé : *Au laboratoire d'étude et de recherche sur le matériau bois (LERMAB) du centre Inra de Nancy, nous avons mis au point une technique d'observation à faible grossissement de la surface d'un petit échantillon de bois soumis à une élongation croissante par paliers.*

Puis, nous avons analysé sa déformation grâce à un logiciel traitant les images prises au cours de l'élongation.

A partir de quelques points caractéristiques se retrouvant sur chaque cliché grâce au recentrage permanent de la zone observée, nous avons analysé la déformation de ce polygone par un logiciel développé au laboratoire.

Mots-clés : bois de réaction, peuplier, traction, microscopie optique, analyse d'images, mesures de contraintes/déformations, module d'Young.

Introduction

Au laboratoire d'étude et de recherche sur le matériau bois (LERMAB) du centre Inra de Nancy, nous avons mis au point une technique d'observation à faible grossissement de la surface d'un petit échantillon de bois soumis à une élongation croissante par paliers.

Dans un premier temps, je présenterai sur quel type de matériel végétal et par quels moyens mécaniques sont effectués les essais. Les échantillons sont prélevés, sur un arbre bien particulier, par dégrossissage suivi d'une préparation soignée par sciage de précision et polissage. Leur élongation est ensuite réalisée par une platine équipée de deux mors de serrage des extrémités de l'échantillon et d'une vis micrométrique assurant la précision du déplacement. Cette platine d'élongation prend place sur la platine du microscope optique à laquelle elle est solidarisée par deux vis de fixation.

Puis, j'expliquerai quelles informations sont recueillies durant la traction et par quelles méthodes elles sont traitées. Ainsi, un détecteur de force situé à l'opposé de la vis micrométrique permet d'associer telle force à tel déplacement. La zone de l'échantillon observée est photographiée après recentrage et mise au point.

Nous procédons ensuite à une analyse de la déformation infime de l'échantillon par un logiciel traitant les images prises successivement au cours de l'élongation. Nous choisissons ainsi quelques points particuliers présents sur chaque image grâce au recentrage permanent de la zone observée ; puis, nous analysons la déformation de ce polygone avec un logiciel développé au laboratoire.

Enfin, j'envisagerai les perspectives futures ainsi que la modélisation permise par l'exploitation de ces résultats.

¹ INRA - UMR1092 - Études des ressources forêt-bois LERFoB,- Laboratoire d'étude et de recherche sur le matériau bois (LERMAB) F-54042 Nancy ☎ 03 83 39 68 30 ✉ patrice.marchal@nancy-engref.inra.fr

1. Matériel et méthode

1.1 Matériel végétal

1.1.a Origine

Actuellement, les essais effectués au laboratoire portent sur des échantillons de bois d'un jeune peuplier ayant subi une contrainte lors de sa croissance (**photo 1**). Il s'agit d'un clone de Peuplier (*Populus*) âgé d'une dizaine d'années, issu d'une culture *in vitro* réalisée dans l'unité Amélioration, génétique et physiologie forestières du centre Inra d'Orléans. Planté en 1996, il a été incliné artificiellement à partir de 1998 de manière à ce qu'il développe une zone de bois de tension bien définie. Etant donné son faible diamètre et son âge, le bois de cet arbre est majoritairement constitué de bois juvénile.

La découpe du peuplier s'est faite en deux étapes.



Photo 1 © Inra/Carole Assor : *peuplier avec contrainte*

Dans un premier temps, l'arbre a été abattu sur le terrain puis débité en longs tronçons de plus d'un mètre (**photo 2**). Puis, quelques jours plus tard, des rondelles de bois d'environ 5 cm d'épaisseur furent prélevées à différentes hauteurs du tronc de l'arbre à l'aide d'une scie à ruban. Cela avait pour but de se situer à différents niveaux de l'intensité de la contrainte subie par l'arbre au cours de sa croissance.



Photo 2 © Inra/Carole Assor : *découpe de l'arbre*

Lors de ces deux étapes, nous avons veillé à ne jamais laisser sécher les tronçons ou les rondelles de bois car la première série de mesures devait porter sur le bois frais, d'où la nécessité de transporter les tronçons dans des sacs poubelle soigneusement fermés ; puis, de conserver les rondelles au réfrigérateur dans des baquets d'eau.

Ainsi, cet arbre recéla différentes sortes de bois (**photo 3**) :

- **du bois de tension (T)** : ce bois présente de grandes différences avec le bois normal. Il a été produit par l'arbre en réaction à la contrainte qui lui fut infligée lors de sa croissance (bois de réaction). Au niveau anatomique, dans le bois de tension, les vaisseaux sont moins nombreux et de plus faible diamètre que dans le bois opposé et normal. Le pourcentage de fibres est plus important, leur diamètre est plus faible et leurs parois plus épaisses avec un contour très arrondi. Les observations microscopiques ont mis en évidence la présence, au niveau des fibres du bois de tension, d'une couche gélatineuse dite couche G ;
- **du bois opposé (O)** : il s'agit également d'un bois de réaction (compression) apparaissant symétriquement au bois de tension par rapport au cœur de l'arbre ;
- **du bois normal (N)** : son aspect est identique au bois constituant un peuplier du même âge et qui n'aurait pas subi de contrainte. Ce bois se trouve de part et d'autre d'une ligne imaginaire qui relierait le bois de tension et le bois opposé. Cela est très logique car en ces deux zones, la contrainte mécanique subie par l'arbre fut globalement nulle (ni tension, ni compression).



Photo 3 © Inra/Carole Assor : *les trois types de bois*

*Tension : zone claire délimitée à gauche,
Opposé : symétrique à celui de tension,
Normal : à 90° de la ligne T-O.*

1.1.b Préparation des échantillons

La préparation des échantillons se fait en trois étapes de sciage suivies d'une dernière étape de ponçage de l'une des faces de l'échantillon final :

- **sciage de la rondelle de 5 cm d'épaisseur à l'aide d'une scie à ruban**

Il s'agit d'extraire un bloc de bois d'environ 5 cm de largeur dans la rondelle en réalisant deux traits de coupe espacés de 5 cm. Le bloc est ensuite obtenu en le détachant au ciseau à bois au niveau du cœur de la rondelle. Il est assez irrégulier, de dimensions approximatives 5 x 5 x 5 cm.

- **sciage du cube de 5 cm de côté à l'aide d'une tronçonneuse de précision**

Le cube obtenu précédemment est débité en tranches de 5 mm de largeur après enlèvement d'une entame afin d'obtenir une surface lisse et régulière. La largeur de la tranche est très précise du fait de l'utilisation d'une scie circulaire électronique de grande précision : la tronçonneuse Accutom-5 de chez Struers (**photo 4**).



Photo 4 © Inra/ Patrice Marchal : *tronçonneuse Accutom-5*

- **sciage des tranches de 5 mm de largeur**

Les tranches obtenues sont alors découpées en "allumettes" de 2 mm d'épaisseur ; soit toujours avec l'Accutom-5, soit avec une scie à fil diamanté : la scie Well 3241 de chez ESCIL (**photo 5**).



Photo 5 © ESCIL <http://www.materiel-metallograp> :
scie à fil Well 3241

Le choix d'utiliser la tronçonneuse ou la scie à fil est un compromis entre le nombre d'échantillons obtenu et le temps nécessaire pour effectuer les coupes. La tronçonneuse permet une coupe très rapide mais engendre une grosse perte de bois à chaque coupe (2,1 mm), soit l'obtention de six ou sept échantillons pour une tranche. En revanche, la scie à fil nécessite un temps de coupe très long mais n'occasionne quasiment aucune perte de bois (le diamètre du fil étant de 0,3 mm), on peut alors obtenir plus de quinze échantillons dans une tranche soit plus du double de ceux obtenus avec la tronçonneuse.

Un autre avantage de la scie à fil est la quasi-absence de rupture de continuité d'un échantillon à l'autre, on enlève seulement une épaisseur de 0,3 mm ; tandis qu'avec la tronçonneuse, on enlève 2,1 mm soit environ l'épaisseur d'un échantillon brut.

- ponçage des allumettes de 50 x 5 x 2 mm

L'état de surface obtenu à l'issue des coupes à la tronçonneuse ou à la scie à fil, bien que lisse au toucher, est nettement insuffisant pour une observation microscopique. L'image obtenue sur ces échantillons bruts est trop floue pour être exploitable, d'où la nécessité d'un ponçage avec une fine granulométrie de papier (1200).



Photo 6 © Inra/P. Marchal :
polisseuse manuelle



Photo 7 © Inra /Anh Tuan Dinh :
polisseuse manuelle et cale



Photo 8 © Inra/P. Marchal :
cale de ponçage, vue de face



Photo 9 © Inra/P. Marchal :
cale de ponçage, détail rainure

Le ponçage s'effectue à l'aide d'une polisseuse manuelle de chez ESCIL (**photos 6 et 7**), à vitesse variable et à possibilité d'arrosage ; cette fonction est très utile pour les expériences portant sur le bois frais, comme par exemple, les futurs essais mécaniques sur le bois vert.

Il est bien évident qu'un échantillon aussi petit (50 x 5 x 2 mm) ne peut pas être poncé directement en l'appliquant à la main sur la polisseuse. Aussi, une cale de ponçage a été conçue et réalisée par Anh Tuan Dinh, doctorant au LERMAB réalisant une thèse sur le comportement élastique linéaire et non-linéaire.

Cette cale est constituée de deux rectangles de bois superposés reliés par quatre vis et écrous, l'ensemble formant une sorte d'étau (**photos 8 et 9**).

Les vis sont suffisamment longues pour permettre de glisser, entre les deux rectangles de bois, une petite baguette de bois de même largeur que les échantillons (en général 5 mm). Celle-ci est enfoncée à l'intérieur de la cale à une profondeur comprise entre 1,7 et 1,9 mm, l'important étant que la profondeur à chaque extrémité soit identique afin d'obtenir un

échantillon poncé d'épaisseur constante sur toute sa longueur. L'échantillon est ensuite inséré dans cette rainure d'un peu moins de 2 mm de profondeur. Il dépasse donc très légèrement du bord de la cale qu'il suffit alors d'appliquer perpendiculairement à la surface abrasive de la polisseuse afin d'éliminer toute la partie d'échantillon excédant le bord de la cale. On obtient alors l'échantillon définitif d'une épaisseur identique sur toute sa longueur et dont l'un des côtés présente un bon état de surface pour la microscopie optique.

1.2 Méthode

1.2.a Support permettant les contraintes sur l'échantillon (photos 10 et 11)

La platine de traction, avec laquelle nous avons déjà réalisé des tests sur des échantillons d'épicéa (Farruggia, 1998, Farruggia et Perré, 2000), a été conçue et réalisée à l'ENGREF (conception : Patrick Perré ; réalisation : Michel Contal). Elle est constituée d'un châssis formé d'un rectangle en acier aux extrémités duquel ont été fixées d'une part la sonde du détecteur de force et d'autre part, à l'opposé de cette sonde, une vis micrométrique pour un déplacement précis de 20 μm par graduation.

Le châssis est lui-même fixé sur une plaque de plastique rigide dans laquelle ont été pratiquées deux encoches pour fixer la platine sur le microscope optique.

Sur le bloc métallique déplacé par la vis micrométrique ainsi que sur la sonde du détecteur de force (Digital Force Gauge Chatillon de chez Indelco) ont été fixés des supports de mors.

Les deux mors de serrage de l'échantillon sont amovibles et peuvent être retirés facilement de la platine. Cela présente l'avantage d'étudier un nouvel échantillon sans avoir à enlever la platine de traction de la platine du microscope.

La liaison entre les supports de mors et les mors amovibles se fait par un système de deux tiges métalliques, l'une verticale et l'autre horizontale occasionnant un frottement minime en s'effectuant au point de contact de deux cylindres métalliques. Par ailleurs, l'absence de fixation par serrage entre les supports de mors et les mors amovibles laisse l'échantillon libre de s'orienter selon la ligne de force lorsque la traction commence.

Les deux surfaces de serrage des mors amovibles, sur les extrémités de l'échantillon de bois, sont garnies de papier de verre afin de limiter au maximum le glissement de l'échantillon durant la traction.



Photo 10 © Inra/ P. Marchal : *platine démontée*

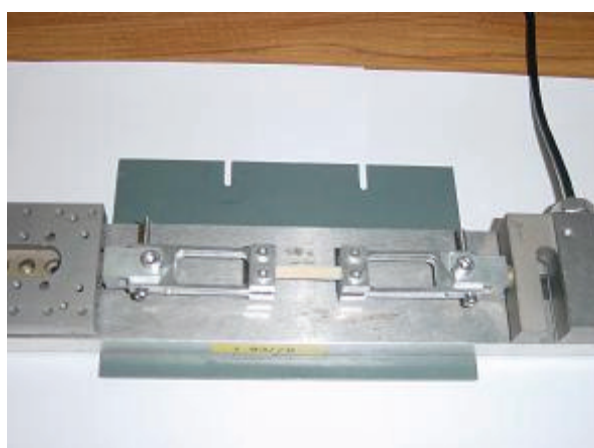


Photo 11 © Inra/ P. Marchal : *platine avec éprouvette*

1.2.b Dispositif d'observation microscopique et de prise d'images_(photos 12 et 13)

La prise d'images de l'échantillon est réalisée grâce à un microscope optique Zeiss Axioplan. Il s'agit d'une observation de surface, on emploie donc comme objectif un Zeiss NEOFLUAR épiplan à grossissement modéré (20 fois).

Les clichés sont obtenus par l'intermédiaire d'une caméra noir et blanc Basler A102f-2 fixée sur la colonne du microscope. La caméra est pilotée par le logiciel BCAM Viewer Version 1.8.0050



Photo 12 © Inra/ P. Marchal : *vue générale*

Photo 13 © Inra/ P. Marchal : *platine sous microscope*

1.2.c Procédure du recueil de résultats

La collecte des résultats est réalisée de manière cyclique selon un motif d'une durée de 20 s :

- à t_0 , l'opérateur N°1 tourne la vis micrométrique d'une graduation et réalise le recentrage sur l'écran grâce aux vis de déplacement en X et en Y de la platine du microscope. Dans le même temps, l'opérateur N°2 refait la mise au point de l'image ;
- à t_{10} , l'opérateur N°1 donne la valeur de déplacement ainsi que la valeur de la force en N à l'opérateur N°2 tandis qu'il note ces deux valeurs sur le cahier de laboratoire. Simultanément, l'opérateur N°2 prend le cliché et donne au fichier image un nom regroupant le déplacement et la force (exemple : 120-56,6 pour 120 μm parcourus depuis le départ et une force lue de 56,6 N) ;
- à t_{20} , on recommence comme à t_0 .

On poursuit la collecte des résultats jusqu'à une force exercée sur l'échantillon de 100 N au maximum ; il arrive parfois que l'échantillon se casse avant d'atteindre cette valeur.

1.2.d Logiciel d'analyse de la déformation de l'échantillon (photos 14 et 15)

La mesure de déformation utilise la méthode de corrélation d'images (Sun *et al.*, 1997 ; Hild, 2003). Pour les mesures de déformation de l'échantillon nous n'utilisons pas un logiciel commercial, mais le logiciel *MeshPore* entièrement développé au LERMAB (Perré, 2005) ; nous utilisons actuellement la version 4, d'avril 2007.

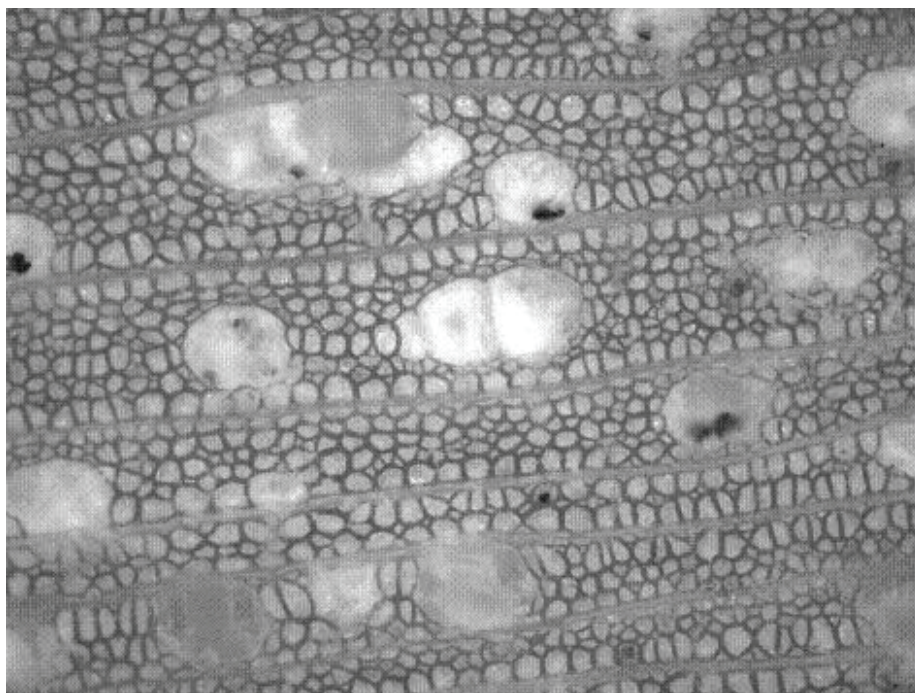


Photo 14 © Inra/Anh Tuan Dinh : *vue microscopique de la surface de l'éprouvette*

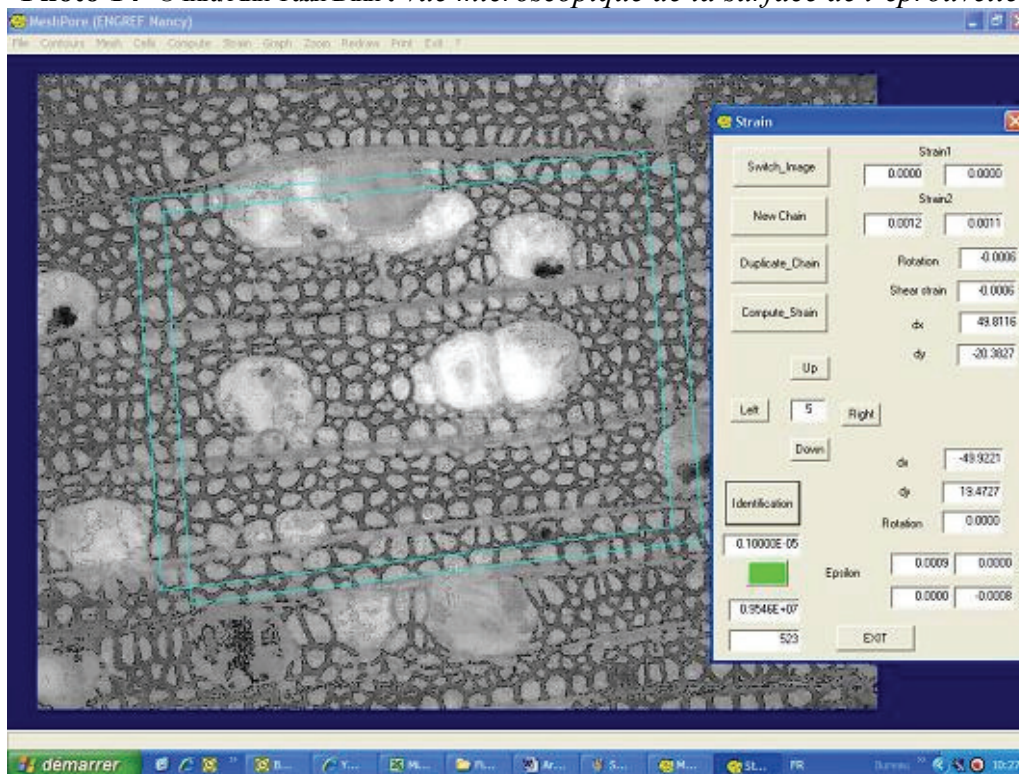


Photo 15 © Inra/ P. Marchal : *images en cours d'analyse avec MeshPore*

2. Résultats et interprétation

Echantillons humides

On rencontre systématiquement des problèmes expérimentaux avec les échantillons humides. Le phénomène de fluage apparaît rapidement sur toute la gamme des essais sur un échantillon humide. Il est donc difficile d'évaluer les valeurs de déformation relatives à chaque niveau de force.

Afin d'obtenir le résultat dans le champ de perturbation, il faut réaliser les mesures rapidement, ce qui n'est pas simple car les deux grandes étapes d'obtention d'une valeur, "traction + recentrage" et "mise au point + sauvegarde du cliché", prennent du temps. Il faut environ 10 s par étape soit 20 s au minimum par incrément de déformation. L'important est de conserver une durée identique entre chaque incrément ; ainsi, même lors d'un fluage important de l'échantillon, l'essai est répétable et fournit un résultat précis.

Echantillons secs

L'influence du fluage est faible pour les échantillons secs, on obtient donc de meilleurs résultats.

2.1 Essai de traction sur du bois de tension de peuplier

Le retrait du bois est un gros problème lors de sa période de séchage. Durant celui-ci, les fibres se courbent et provoquent alors la déformation de l'échantillon. Il est donc nécessaire de faire sécher à l'air libre l'ensemble de la rondelle de tronc d'arbre ; puis d'y découper les échantillons définitifs uniquement après séchage complet, cela afin de bien conserver la structure interne.

L'échantillonnage a fourni neuf éprouvettes dont les résultats figurent au **tableau 1**.

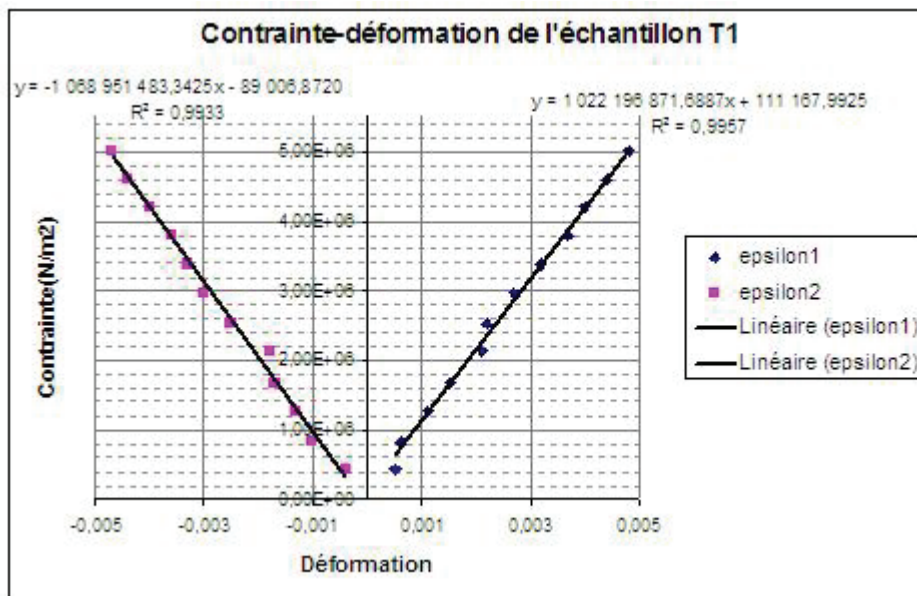
Echan.	Longueur (mm)	Largeur (mm)	Epaisseur (mm)	Module d'Young (Mpa)	Coef. Poisson	$\frac{\%(E_R - E_{R_{moy}})}{E_{R_{moy}}}$	$\frac{\%(U_R - U_{R_{moy}})}{U_{R_{moy}}}$
T1	25.18	5.5	1.81	1 022	1.05	-8.11	-2.88
T2	23.25	5.46	1.81	1 174	0.99	5.56	-7.62
T3	24.23	5.46	1.74	1 030	1.00	-7.39	-7.24
T4	27	5.44	1.77	1 277	0.94	14.82	-12.52
T5	24.34	5.42	1.83	1 004	0.97	-9.73	-9.93
T6	26.84	5.42	1.82	1 290	1.10	15.99	2.66
T7	24.43	5.37	1.74	1 200	1.12	7.90	4.40
T8	24.11	5.38	1.85	1 083	1.02	-2.62	-5.60
T9	23.02	5.39	1.85	1 213	1.14	9.06	5.66

valeur moyenne	1 143.67	1.04
écart-type	111.24	0.07

Tableau 1 : résultats de mesures

On constate que le module d'Young et le coefficient de Poisson sont variables pour les différents échantillons malgré leur proximité dans la rondelle de bois. Cependant, les variations par rapport à la moyenne sont faibles, 16 % au maximum, ce qui est acceptable pour ce type d'expérimentation sur micro-échantillons.

D'autre part, le bois étant un matériau hétérogène, en considérant l'échantillon comme une poutre encastrée dans les mors, on constate la variabilité de sa rigidité en fonction de l'endroit où la déformation a été évaluée. L'hétérogénéité est l'une des raisons expliquant la différence du module d'Young entre les différents échantillons.



Graphique 1 : exemple de tracé des droites contrainte = f(déformation)

3. Conclusion et perspectives

3.1 Mesures sur échantillons frais

Nous envisageons de réaliser ces essais pour les échantillons frais car cela est une étape importante à la détermination des caractéristiques mécaniques du bois. Ces résultats pourraient donner une vue précise de l'état vert du bois ; et, en les combinant avec ceux obtenus à l'état sec, nous aurions un bilan complet des caractéristiques mécaniques ainsi que de leur évolution durant le séchage. Cependant, comme nous l'avons décrit précédemment, la réalisation des essais sur bois frais est très délicate à cause du phénomène de fluage. La plus grosse contrainte est la durée de recueil des données à chaque palier de déplacement, l'objectif sera donc de la réduire afin de limiter l'apparition du fluage. Une des possibilités sera l'automatisation du dispositif qui effectuerait à la fois la traction et la prise des clichés en une durée la plus courte possible.

3.2 Comportement en grandes déformations

Nous projetons d'élargir ces essais pour la compression en grandes déformations. Cela consistera à examiner les caractéristiques mécaniques du bois en compression lorsque l'échantillon subit une force importante. Pour l'instant, la plage de déformation étudiée est l'élasticité jusqu'à la plasticité et parfois la rupture. Il y a encore des incertitudes quant à la zone s'étendant de la plasticité à la rupture. Celle-ci pourrait apporter des connaissances intéressantes.

3.3 Modélisation du comportement en grandes déformations

Enfin, il serait intéressant de modéliser la compression en grandes déformations grâce à la méthode MPM (Material Point Method) ; en effet, après avoir recueilli les caractéristiques mécaniques du bois, il sera judicieux de les comparer avec le modèle obtenu grâce à cette nouvelle méthode.

Remerciements : Au LERMAB, je tiens à remercier M. Anh Tuan Dinh, doctorant, ainsi que Mme Carole Assor, chargée de recherche, pour les éléments qu'ils m'ont fournis. Je remercie également M. Patrick Perré, directeur du laboratoire, pour la relecture scientifique de mon document.

Bibliographie

- Hild F. (2003) Mesure de champs de déplacement par corrélation d'images et applications en mécanique des solides ; notes de cours IPSI "Identification du comportement mécanique des matériaux et de la rupture des structures à l'aide de méthodes optiques" ; 82 p.
- Farruggia F. (1998) Détermination du comportement élastique d'un ensemble de fibres de bois à partir de son organisation cellulaire et d'essais mécaniques sous microscope ; thèse de doctorat de l'ENGREF, spécialité "Sciences forestières et du bois" ; 92 p.
- Farruggia F. and Perré P. (2000) Microscopic tensile tests in the transverse plane of earlywood and latewood parts of spruce, *Wood Science and Tech.*, **34**: 65-82
- Perré P. (2005) *MeshPore* : a software able to apply image-based meshing techniques to anisotropic and heterogeneous porous media, *Drying technology Journal*, **23**: 1993-2006
- Sun Z., Lyons J. S. and McNeill S. R. (1997) Measuring Microscopic Deformations with Digital Image Correlation, *Optics and Lasers in Engineering*, **27**: 409-428

Réalisation d'une cellule d'imagerie multimodale

Abdlatif Ben Moussa¹, Jean-Marie Bonny¹

Résumé : *Sur le centre Inra de Clermont-Ferrand, l'unité QuaPA (Qualité des produits animaux) a conçu et réalisé une cellule d'imagerie multimodale qui caractérise les myofibrilles, le gras et le collagène dans les tissus musculaires par imagerie de fluorescence, en utilisant les mesures par imagerie RMN et par macroscopie sur coupes histologiques comme références.*

Ce dispositif est adapté à l'observation en respectant les contraintes de chaque technique de mesure ; à savoir, la nécessité de couper l'échantillon à l'endroit exact où les images RMN ont été acquises pour l'imagerie de fluorescence, et de redécouper cette coupe en sous-parties dont le champ d'exploration est compatible pour l'étude histologique. De plus, la cellule multimodale dispose d'un ensemble de repères détectables par chaque méthode d'imagerie.

Nous présentons des images multimodales acquises utilisant cette cellule d'observation.

Mots clés : IRM, imagerie par résonance magnétique, macroscopie, histologie, fluorescence, muscle, qualité

Introduction

La tendreté de la viande est une qualité sensorielle et organoleptique recherchée par le consommateur (Grunert K.G., 1997). Cette qualité est en partie liée à la teneur en tissu conjonctif dans le muscle, muscle qui devient de la viande après l'abattage. Le tissu conjonctif est principalement composé de collagène. Les muscles connus pour être pauvres en collagène sont utilisés comme viande à griller (steak), les muscles connus pour être riches en collagène (muscles de l'avant de la carcasse) sont orientés par la filière industrielle vers des processus d'attendrissage physique (hachage) ou vers des préparations à cuisson longue, pour être commercialisé comme viande à braiser (pot au feu, bourguignon).

À court terme, l'objectif est de caractériser les myofibrilles, le gras et le collagène, par imagerie de fluorescence, en utilisant la mesure par imagerie IRM couplée avec les techniques d'imagerie macroscopique comme référence.

À long terme, l'objectif est de développer un système utilisant la propriété d'auto-fluorescence du collagène pour évaluer la quantité et la distribution du collagène dans le muscle. Ce système permettra de trier et d'orienter automatiquement les muscles vers une destination de viande à griller pour les plus pauvres en collagène, ou vers des procédés technologiques pour les plus riches en collagène.

Pour parvenir à ces objectifs, 3 équipes de l'unité QuaPA ont travaillé en synergie, pour trouver la meilleure combinaison d'images acquises par imagerie de fluorescence et pour

¹ INRA-UR370-QuaPA, Qualité des produits animaux, structures tissulaires et interactions moléculaires –
F-63122 Saint-Genès-Champanelle ☎ 04 73 62 41 74 ✉ abmoussa@clermont.inra.fr

distinguer les 3 différents composés du muscle afin de connaître leur distribution, en se référant aux images IRM et histologiques.

Pour cela, nous avons conçu et réalisé une cellule de mesure par imagerie multimodale afin de conditionner les muscles à étudier et de préserver la fidélité des conditions de mesure dans chacune des 3 modalités mises en œuvre.

1. Matériel et méthodes

L'unité QuaPA a mis en commun les compétences de ses 3 équipes :

- l'équipe STIM (Structures tissulaires et interactions moléculaires) qui utilise l'outil IRM pour obtenir des images paramétriques des différents composés ;
- l'équipe M2H (Microscopie-Histologie-Histochimie) qui identifie les composés selon différentes techniques de coloration sur des coupes histologiques ;
- l'équipe BIOP (Biophysique) qui souhaite valider son banc de mesure par imagerie de fluorescence frontale.

Les techniques IRM et celles employées sur les coupes histologiques sont complémentaires et permettent en les combinant d'étalonner le banc d'imagerie par fluorescence. Après traitement, le banc d'imagerie par fluorescence fournira rapidement des résultats exploitables liés à la structure et aux propriétés de l'échantillon de muscle observé.

1.1 Les 3 modalités d'imageries

L'imagerie par résonance magnétique nucléaire IRM est une technique de mesure quantitative, non invasive et non destructive, l'échantillon ne subit ni décomposition, ni altération durant l'analyse. L'IRM est un moyen pour visualiser de manière sélective le gras, le réseau conjonctif, l'eau exsudée entre les faisceaux de fibres musculaires (myofibres), à l'échelle macroscopique ($\approx 500 \mu\text{m}$).

L'équipement utilisé est un supraconducteur horizontal "Biospec" de 4,7 Teslas, piloté par une console "Avance 200" du fabricant Bruker. L'acquisition des images se fait par l'association du système de gradient d'imagerie BGA-12 et de la sonde volumique de type "birdcage" qui résonne à la fréquence du proton ^1H . La première séquence d'acquisition d'images est la séquence dite "CSS-IR" (Chemical shift selective-inversion recovery) pour la détection spécifique du tissu adipeux (Laurent W. *et al*, 2000) et la seconde séquence est une séquence "pondérée en susceptibilité" (Bonny J.M. *et al*, 2001) pour mettre en évidence le tissu conjonctif complet (collagène, élastine et gras).

L'imagerie macroscopique par histologie est une méthode fiable qui offre une grande résolution, cependant, elle est destructive. Elle fournit des images sur la répartition des composés, à l'échelle macroscopique (Labas R. *et al*, 2001).

Après la cryofixation et la confection des coupes, on procède à la coloration. Le tissu conjonctif est mis en évidence avec le rouge Sirius, les myofibres sont identifiées avec l'hématoxyline éosine et les lipides ressortent en rouge avec la coloration "red oil".

L'acquisition d'images est réalisée à l'aide d'une caméra analogique noir et blanc JAI CV-M300 fixée sur un banc de reproduction, couplée à un objectif macroscopique Micro-Nikon 60 mm f/2,8 D (Nikon, Japon). L'ensemble est relié à une carte d'acquisition pilotée par un micro-ordinateur. La quantification des surfaces occupées par le collagène ou par les lipides est réalisée avec le logiciel Visilog (Noesis).

L'imagerie de fluorescence frontale est une technique légère qui montre les spectres des différents composés du muscle, mesurés sous différentes conditions d'excitation et observés à des longueurs d'onde d'émission supérieures aux longueur d'onde d'excitation. Le but est d'obtenir 3 images à l'échelle macroscopique qui résultent d'une excitation à une longueur d'onde correspondant à l'excitation de chacun des trois composés que l'on souhaite visualiser.

Les couples longueur d'onde d'excitation et longueur d'onde d'émission optimaux de caractérisation des trois principaux composés sont respectivement de 290/332 nm pour les myofibrilles, 322/440 nm pour le gras et 380/440 nm pour le tissu conjonctif (Skjervold *et al*, 2003). Le dispositif utilisé est un système d'imagerie multi spectral développé dans l'unité QuaPA (Abouelkaram S. *et al*, 2006). Ce banc optique utilise une caméra numérique sensible aux rayonnements U.V. (Sony XCD-SX900UV), une source polychromatique (lampe Xénon à arc) et 2 monochromateurs pour sélectionner les longueurs d'ondes d'excitation et les longueurs d'onde d'émission diffusée par l'échantillon irradiée.

Cette technique a l'avantage d'être facile à mettre en œuvre et de donner une réponse rapide, malgré l'incertitude et la précision de la mesure.

1.2 Contraintes techniques

Les contraintes sont principalement liées à chaque méthode de mesure et aux dimensions des échantillons. Puisque l'IRM ne modifie pas l'échantillon et restitue des images dans le volume, cette méthode est la première phase de mesure. Ensuite, la méthode la moins destructive entre la fluorescence et la macroscopie sur coupes histologiques est la fluorescence, donc par élimination, la seconde phase de mesure est l'imagerie par fluorescence et la dernière phase de mesure est la macroscopie sur coupes histologiques.

La première phase, consiste à observer simultanément par IRM deux coupes à l'intérieur de deux muscles selon un axe de vision et un sens préalablement repérés. Après découpage des muscles suivant les deux coupes, la phase suivante est de caractériser par imagerie de fluorescence les mêmes faces analysées par IRM. Finalement, les 4 tranches étudiées sont divisées en 4 cubes, préparés pour la phase d'imagerie macroscopique sur coupes histologiques.

En IRM, la taille des échantillons de muscle est donnée par le champ de vision de la sonde RMN et de la charge (liée au couplage), soit au maximum $8 \times 4 \times 4 \text{ cm}^3$. Pour l'imagerie de fluorescence, les échantillons de $5 \times 4,5 \times 2 \text{ cm}^3$ au maximum, sont conditionnés dans un support ouvert sur le dessus, en plastique de forme rectangulaire. Pour l'imagerie par histologie, la dimension des coupes admissibles est de $2 \times 2 \text{ cm}^2$.

La solution proposée est d'étudier simultanément 2 morceaux de muscles de $4 \times 4 \times 4 \text{ cm}^3$, placés dans un compartiment et isolés l'un de l'autre, par cycle de mesure.

La cellule sera donc composée de 2 compartiments de $4 \times 4 \times 4 \text{ cm}^3$ pour répondre à cette contrainte. De plus, puisque l'environnement RMN présente des champs magnétiques intenses, la cellule ne sera composée que de matière amagnétique, comme les plastiques.

1.3 Étude conceptuelle et technique

Le but est de concevoir un système d'investigation par imagerie multimodale qui tienne compte des contraintes énumérées précédemment. Il s'agit d'un dispositif technique adapté aux 3 méthodes de mesure (IRM, fluorescence, histologie), qui conserve les propriétés des

échantillons à l'issue des mesures et qui respecte les contraintes de chaque phase de mesure. La cellule multimodale doit assurer la reproductibilité de l'orientation et des distances entre les deux prélèvements, ainsi que la fidélité des conditions de mesure, afin que les cartographies issues des 3 méthodes de mesure soient comparables. On souhaite arriver à des échantillons de surface $2 \times 2 \text{ cm}^2$ pour l'histologie, à partir de 2 échantillons de $4 \times 4 \times 4 \text{ cm}^3$ conditionné, permis par l'IRM.

L'idée est de réaliser un dispositif qui a l'aspect d'un bloc élémentaire, pouvant être divisible en plusieurs éléments, en autant d'éléments que de sous échantillons. Concrètement, un montage mécanique qui est solidarisé à l'aide de visseries, pour l'observation en IRM, qui se découpe en 6 parties, comme l'échantillon. La **figure 1** illustre une vue éclatée du dispositif.

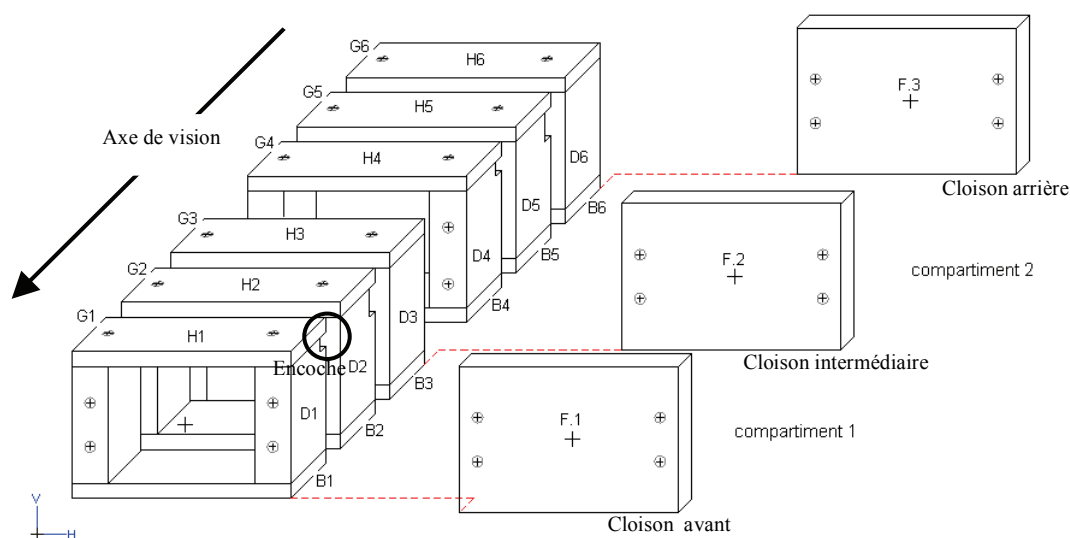


Figure 1 : vue éclatée de la cellule d'imagerie multimodale

Chaque élément du montage est référencé par une lettre suivie d'un chiffre, afin de faciliter le montage. La lettre désigne la face, et le chiffre l'ordre dans son rang.

Les références F1 et F3 représentent les cloisons avant et arrière, F2 la cloison intermédiaire, D0 à D6 les 6 montants du côté droit, G0 à G6 les 6 montants du côté gauche, H0 à H6 les 6 faces du haut et B0 à B6 les 6 faces du bas. Ainsi, le compartiment "1" se trouve entre les pièces F1 et F2, tandis que le compartiment "2" se trouve entre F2 et F3. L'ensemble composé des éléments G, D, H, B portant l'indice "1" est appelé un cadre, le dispositif est donc composé de 6 cadres.

Des encoches de tailles différentes suffisent pour pouvoir repérer les éléments dans l'espace (3D), en macroscopie et histologie, comme en imagerie de fluorescence, et même en imagerie IRM, puisque l'eau exsudée des muscles, en comblant ces espaces libres, apparaît sur les images en hyper signal. Cependant, il est nécessaire de se fixer par convention l'axe de vision des tranches à étudier, pour cela, des flèches sont dessinées dans le sens F3 vers F1 afin d'éviter toutes erreurs de positionnement.

1.4 Réalisation et essais

Les différentes pièces sont réalisées dans nos ateliers. La matière première pour la fabrication est le polyoxyméthylène (POM), familièrement appelé le "delrin". Le POM est

amagnétique et grâce à sa structure et à sa haute cristallinité, il offre une bonne résistance aux agents chimiques, une excellente stabilité dimensionnelle, une bonne isolation électrique et une large plage de température d'utilisation.

Comme l'illustre la **figure 2**, le parallélépipède rectangle de 60 x 48 mm qui représente un cadre, s'inscrit dans un cercle correspondant au diamètre interne de la sonde volumique RMN (72 mm de diamètre). La largeur des cadres est de 13,3 mm, qui correspond à une tranche. Le maintien de l'ensemble des cadres est réalisé à l'aide de 4 tiges filetées en nylon (M3). À cause du diamètre de ces tiges, il a été nécessaire d'utiliser des montants de 10 mm d'épaisseur. Les montants et les arêtes sont assemblés à l'aide de vis à tête fraisée en nylon.

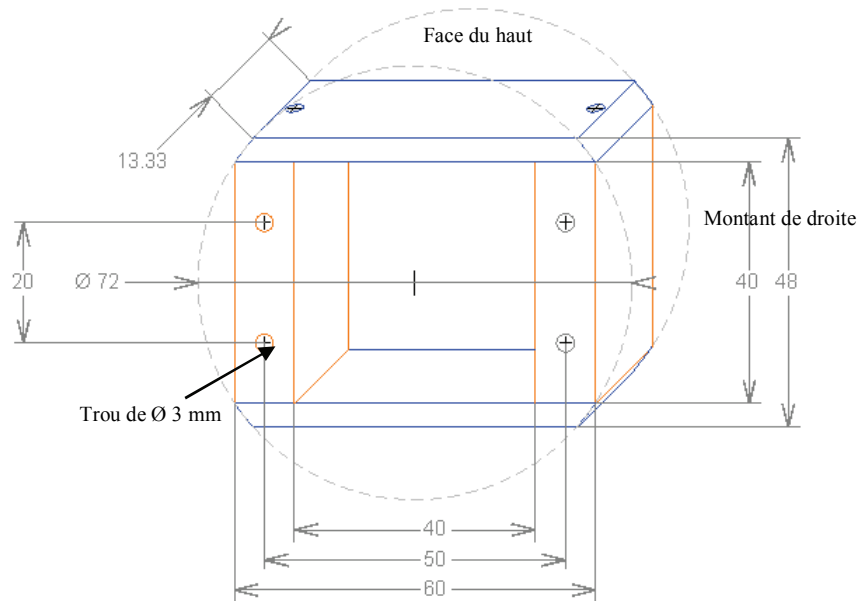


Figure 2 : cadre de la cellule d'imagerie multimodale

Pour séparer et isoler les 2 muscles à étudier, nous avons réalisé 3 cloisons de 60 x 40 mm et de 5 mm d'épaisseur (**figure 3**). Nous avons percé des trous pour glisser les 4 tiges filetées en nylon afin d'unifier les 6 cadres et les 3 cloisons, à l'aide de 8 écrous serrés de part et d'autre de la cellule.

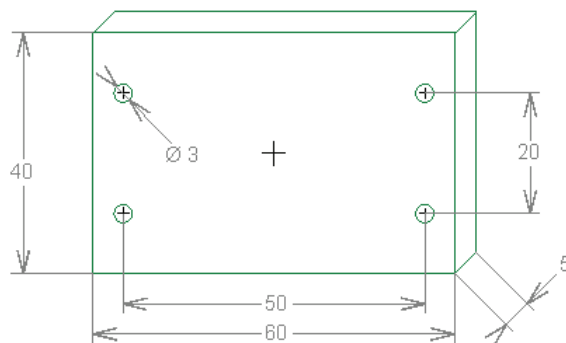


Figure 3 : cloison de la cellule d'imagerie multimodale

Pour faciliter la découpe des muscles, il a été nécessaire de réaliser un dispositif supplémentaire qui maintient en pression l'ensemble des cadres et des cloisons, comme un

étau, avec une partie fixe (mord fixe) et une autre mobile (mord mobile) qui peut être verrouillée en translation. Ainsi, les tranches peuvent être découpées à l'aide d'une lame très fine, en se guidant avec les montants, après avoir retiré les 4 tiges filetées. Finalement, on est assuré d'avoir les mêmes faces à analyser. La **figure 4** illustre ce plateau de découpage et ses fonctionnalités.

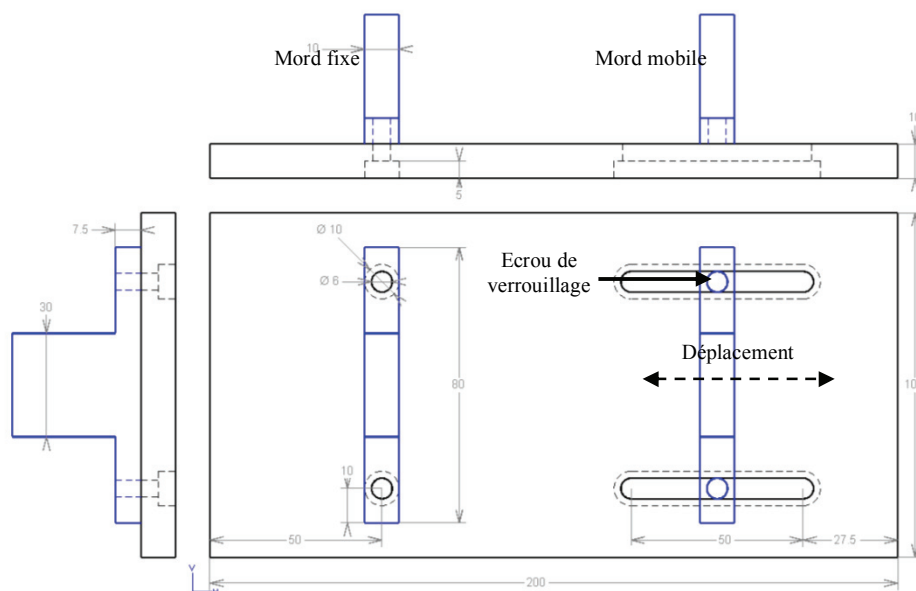


Figure 4 : plateau de découpage des muscles

On numérote les éléments avec un jeu de marque alphanumérique à frapper. Une fois la cellule montée, on a arrondi les angles de la cellule avec de la toile émeri sur une surface plane pour ajuster ses dimensions afin qu'elle puisse rentrer et se positionner dans la sonde volumique RMN.

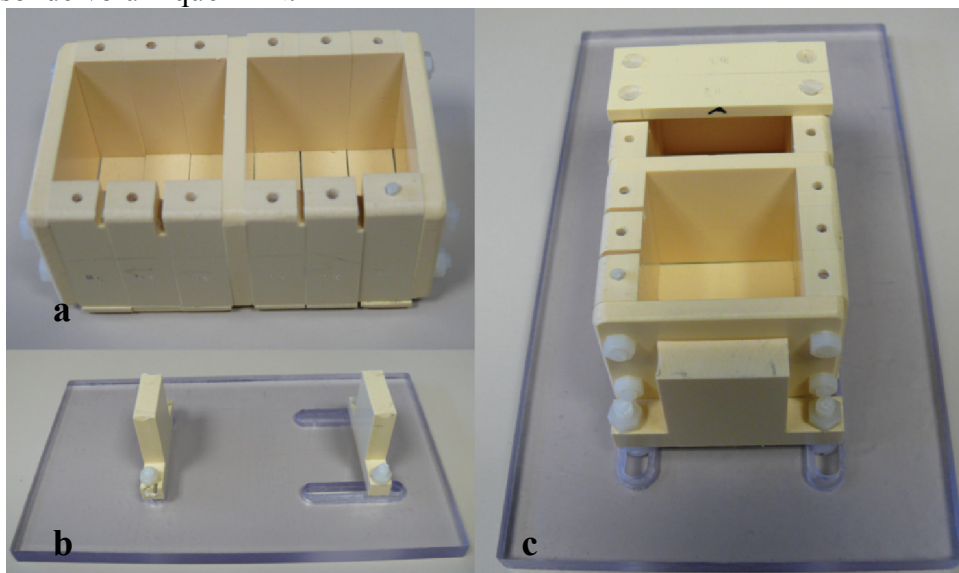


Figure 5 -photo © A .Ben Moussa/Inra : vue intérieure de la cellule multimodale (a), le plateau de découpage (b) et la cellule intercalée dans le plateau (c)

La **figure 5** illustre la réalisation de la cellule d'imagerie multimodale et son plateau de découpage. Pour valider la cellule d'imagerie multimodale et pour définir un protocole

d'utilisation, nous avons exécuté les différentes étapes avec un muscle. *A priori*, les exigences du cahier des charges sont respectées, mais l'erreur introduite par la découpe des tranches entre les modalités n'est pas quantifiable. Le traitement de ces images (recalage) nous donnera une estimation de cette erreur.

1.5 Procédure de mise en œuvre

La procédure d'utilisation s'exécute dans l'ordre des mesures et de la façon suivante:

Phase 1. Imagerie par IRM

Les faces du haut de la cellule (H1 à H6) sont ôtées pour introduire les 2 échantillons de muscle de $4 \times 4 \times 4 \text{ cm}^3$ dans leur compartiment respectif. Ensuite, la cellule est refermée et placée dans la sonde RMN, pour une durée d'acquisition de 10 heures, sur 2 coupes virtuelles de chaque échantillon en respectant l'axe de vision et son sens.

Phase 2. Imagerie par fluorescence

Après avoir intercalé le dispositif entre les mords du plateau de découpage, l'utilisateur procède au découpage des muscles avec une lame très fine et en se servant des montants comme guides pour que la coupe soit droite et nette. Ainsi, les 2 échantillons de muscle sont découpés dans le même plan que les coupes virtuelles IRM et sont prédisposés dans leurs cadres. Les faces correspondantes aux coupes précédemment étudiées en IRM sont alors positionnées sur le banc d'imagerie par auto fluorescence pour réaliser les acquisitions d'images.

Phase 3. Imagerie par histologie

La taille des tranches n'étant pas compatible avec la méthode histologique, chacune d'elles est partagée en 4 parts égales de 2 cm de côté et toujours dans ces mêmes cadres. On réalise les colorations et les acquisitions d'images sur chaque morceau.

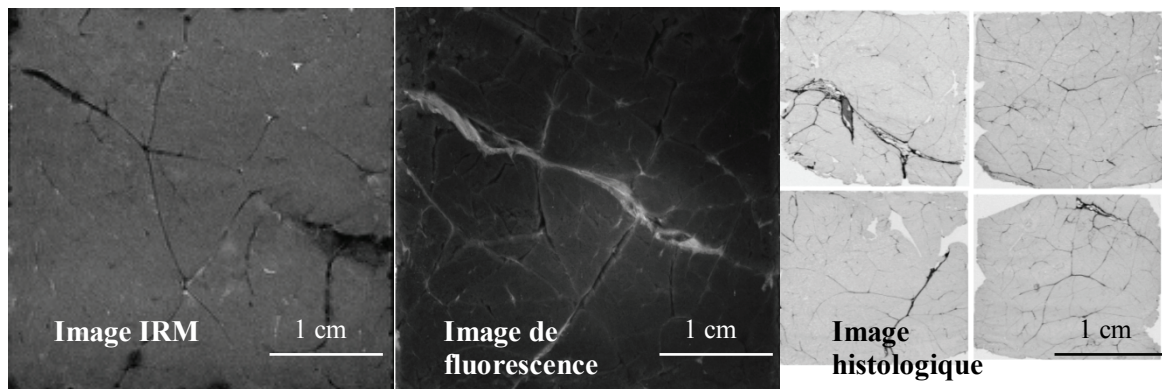


Figure 6 : images du collagène d'un muscle de type *semitendinosus*

2. Résultats et discussions

D'après les images acquises selon les 3 modalités (**figure 6**) qui montrent la répartition du collagène dans un muscle de type *semitendinosus* (riche en collagène), on observe bien une similitude entre l'image IRM et l'image de fluorescence. En revanche, la comparaison avec l'image histologique est plus difficile. Du fait que cette image soit reconstruite à partir de 4 images, on perd beaucoup d'information sur les contours, cela se traduit par des zones blanches sur l'image reconstituée. Malgré tout, on observe bien une similitude entre ces 3 techniques. Les 3 images acquises selon ces 3 modalités représentent bien la même coupe de muscle.

Les résultats issus des premiers essais démontrent que la cellule offre la précision attendue par les utilisateurs et qu'elle préserve la fidélité des conditions de mesure entre chaque modalité à condition de respecter avec rigueur le protocole d'utilisation pour garantir ses qualités, de plus, ce dispositif est simple de mise en œuvre.

Conclusion

La cellule d'imagerie réalisée respecte bien les contraintes fixées par chacune des 3 modalités, et d'après les résultats obtenus, nous avons bien des images restituées qui rendent compte de la même coupe avec une erreur négligeable.

Grâce à cette cellule d'imagerie multimodale, nous avons acquis des images provenant de chacune des modalités et elles sont comparables entre-elles, en termes de distribution du collagène, du gras et des myofibres. Ces images sont en cours de traitement et d'analyse, afin de corréliser les mesures de fluorescence avec celles de l'IRM et de l'histologie, l'objectif final étant la validation de l'imagerie de fluorescence comme outil de quantification des principaux constituants du muscle.

Bibliographie

- Abouelkaram S., Chauvet S., Strydom P., Bertrand D., and Damez J.L. (2006) Muscle study with multispectral image analysis. 52nd International Congress of Meat Science and technology (ICoMST), 669-670
- Bonny J.M., Laurent W., Labas R., Taylor R., Berge P. and Renou J.P. (2001) Magnetic resonance imaging of connective tissue: a non-destructive method for characterizing muscle structure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Volume 81 (Issue 3) 295-370
- Grunert K. G. (1997) What's in a steak? A cross-cultural study on the quality perception of beef. *Food Quality and Preference*, Volume 8 (3) 157-174
- Labas R., Maunier L., Chanier L., Collignon H., Taylor R. (2001) Etude histologique de la structure des muscles de bovins en relation avec la qualité des viandes. Approche par traitement d'images. *Rev. Fr. Histotechnol.*, 14 (1) 69-78
- Laurent W., Bonny J.M. and Renou J.P. (2000) Imaging of water and fat fractions in high-field MRI with multiple slice chemical shift-selective inversion recovery. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, Série 12, 488-496
- Skjervold P.O., Taylor R.G., Wold J.P., Berge P., Abouelkaram S., Culioli J., Dufour E. (2003) Development of intrinsic fluorescent multispectral imagery specific for fat, connective tissue and myofibers in meat. *Journal of food science*, Volume 68 (Issue 4) 1161-1168

Chapitre II

Mise au point de protocoles d'acquisition



Caractérisation d'émulsions et de suspensions par analyse d'images vidéo

Bruno Novales¹, Patrice Papineau¹, Alain Sire¹, Monique Axelos¹

Résumé : *L'objectif de cet article est de présenter un système de suivi de la stabilité des émulsions et des suspensions par analyse d'image, développé au laboratoire BIA du centre Inra de Nantes. Émulsions et suspensions sont des systèmes instables dont la déstabilisation est associée à deux types de mécanismes : la séparation de phases sous l'effet de la gravité (crémage ou sédimentation) et la modification de la taille des particules (coalescence, mûrissement, floculation). Ces phénomènes peuvent conduire à des altérations significatives des produits finaux et il est donc important de les détecter rapidement. Le système de suivi présenté ici comporte un dispositif d'acquisition couplé à une chaîne de traitements d'images. Trois échantillons peuvent être analysés simultanément. Il permet une analyse rapide et non-invasive des produits. Les volumes des différentes phases constitutives des émulsions (ou des suspensions) peuvent être obtenues et il est ainsi possible de déterminer les cinétiques de crémage et de coalescence.*

Mots clefs : stabilité, émulsions, suspensions, crémage, coalescence

Introduction

Les émulsions forment la base d'une large gamme de produits manufacturés aussi bien dans le domaine alimentaire (lait, crème, mayonnaise, beurre etc.) qu'en pharmacie, en agrochimie ou encore en cosmétologie. Elles sont constituées d'au moins deux liquides non-miscibles, l'un étant dispersé dans l'autre sous forme de gouttelettes. Dans le cas le plus simple les deux liquides sont de l'huile et de l'eau. Le liquide qui n'est pas dispersé est alors appelé phase continue.

Les émulsions sont par définition des systèmes instables qui peuvent se déstabiliser suivant plusieurs mécanismes réversibles ou non. Parmi ces mécanismes, les deux principaux sont le crémage (ou la sédimentation suivant les densités relatives des deux liquides) et la coalescence. Le crémage correspond à la migration des gouttelettes vers le haut sous l'effet de la gravité ce qui est dû aux différences de densités des deux phases, dispersée et continue. La sédimentation correspond au même phénomène mais dans ce cas, les gouttelettes migrent vers le bas. La coalescence correspond à la fusion de deux gouttelettes pour en former une plus grosse.

Les différents phénomènes de déstabilisation se traduisent par des modifications à la fois de la taille et du nombre de gouttelettes présentes dans l'émulsion et par des modifications de l'aspect macroscopique des émulsions. On peut ainsi observer des états allant d'une dispersion parfaitement uniforme à une complète séparation des deux phases. Ces phénomènes induisent des modifications de la structure physique des émulsions. Ces modifications peuvent affecter les propriétés de l'émulsion.

L'étude de la stabilité des émulsions est donc primordiale pour comprendre les paramètres permettant d'obtenir des systèmes répondant à des critères de stabilité définis *a priori*.

¹ INRA UR1268 Biopolymères, Interactions Assemblages (URBIA) – F-44316 Nantes
☎ 02 40 67 51 98 ✉ bruno.novales@nantes.inra.fr

Différentes méthodes ont été proposées pour suivre la déstabilisation d'émulsions incluant des mesures de conductivités (Guéguen *et al.*, 1996), de turbidité (Al-Malah *et al.*, 2000) ou encore des techniques ultrasonores (Dickinson *et al.*, 1997).

Au laboratoire BIA, nous avons développé un système de suivi de la stabilité des émulsions par vision artificielle. Cette méthode présente l'avantage d'être non-invasive et non-destructive. Le système comprend un équipement ultrasonore pour préparer les émulsions *in situ* et une caméra CCD pour l'acquisition d'images couleurs. Trois échantillons peuvent être étudiés simultanément dans un bain contrôlé en température de 5 à 70 °C. Nous avons développé au laboratoire un logiciel qui permet l'acquisition rapide d'images et leur traitement. En acquérant des séquences d'images au cours de la déstabilisation des émulsions, il est possible d'obtenir les cinétiques de crémage et de coalescence des émulsions.

1. Description du système d'acquisition et de traitement d'images

La **figure 1** montre le système d'acquisition développé au laboratoire. Un bain thermostaté (Huber) permet de contrôler la température de 5 à 65° C. L'équipement ultrasonore pour préparer les émulsions est incorporé dans le système afin de préparer les émulsions *in situ*. Dans sa configuration actuelle, ce système permet le suivi de 3 émulsions simultanément. On prépare les émulsions dans des tubes en verre de 2,2 cm diamètre interne. Les images sont automatiquement enregistrées sur un PC. Le système de vision artificielle pour le suivi de la stabilité des émulsions développé au laboratoire comprend une caméra 3CCD (Hamamatsu Photonics France) équipée d'un zoom 16 mm (Cosmicar) permettant d'acquérir des images en couleur. Les images sont digitalisées en 512 x 512 pixels avec des intensités de niveaux de gris allant de 0 (pour le noir) à 255 (pour le blanc) pour chaque canal (Rouge, Vert et Bleu).

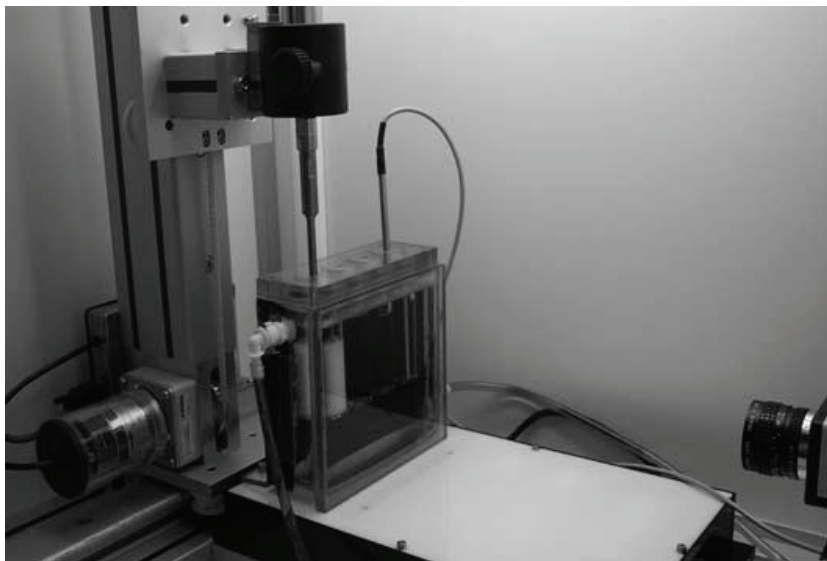


Figure 1 : *dispositif expérimental montrant :*
- la sonde ultrasonore pour la préparation *in situ* des émulsions,
- les trois tubes-échantillons dans le bain contrôlé en température,
- la caméra CCD pour l'acquisition des images.

L'algorithme d'analyse d'images est basé sur les variations de niveaux de gris observés dans les images qui sont des indicateurs des phénomènes de déstabilisation se produisant dans les émulsions. En effet, comme nous disposons d'un fond noir pour acquérir nos images, une phase claire dans l'émulsion se traduit par des niveaux de gris plus faibles. Inversement, une phase concentrée (les émulsions ayant un aspect laiteux) se traduira par de plus grandes

intensités de niveaux de gris. Pour des émulsions H/E, le crémage conduit à la formation d'une phase aqueuse claire voire transparente au fond du tube et la coalescence à l'apparition d'une couche huileuse transparente à la surface de l'émulsion. Ces deux phases correspondront donc à des niveaux de gris faibles alors qu'une émulsion homogène présentera des niveaux de gris élevés. Avant cette séparation de phases, les variations de niveaux de gris d'un point particulier dans l'émulsion seront des indicateurs de la migration des gouttelettes dans l'émulsion.

A partir des images, on extrait les intensités de niveaux de gris moyennes observées pour chaque ligne dans l'émulsion (depuis le fond du tube jusqu'au sommet de l'émulsion) pour obtenir des profils d'intensités. En examinant les variations de ces profils au cours du temps, il est possible de calculer les volumes des phases présentes dans l'émulsion (phase aqueuse, phase crémée et phase huileuse relarguée). L'algorithme est basé sur les changements de pente dans les profils d'intensité. La moyenne de la pente de la courbe d'intensité est calculée sur plusieurs points. La séparation entre deux phases est considérée comme correspondant au point de plus forte pente dans le profil.

2. Suivi de la stabilité d'une émulsion

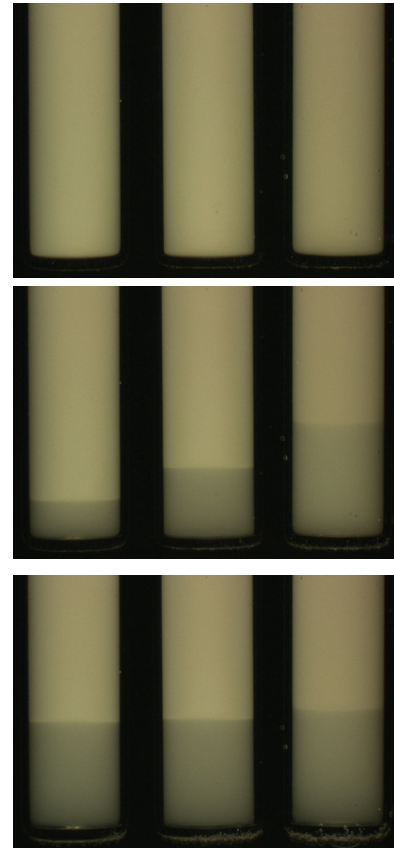


Figure 2 : images d'émulsions en cours de déstabilisation

Les tubes de la gauche vers la droite correspondent à des concentrations en émulsifiants de 0,75 g/l, 0,50 g/l et 0,25 g/l.

Les images ont été enregistrées :

- juste après émulsification (haut),
- 1 heure après (milieu),
- 16 heures après (bas).

Nous avons préparé les émulsions présentées à partir de solutions de méthylcellulose à différentes concentrations et d'hexadécane pour l'huile. La **figure 2** montre un exemple d'images obtenues avec notre système. Ces émulsions ont été préparées avec 3 concentrations différentes en émulsifiants (0,75 g/l, 0,50 g/l et 0,25 g/l de la gauche vers la droite). L'image du haut a été enregistrée juste après la fabrication de l'émulsion. Les trois émulsions sont visuellement uniformes. L'image du centre a été acquise 1 heure après la fabrication de l'émulsion. Pour les trois émulsions, on observe du crémage qui entraîne une séparation de phases avec la phase crémée riche en gouttelettes en haut de l'émulsion et la phase aqueuse relarguée au fond du tube. Le crémage est d'autant plus rapide que la concentration diminue. Au bout de 16 heures (image du bas), les trois émulsions présentent approximativement les mêmes volumes de phase crémée et aqueuse.

La **figure 3** montre les profils de niveaux de gris observés pour l'émulsion la plus concentrée à différents temps. La partie gauche de la figure correspond au fond du tube, celle de droite correspondant au haut du tube.

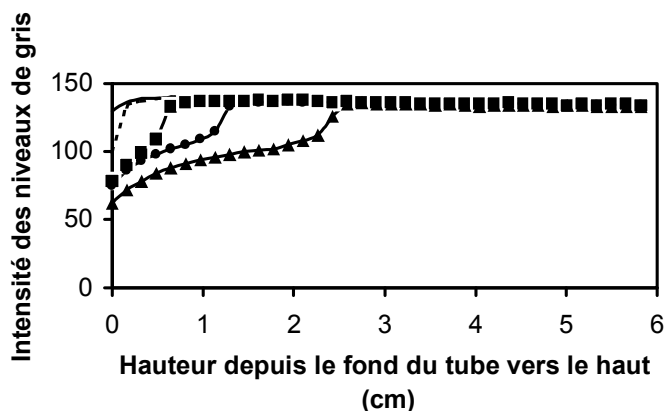


Figure 3 : évolution des profils de niveaux de gris pour une émulsion à 0,75 g/l d'émulsifiant pour $t=0$ (—), $t=15$ min (---), $t=1$ h (■), $t=2$ h (●) et $t=16$ h (▲).

Juste après avoir été émulsifiées, les émulsions sont homogènes et les intensités observées le long du tube sont constantes. Avec le temps, on observe une décroissance des niveaux de gris dans le fond du tube. Les gouttelettes d'émulsions remontent sous l'effet du crémage et une phase aqueuse de plus en plus claire apparaît au fond du tube. L'intérêt de la méthode est que la détection de la décroissance des niveaux de gris se produit bien avant que l'effet du crémage soit visible au niveau macroscopique. Le volume de cette phase aqueuse augmente avec le temps ce qui au niveau des profils se traduit par un décalage vers la droite des valeurs décroissantes et une pente de plus en plus raide des profils. Il est ainsi très facile de déterminer les volumes de phase aqueuse et crémée à tout moment.

On obtient alors les cinétiques de crémage comme sur la **figure 4**.

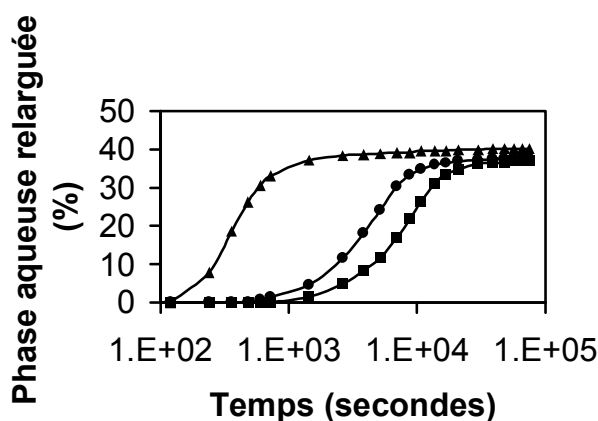


Figure 4 : cinétique de crémage pour des émulsions à 0,25 (▲), 0,50 (●) et 0,75 g/L (■) d'émulsifiant

On peut obtenir de la même manière la cinétique de coalescence. Dans ce cas là, on observe l'apparition d'une phase claire au sommet de l'émulsion correspondant à la formation d'une couche d'huile.

3. Sédimentation de particules en suspension

Pour la préparation des suspensions, du carbonate de calcium a été dispersé dans de l'eau pure par ultrasons. La **figure 5** montre des images prises au cours de la cinétique de sédimentation ainsi que les profils d'intensités correspondant à ces images. Au temps $t=0$, la dispersion apparaît parfaitement uniforme ce qui donne sur le profil de niveaux de gris une ligne horizontale de niveaux constants comme le montre l'image de gauche et son profil. La sédimentation des particules se produit après un temps relativement court et conduit à la formation d'une couche d'eau en haut du tube et une phase sédimentée au fond. Comme la phase aqueuse relarguée est parfaitement claire, les profils correspondants sont très pentus et la séparation de phase est facile à identifier. On considère alors le front de sédimentation comme correspondant au point de plus forte pente de la courbe. La cinétique de sédimentation est alors facilement déterminable.

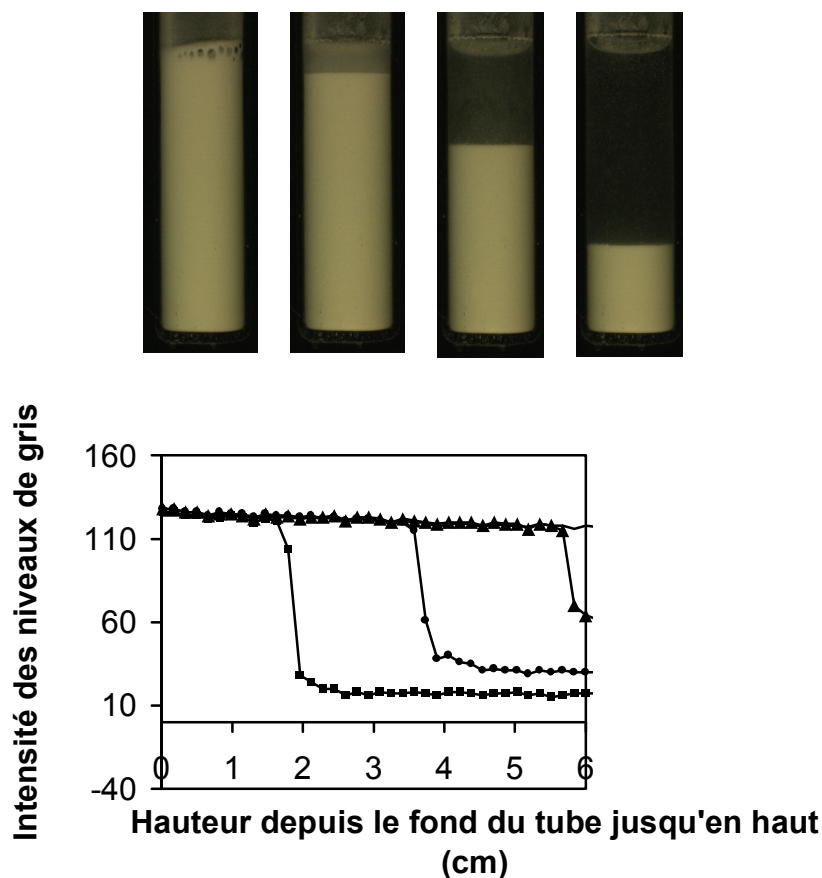


Figure 5 : Images d'une suspension en cours de sédimentation et profils de niveaux de gris associés $t=0$ (—), $t=30$ sec (\blacktriangle), $t=2$ min (\bullet) et $t=10$ min (\blacksquare)

Conclusion

Ce système de vision artificielle pour le suivi de la stabilité des émulsions et des suspensions permet une analyse rapide et non-invasive. Un des principaux avantages de cette méthode est qu'elle ne nécessite aucune connaissance *a priori* sur l'émulsion (ou la suspension) ou sur ses constituants pour obtenir les cinétiques de déstabilisation. Le système est maintenant utilisé en routine au laboratoire pour l'étude de la stabilité d'émulsions tant directes qu'inverses et de suspensions et il a fait l'objet d'une publication (Navales *et al.*, 2003).

Bibliographie

- Al-Malah K.I., Azzam M.O.J., Omari R.M. (2000) Emulsifying properties of BSA in different vegetable oil emulsions using conductivity technique. *Food Hydrocolloids*, 14: 485-490
- Dickinson E., Golding M., Povey M.J.W. (1997) Creaming and flocculation of oil-in-water emulsions containing sodium caseinate. *J. Colloid Interface Sci.* 185: 515-529
- Gueguen J., Popineau Y., Anisimova I.N., Fido R.J., Shewry P.R., Tatham A.S., J. Agric. (1996) Functionality of the 2S albumin Seed Storage Proteins from Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Food Chem.* 44: 1184-1189
- Hibberd D., Robinson B.H., Robins M.M. (1999) Ultrasonic characterization of colloidal dispersions: detection of flocculation and adsorbed layers. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* 12: 359-371
- Novalés B., Papineau P., Sire A., Axelos M.A.V. (2003) Characterization of emulsions and suspensions by video image analysis, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 221: 81-89

Suivi de fermentation de la pâte à pain par imagerie

Anne-Laure Réguerre¹, Hubert Chiron¹, Aamir Shehzad¹ et Guy Della Valle¹

Résumé : *Afin de comprendre l'obtention de la structure de la mie de pain, au centre Inra de Nantes, nous étudions l'évolution de la pâte au cours la fermentation, une étape essentielle de la panification. Dans ce contexte, nous avons mis au point un outil de suivi du volume de la pâte par imagerie. Les résultats ainsi obtenus sont confrontés à ceux issus d'un suivi à une échelle microscopique par tomographie aux rayons X. Les résultats sont cohérents aux deux échelles. L'accroissement de volume observé au niveau macroscopique est lié aux phénomènes microscopiques tels que nucléation, croissance et coalescence des alvéoles. Nous disposons ainsi d'un outil simple et robuste, utilisable systématiquement pour caractériser cette étape de la panification.*

Mots clés : Imagerie, pain, fermentation, structure 3D, alvéoles

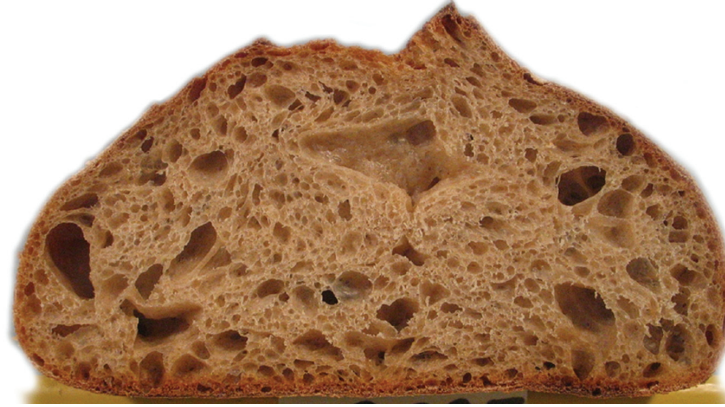


Photo © H. Chiron/ Inra

Introduction

Au centre Inra de Nantes, l'équipe MC2 (matériaux création et comportement) de l'unité de recherche BIA (biopolymères, interactions et assemblages), étudie la structure et les propriétés de produits céréaliers. La mie du pain est assimilée à un solide alvéolaire dont nous caractérisons la texture par imagerie (Devaux *et al.*, 2005) pour en établir les liens avec la composition (Rouillé *et al.*, 2005). Cette structure alvéolaire est élaborée pendant la panification (**encadré**), principalement lors de la conduite de l'étape de fermentation, puis figée durant la cuisson.

Les phénomènes biochimiques, consommation de sucres par les levures et accumulation de dioxyde de carbone, provoquent la croissance et la coalescence des alvéoles, phénomènes qui se traduisent par une augmentation du volume de la pâte et donc de sa porosité.

Nous avons mis au point un outil pour évaluer l'expansion de la pâte au moyen d'une caméra numérique et d'analyse d'images. Nous décrivons cet outil et son utilisation pour déterminer les cinétiques de fermentation obtenues dans quatre conditions différentes. Celles-ci sont comparées à des résultats obtenus à l'échelle microscopique par tomographie aux rayons X (RX).

¹ UR 1268 Biopolymères, Interactions & Assemblages, INRA-URBIA - F-44316 Nantes

☎ 02 40 67 52 17 ✉ Anne-Laure.Reguerre@nantes.inra.fr

La panification

La fabrication du pain nécessite une adéquation entre la formulation, l'ordonnancement des étapes unitaires du processus et le niveau de mécanisation.

Le boulanger opte selon le standard de pain souhaité pour une intensité de pétrissage plus ou moins grande et sur une mise en forme avec ou sans moule.

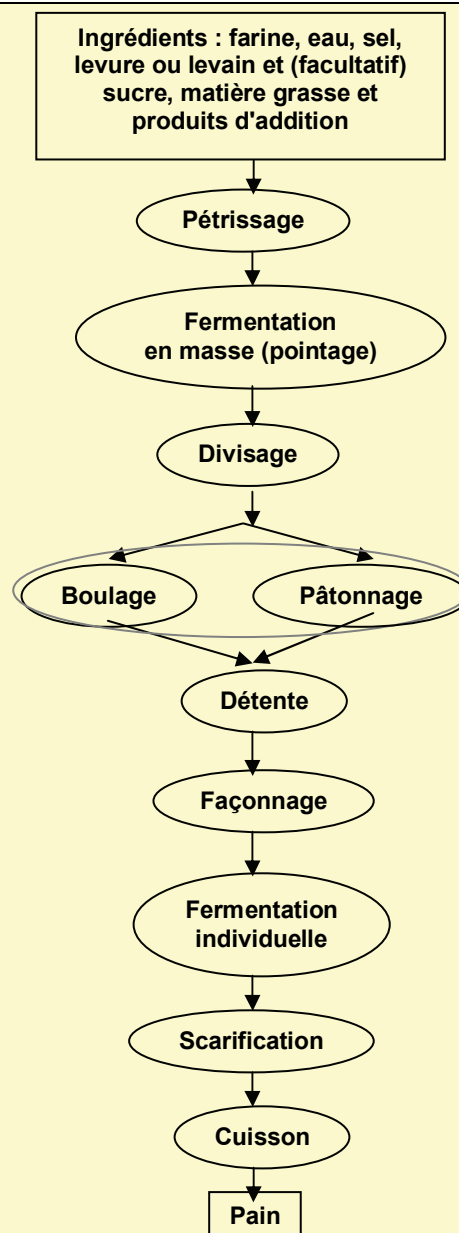
Les conduites de fermentation qui impactent fortement les caractéristiques gustatives oscillent entre deux et douze heures. En dernier lieu, le choix de la courbe de cuisson génère soit un pain à double texture type baguette soit un pain moelleux type pain de mie.

Finalement le choix du procédé conduit à un produit fini qui se caractérise par des propriétés organoleptiques directement liées à sa structure alvéolaire. Les travaux de l'équipe MC2 du centre Inra de Nantes, permettent de caractériser instrumentalement les propriétés mécaniques de cet aliment.



Photo © H. Chiron/Inra

Photo © G. Briand/Inra



1. Présentation de l'outil de suivi de la fermentation

1.1 Matériel

1.1.a Acquisition des images

L'opérateur prélève un morceau de pâte (30 g) après le pétrissage et place ce pâton immédiatement dans une étuve à température et humidité contrôlées, fermée par une porte transparente. Nous filmons l'expansion du pâton due à la fermentation avec une caméra numérique JVC KY-F75U placée face à l'étuve, et fixée sur un pied, comme le montre la **figure 1**.

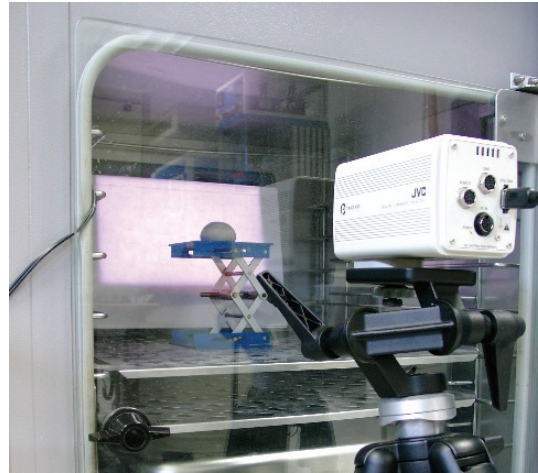


Figure 1 : dispositif caméra numérique et étuve

Nous plaçons la source lumineuse derrière le pâton pour nous affranchir des problèmes de reflets sur la porte. Cet éclairage présente aussi l'avantage de donner une image dans laquelle le pâton, sombre sur fond clair, est facile à isoler comme montré **figure 2**.

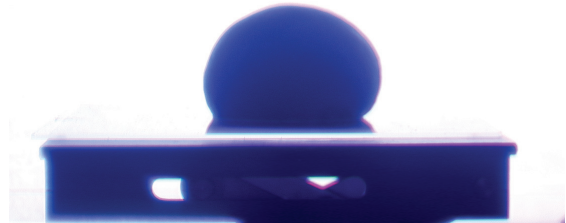


Figure 2 : exemple d'image (échantillon F, cf. tableau 1)

Pour déterminer la résolution d'une image, il faut connaître une mesure d'un des objets qui y figurent. Nous connaissons l'épaisseur du support et aussi la largeur du pâton, relevée au pied à coulisse juste avant l'acquisition d'image. La résolution de cette image est telle que le côté d'un pixel² a une longueur de 122 μm . L'acquisition des images est pilotée par l'application VisionStage (<http://www.alliancevision.com/fr/alvsoft/visionstage.htm>).

1.1. b Préparation de la pâte et des pâtons

Les pâtes de compositions différentes ont été confectionnées selon un processus standard. Les formulations sont indiquées dans le **tableau 1** en grammes pour 100 grammes de farine mise en œuvre. La farine utilisée est une farine panifiable de type 55 ne contenant ni enzyme ni additif, fournie par la Minoterie Giraudineau³.

Echantillon	Eau	Sucre	Huile	Levure	Sel
F'	62	0	0	1,25	2.2
F	62	0	0	2,5	2.2
15T	65	2	2	3	2
4T	55	10	10	3	2

Tableau 1 : formulations des pâtes

Pour préparer la pâte, nous utilisons un pétrin à axe oblique Mahot, réglé à une vitesse lente (40 t/mn) pendant 4 mn, puis à vitesse rapide (80 t/mn) pendant 15 mn. Le sel est introduit 5 mn avant l'arrêt du pétrissage. La température finale de la pâte est de 25°C +/- 1°C.

² Pixel = *picture element* = unité élémentaire de l'image numérique

³ F-44310 Saint-Colomban

Immédiatement après l'arrêt du pétrissage, un pâton est extrait de cette pâte et pesé. Une boule, formée manuellement, est déposée sur une plaque de verre qui est ensuite placée dans l'étuve sur un support. La méthode a été aussi testée en plaçant le pâton dans un tube comme décrit dans la présentation de Shehzad A. *et al.* (2007), mais le suivi d'une boule non contrainte donne des résultats plus répétables et plus précis. Entre la fin du pétrissage et la première image s'écoulent 10 mn.

Les pâtons ont une masse de 30 g +/- 0,1g. La température dans l'étuve est de 27°C +/- 0,3°C et l'hygrométrie 70 % +/- 3 %. La durée totale de fermentation est de 240 mn avec une acquisition d'image toutes les 5 minutes.

Pour comparer les résultats macroscopiques et microscopiques, nous calculons la porosité au cours du temps. Elle est obtenue à partir de la mesure du volume de la pâte mesuré en cours de fermentation $V(t)$, comme nous l'expliquons ci-après :

$$P(t)=1-\frac{M_p}{V(t)\cdot\rho_s}$$

avec M_p = masse du pâton et ρ_s = masse volumique de la pâte non alvéolée.

1.2 Méthode d'analyse des images

1.2.a Nature des images

Préalablement au traitement, les images couleurs sont converties en niveaux de gris : à chaque pixel est associée une teinte codée numériquement et comprise entre 0 et 255.

1.2.b Traitement des images

Pour commencer, nous recoupons les images pour que le support du pâton n'y apparaisse plus. Nous sélectionnons manuellement sur une des images de fin de fermentation, quand le pâton est le plus grand, un cadre de forme rectangulaire ne contenant que la région d'intérêt, le pâton, et le fond. Toutes les images de ce suivi de fermentation sont ensuite automatiquement recoupées selon ce cadre. La **figure 3** montre un exemple d'image recoupée en fin de fermentation.

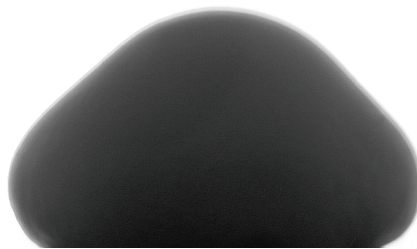


Figure 3 : image recoupée (échantillon F), fin de fermentation

Les conditions d'éclairage sont choisies de manière à obtenir un bon contraste entre le fond de l'image et la pâte. L'histogramme des niveaux de gris représenté en **figure 4** (zoom) montre deux pics, le premier correspond aux pixels sombres du pâton, le second correspond aux pixels clairs du fond de l'image. A partir de l'histogramme des niveaux de gris, nous déterminons un seuil en niveau de gris pour séparer le pâton du fond de l'image, il est fixé à 212 comme figuré en pointillés. Les pixels d'un niveau de gris inférieur sont considérés comme appartenant au pâton, les autres au fond de l'image.

Les pixels du fond comme ceux du pignon ont un niveau de gris constant lors du suivi de fermentation. A partir de l'ensemble des histogrammes de la série d'images faites au cours de la fermentation, nous déterminons un seuil unique appliqué ensuite à toutes les images pour obtenir une série d'images binaires.

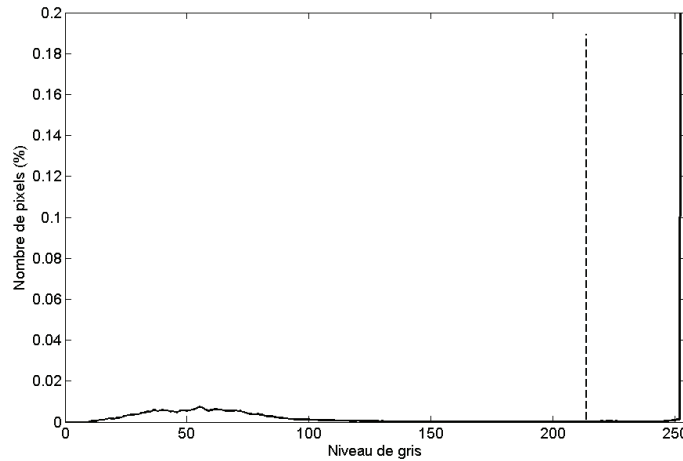


Figure 4 : *histogramme des niveaux de gris de l'image de la figure 3*

1.2.c Mesures et évaluation du volume

La hauteur et la plus grande largeur du pignon sont obtenues directement à partir de l'image binaire. Le volume V est déterminé en faisant l'hypothèse que le pignon reste symétrique lors de la fermentation, comme représenté **figure 5**, il est calculé comme la somme des volumes des disques qui composent l'échantillon selon l'axe vertical sur toute la hauteur H :

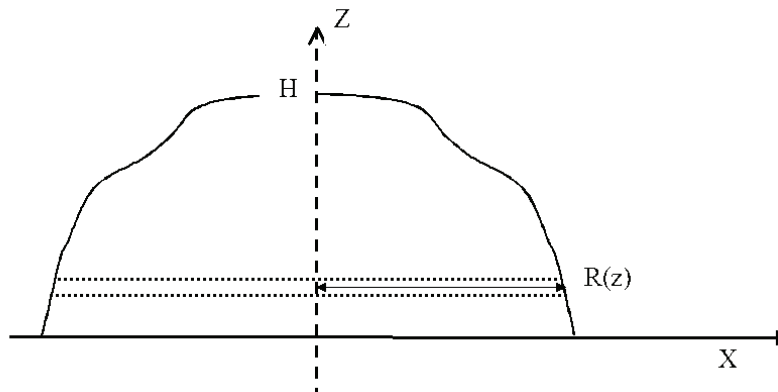


Figure 5 : *principe du calcul du volume*

$$V = \sum_{z=0}^H \pi \cdot r(z)^2 \cdot \Delta z$$

avec $\Delta z = 1$ pixel et $r(z) = \frac{1}{2} \cdot \text{longueur du segment d'échantillon en } z$

Le traitement d'images et les calculs sont programmés sous MATLAB (<http://www.mathworks.fr>).

1.3 Résultats

La **figure 6** montre la courbe d'évolution de la porosité de pâtons de formulation 'F'. Le 'F1' correspond au pâton vu en **figure 2** (début de fermentation) et **figure 3** (fin de fermentation).

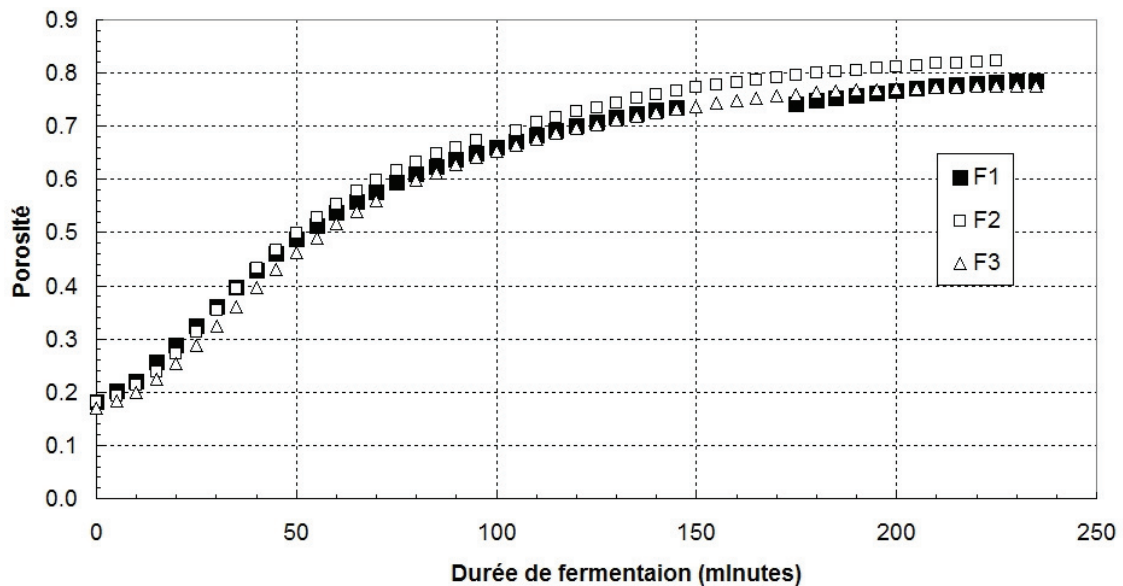


Figure 6 : évolution du volume

Chaque suivi de fermentation a été répété 3 fois, l'erreur relative est inférieure à 5 %.

La **figure 7** montre l'ensemble des courbes moyennes d'évolution de la porosité pour les 4 types d'échantillons.

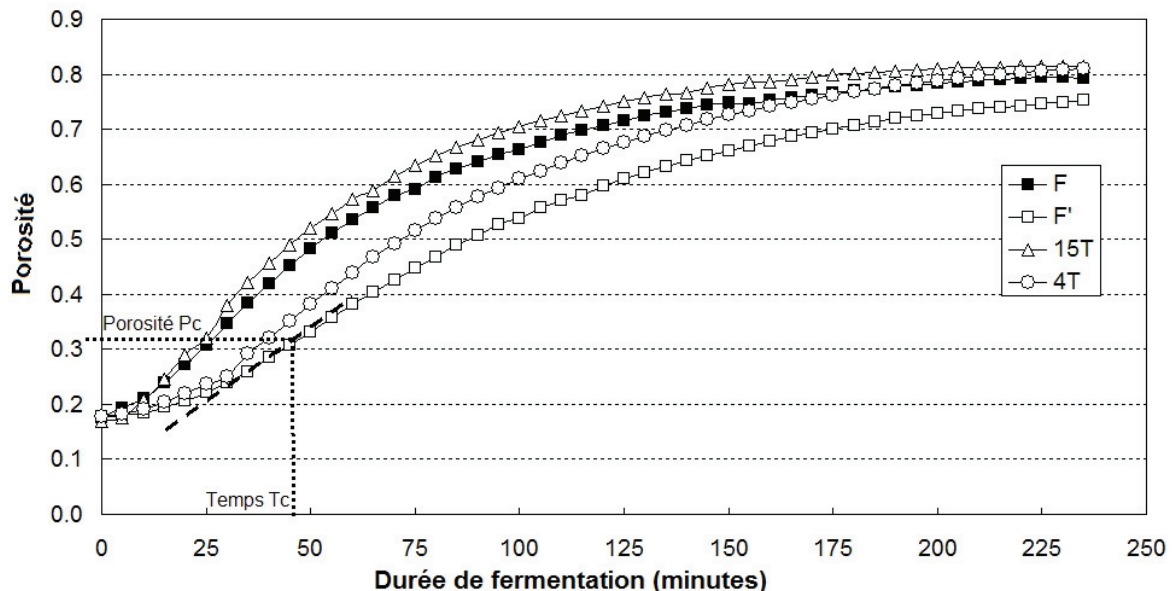


Figure 7 : évolution de la porosité

Ces courbes présentent une forme sigmoïdale : l'augmentation du volume est initialement lente puis accélérée aux temps intermédiaires et réduite en fin de levée. Nous repérons sur ces courbes un point d'inflexion caractéristique de chaque formulation, représenté en pointillés

sur la **figure 7**, défini par (T_c, P_c) et une vitesse d'accroissement maximale P' . Les valeurs obtenues sont données dans le **tableau 2**. Nous remarquons que $T_c(F') \approx 2.T_c(F)$ alors que F' contient 2 fois moins de levure que la pâte F .

Echantillon	Temps au point d'inflexion (T_c)	Porosité au point d'inflexion (P_c)	Vitesse au point d'inflexion P' (mn^{-1})
F'	50	0,33	0,0049
F	27,5	0,33	0,008
15T	25	0,32	0,0095
4T	45	0,32	0,0061

Tableau 2 : valeurs des coordonnées du point d'inflexion des cinétiques de porosité

2. Comparaison avec étude par tomographie - RX

Nous rappelons la méthode employée dans les travaux de Babin *et al.*, (2006). Parmi les résultats numériques obtenus par analyse d'images, nous n'utilisons que les mesures de porosité.

2.1 Matériel et méthode

Nous avons utilisé la tomographie par rayons X pour obtenir des images de notre échantillon sans le modifier, en 3 dimensions (3D) à une échelle micrométrique. C'est une technique qui donne une image 3D de la structure interne construite à partir d'une série de coupes faite par radiographie à rayons X à des angles différents, selon le schéma en **figure 8** :

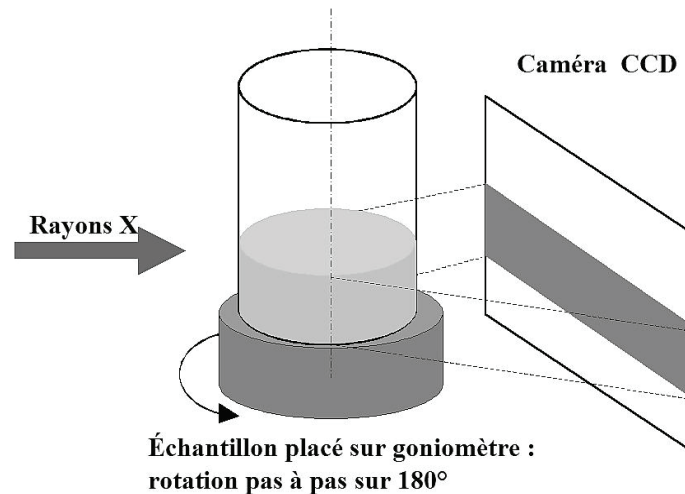


Figure 8 : principe de la tomographie à rayons X

Il était nécessaire d'effectuer les radiographies le plus rapidement possible pour que l'image finale ne soit pas perturbée par les évolutions de la pâte en cours de fermentation. Un synchrotron produit des rayons X de haute énergie qui permettent de faire de la tomographie rapide à l'échelle microscopique. Les images de tomographie ont été obtenues à l'*European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF-Grenoble), sur la ligne BM05 avec une énergie de 18 keV et un temps d'exposition de 20 ms par radiographie. Le temps pour acquérir

l'ensemble des 400 radiographies sur 180°, utilisées pour reconstruire une image 3D, était de moins de 30 secondes. Dans cet intervalle de temps, les modifications dans l'échantillon étaient négligeables par rapport aux changements observés après le temps laissé entre deux acquisitions complètes successives (≥ 3 mn). La taille du côté d'un voxel⁴ est de 15 μm . Les images obtenues sont codées sur 256 niveaux de gris et leurs dimensions sont de 628*628*628 voxels, soit un cube de 9 mm de côté.

La **figure 9** montre une série de coupes 2D obtenues lors du suivi de la pâte F.

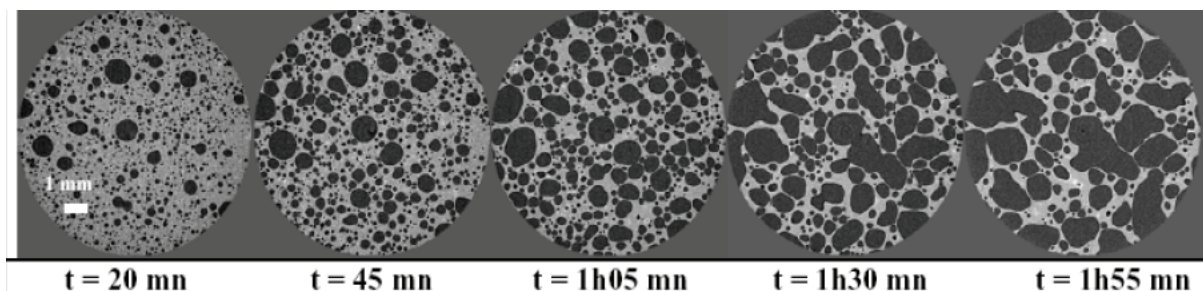


Figure 9 : coupes d'images 3D obtenues par tomographie rapide à l'ESRF de la pâte F en cours de fermentation

Nous avons vérifié que les rayons X n'affectent pas l'activité des levures en comparant le volume final de l'échantillon radiographié au volume d'un même échantillon de contrôle non-soumis aux rayons.

La qualité des images et le bon contraste entre les alvéoles et la pâte permettent de les séparer par application d'un seuil en niveau de gris. Ce seuil varie légèrement au cours du temps, d'une image 3D à l'autre. Il peut être déterminé visuellement, nous avons utilisé pour cela l'application ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), ou en appliquant une méthode statistique sur les niveaux de gris de l'image. Nous avons testé celle dite des « k-moyens », elle donne le même seuil qu'une évaluation *de visu*. Schématiquement, il s'agit de répartir les niveaux de gris dans 2 classes en les comparant à un seuil, de calculer les centres de ces classes et leur valeur moyenne, puis par itérations, d'utiliser cette moyenne comme nouveau seuil jusqu'à ce que les classes soient stables.

Les images 3D binaires ainsi obtenues sont utilisées pour une analyse quantitative. Nous avons vérifié qu'une variation du seuil de +/-10 % modifie peu (1 %) les mesures faites ensuite sur les images binaires.

2.2 Résultats

Les échantillons de pâte étaient obtenus avec une farine commerciale (Nutrixo, F75) selon les formulations données dans le **tableau 1**. Un morceau de pâte était prélevé immédiatement après le pétrissage et placé dans un tube de plexiglas, transparent aux RX, puis dans l'enceinte du synchrotron où la température était fixée à 25 °C. L'échantillon en début de fermentation avait un diamètre de 9 mm et une hauteur de 4 mm. Les images étaient acquises avec un intervalle de 3 à 10 mn entre chacune, pendant 2 h et 3 h pour l'échantillon F'.

La porosité est égale au rapport entre le nombre de voxels appartenant aux alvéoles sur le nombre de voxels de l'échantillon. Les résultats obtenus sont présentés **figure 10**.

⁴ Voxel = *volume element* = unité élémentaire de l'image numérique 3D

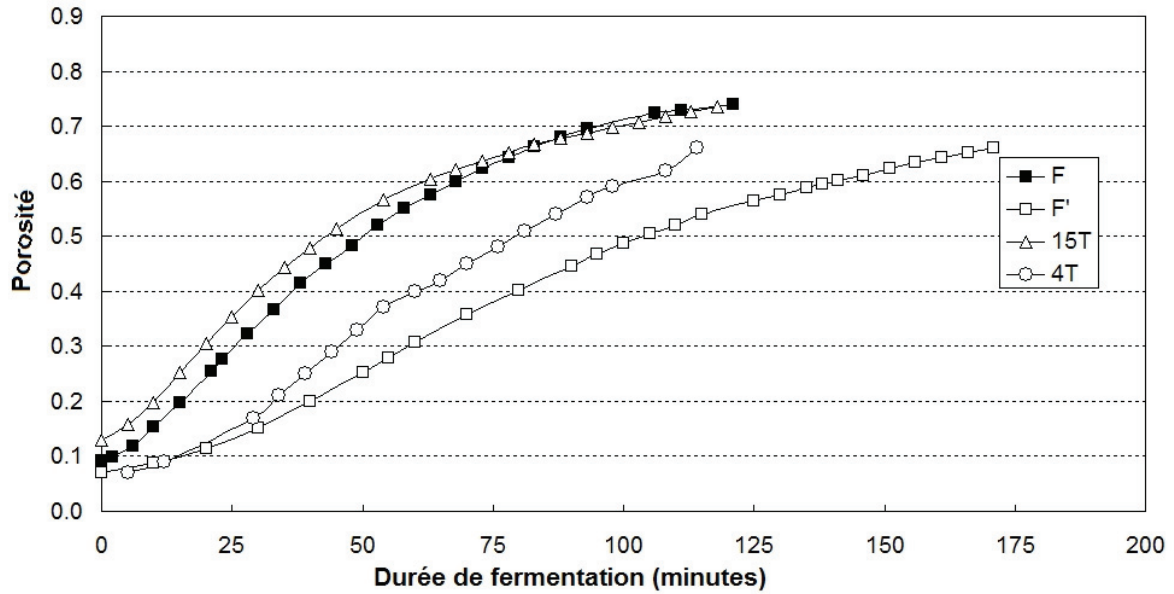


Figure 10 : évolution de la porosité calculée à partir des images de tomographie

Comme montré dans le **tableau 3**, les cinétiques d'évolution de la porosité des pâtes obtenues par tomographie-RX sont classées dans le même ordre que celles obtenues par le suivi de la fermentation. L'échelle micrométrique permet de comprendre à quel phénomène correspond le point d'inflexion dans la courbe de suivi de la porosité.

Sur la **figure 9**, la première image, acquise avant $T_c = 22$ mn, montre des alvéoles sphériques disjointes, ensuite ces alvéoles coalescent et présentent des contours irréguliers. T_c marque la fin de la croissance libre des alvéoles et le début de la coalescence.

Echantillon	Temps au point d'inflexion (T_c)	Porosité au point d'inflexion (P_c)	Vitesse au point d'inflexion P' (mn^{-1})
F'	52	0,265	0,0054
F	22	0,265	0,0101
15T	17,5	0,28	0,0108
4T	41	0,27	0,008

Tableau 3 : coordonnées du point d'inflexion des cinétiques de porosité déterminées par tomographie-RX

Pour comparer sur un même graphe (**figure 11**), nous ramenons les valeurs ci-dessous à une échelle variant de 0 à 0,6 en divisant les temps caractéristiques T_c par 100 et les vitesses maximales P' par 50.

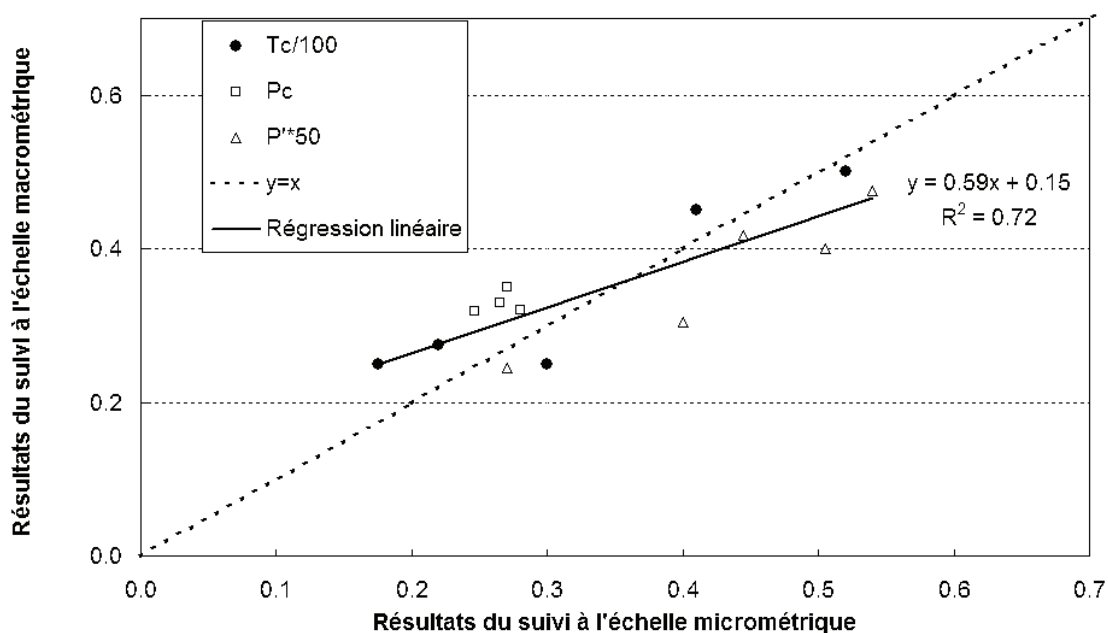


Figure 11 : comparaison des valeurs caractéristiques trouvées par les suivis aux 2 échelles

Les valeurs caractérisant le point d'inflexion montrent un accord acceptable, compte-tenu des différences de conditionnement de l'échantillon, de résolution et d'échelles d'observation

Conclusion et perspectives

La méthode mise au point au laboratoire, combinant imagerie visible et analyse d'images, est simple d'utilisation et donne des résultats répétables. Elle permet de comparer l'évolution de la croissance de pâtes différentes lors de la fermentation. Elle donne des résultats cohérents avec ceux obtenus par tomographie-RX sur ces formulations. Elle peut donc être utilisée pour interpréter les mécanismes de croissance des alvéoles comme fait lors de l'étude faite par Babin *et al.*, (2006), en particulier pour repérer le temps caractéristique qui marque le début de la coalescence des alvéoles.

Cet outil va être utilisé pour caractériser le comportement de pâtes de composition différentes, par exemple enrichies en fibres (projet AQuaNuP⁵) ou ayant été préparées suivant différents traitements de pétrissage (projet INCALIN⁶).

Le laboratoire dispose d'outils pour caractériser la structure alvéolaire et pour en comprendre l'obtention lors de la fermentation. Pour compléter, il faut appliquer la même approche à la cuisson. Nous disposons d'un four instrumenté avec une porte vitrée permettant d'envisager un suivi de la cuisson à un niveau macroscopique avec une caméra. De plus, nous avons fait quelques images de suivi de cuisson de pâte fermentée en tomographie RX, à la suite des suivis de fermentation. Les résultats obtenus aux deux échelles pourraient alors être comparés.

⁵ AQuaNuP : Amélioration de la Qualité Nutritionnelle du Pain. Coordonnateur L. Saulnier

⁶ ANR : Intégration des connaissances dans l'industrie agro-alimentaire. Coord. N. Perrot (Inra-GMPA)

Remerciements : Nous remercions Perrine Babin et l'équipe GPM2 (SIMAP-INP-Grenoble) pour leur collaboration dans le cadre du projet CANAL-SALVE.
Merci aussi à Marie Huyez de ses conseils et de son aide pour la rédaction de cet article.

Bibliographie

- Babin P., Della Valle G., Chiron H., Cloetens P., Hoszowska J., Pernot P., Réguerre A.-L., Salvo L., Dendievel R. (2006) Fast X-ray tomography analysis of bubble growth and foam setting during breadmaking. *Journal of Cereal Science* 43: 393–397
- Devaux M.-F., Réguerre A.-L., Chiron H. et Lassoued N. (2005) Caractérisation par analyse d'images de produits céréaliers alvéolaires selon leur texture visuelle. *Cah.Tech. Inra*, 56 : 17-32
- Rouillé J., Della Valle G., Devaux M.-F., Marion D., Dubreil L. (2005) French bread loaf volume variations and digital image analysis of crumb grain changes induced by the minor components of wheat flour. *Cereal Chem.* 82: 20-27
- Shehzad A., Chiron H., Della Valle G., Novales B., Réguerre A.-L. (2008) Alvéolation et levée de pâtes lors de la panification. *Journée des jeunes rhéologues, Erdeven, 26-28 mars 2008*

Association d'un microscope à un système de capture d'image

Analyse d'images par le logiciel ImageJ

Christel Le Bon¹, Céline Boulard¹, Pascale Jolivet¹

Résumé : Nous décrivons une méthode actualisant un ancien microscope de bonne qualité pour l'acquisition d'images numériques à moindre coût, et parallèlement nous présentons quelques possibilités offertes par le logiciel libre ImageJ® pour l'analyse d'images comme les mesures de diamètre et de surface (cercle, ovale,...) et pour l'obtention d'histogrammes de population. L'équipement décrit peut être installé sur tout microscope possédant une optique en bon état.

Mots Clés : Logiciel libre, outil graphique, microscopie

Introduction

Une des problématiques développées dans l'unité de Chimie biologique du centre Inra de Versailles-Grignon, concerne les modes d'organisation et de remplissage des organites de réserve dans les graines oléagineuses (Roux E., Baumberger S. *et al.*, 2004 ; Jolivet P., Tailliant K. *et al.*, 2006) et dans des levures modèles (*Yarrowia lipolytica* ou *Saccharomyces cerevisiae*). Ces corps lipidiques, aussi appelés oléosomes dans les graines, sont composés d'un cœur de lipides neutres (triglycérides) entouré d'une couche de phospholipides et de protéines intégrales (majoritairement des oléosines). La taille des oléosomes (de 0,45 à 2 μm) varie en fonction de la variété végétale (Tzen J.T.C., Cao Y.-Z. *et al.*, 1993), de paramètres extérieurs (mode de préparation, présence de cations divalents) et également du stade physiologique de la graine (remplissage, germination). La microscopie à champ clair se révèle donc être une technique rapide pour suivre l'évolution de taille de ces objets.

1. Mise au point de l'installation microscope/caméra

Le financement d'un microscope associé à un système d'acquisition d'images numériques peut être problématique, car cela ne correspond ni à de l'équipement lourd ni à du petit matériel. Une solution intermédiaire consiste à conserver le microscope existant pour ne financer que la partie numérique. Notre objectif était d'actualiser pour la capture d'images numériques un microscope Zeiss (Standard 14) datant des années soixante-dix qui a toujours été bien entretenu et dont les optiques sont en excellent état. Cet appareil permettait déjà la prise d'images via un appareil photo argentique. Pour moderniser cet équipement à un moindre coût avec un système d'acquisition numérique, deux possibilités technologiques s'offraient à nous : un appareil photographique numérique à utiliser en mode manuel en enlevant l'autofocus et nécessitant l'achat d'un logiciel d'acquisition d'image ou une caméra numérique incluant le logiciel d'acquisition. Finalement, notre choix s'est porté sur une caméra numérique Qimaging couleur (moins chère qu'un modèle noir et blanc) possédant un capteur CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor) de 3 Mo pixel, moins onéreux qu'un capteur CCD (Charge Coupled Device). Le type de connectique utilisé (port USB2, équipant couramment les ordinateurs fixes et portables) est également un avantage notable. La

¹ UMR 206 Chimie Biologique, UCB INRA Agro Paris Tech - F-78850 Thiverval-Grignon

☎ 01 30 81 54 67 ✉ boulard@grignon.inra.fr

version de base du logiciel de la caméra (Qcapture pro 6.0) gère de manière simple l'acquisition de photos (1 536 × 2 048 pixels, RGB 24). Pour un microscope trinoculaire, l'adaptation de la caméra numérique est effectuée sur le troisième tube via un raccord (**photos 1 et 2**). Il aurait été également possible de fixer la caméra sur le corps binoculaire.



Photo 1 : *Microscope Zeiss Standard 14 associé à une caméra Qimaging, capteur CMOS 3 Mo Pixel connecté à un ordinateur portable via un port USB2*



Photo 2 : *Zoom sur la caméra.*

2. Notions sur le logiciel ImageJ

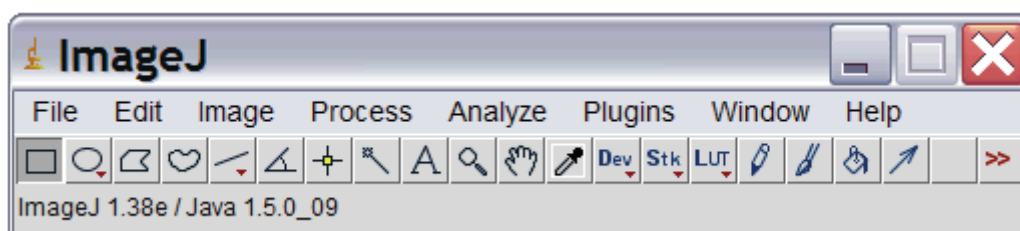


Figure 1 : *Barre des menus du logiciel ImageJ*

Le logiciel libre ImageJ (Image Processing and Analysis in Java) est l'adaptation du logiciel NIH Image, développé sous macintosh par le département de Santé mentale du NIH (National Institute of Health). ImageJ se présente en version anglaise, est programmé en Java, et peut être installé sous différents systèmes d'exploitation (Linux, Windows, Mac OS X et 9). Le téléchargement gratuit du logiciel et des multiples plugins se fait sur le site d'ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

ImageJ assure le traitement et l'analyse d'images et il présente des fonctionnalités communes (**figure 1**) à des logiciels commerciaux comme Photoshop. Il est possible de lire différents formats d'images (Tiff, Gif, Jpeg, Avi, ...) et de réaliser des traitements classiques d'image comme l'ajustement des niveaux de gris, de la luminosité et du contraste, des fonctions de

recadrage et de rotation, des traitements mathématiques (conversion en binaire, utilisation de filtres), la modification du code couleur des images ...

ImageJ offre la possibilité de rajouter des plugins développés par des extérieurs (universitaires ou membres de sociétés privées) et téléchargeables sur le site d'ImageJ. Cette variété de plugins et la possibilité de créer des macros combinant plusieurs fonctions permettent d'adapter le logiciel à des besoins précis. Les applications sont multiples ; pour des images de microscopie, mesurer des distances, des surfaces, des contours, dénombrer des objets, pour des gels d'électrophorèse ou des membranes issues de Western blot ou de Dot blot, quantifier l'intensité de bandes ou de spots. Cette liste est loin d'être exhaustive et pour des applications spécifiques, il est préférable de se référer à la liste des plugins disponibles sur le site d'ImageJ ou éventuellement de programmer un plugin en java.

Nous allons illustrer l'utilisation d'ImageJ au travers de deux fonctions couramment utilisées pour l'analyse d'images de microscopie :

- **Measure and Label**, créée par Wayne Rasband du NIH, qui mesure des distances ou des surfaces et les liste pour obtenir un tableau avec l'ensemble des mesures ;
- **Ellipse ROI**, créée par Bob Dougherty, qui délimite des surfaces de type ellipse dont les axes sont mobiles.

3. Exemples d'exploitation du logiciel ImageJ

Les objectifs visés dans nos exemples sont simples. Il s'agit d'une part d'effectuer des mesures de diamètres de corps lipidiques et de déterminer un histogramme de population, d'autre part de mesurer des surfaces de levures.

Dans les deux cas, un calibrage de l'image est nécessaire. Celui-ci est réalisé en prenant une photo d'une lamelle graduée avec l'objectif voulu. Dans le cas de notre microscope, à grossissement 100X, nous avons établi une correspondance de 16,167 pixels/ μm . Cette donnée est introduite dans l'outil « set scale » du menu « Analyze » d'ImageJ. L'intégration de la balle d'échelle en bas à droite de l'image est effectuée grâce à l'outil « scale bar » du menu « Analyze/Tools ».

3.1. Emulsion : détermination des distributions de population.

Des corps lipidiques sont reconstitués par sonication en mettant en présence les différents éléments eau, triglycérides et protéines intégrales. On obtient une émulsion de gouttelettes d'huile dans l'eau et l'observation microscopique est un outil efficace pour observer des phénomènes de coalescence ou des variations de dimension de ces objets en fonction de divers paramètres (volume des phases, concentration ou type de protéines).

La **photo 3**, obtenue par la caméra Qimaging, représente une émulsion huile dans eau observée au grossissement 100X. La cinquième icône en partant de la gauche de la barre des tâches d'ImageJ (« straight line ») permet de tracer le diamètre d'une gouttelette. La mesure du diamètre est faite à l'aide du plugin « **Measure and Label** » qui est présent dans la version de base de ImageJ. Pour chaque mesure, les informations sont retranscrites dans le tableau de résultats (**figure 2**) : numéro de mesure et diamètre en μm . Il est possible d'accumuler les données sur plusieurs photos pour une meilleure étude statistique de la distribution de population.

Une fois toutes les mesures effectuées, il est possible d'obtenir sous ImageJ un histogramme de population de cette émulsion (**figure 3**) avec la fonction « **Distribution** » du menu « Analyse » : soit le paramétrage est réalisé de manière automatique, soit les paramètres sont définis manuellement. Ces paramètres sont les limites inférieures et supérieures de l'histogramme, le nombre de classes (bin en anglais), ce qui fixe alors la largeur de classe (bin width en anglais). Des données complémentaires sont également fournies comme le nombre de mesures, la valeur moyenne et l'écart type.

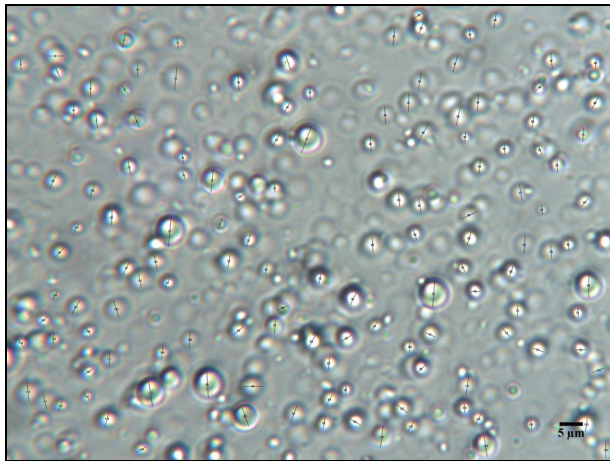


Photo 3 : émulsion huile dans eau observée au 100 X

Numéro de mesure

Diamètre en μm

	Mean	Min	Max	Angle	Length
71	237.993	149.556	255	-88.152	1.965
72	196.298	89.778	255	-94.708	5.478
73	228.174	154.889	255	-48.945	2.601
74	243.299	172.444	255	-18.886	2.537
75	236.911	161.185	255	0	2.219
76	246.286	192.889	255	0	1.877
77	242.780	195.444	255	-24.305	2.176
78	229.369	139.222	255	42.879	2.417
79	246.437	192.333	255	-97.853	1.895
80	219.316	162.296	250.963	-100.620	2.076

Figure 2 : tableau collectant l'ensemble des mesures effectuées sur la photo 3

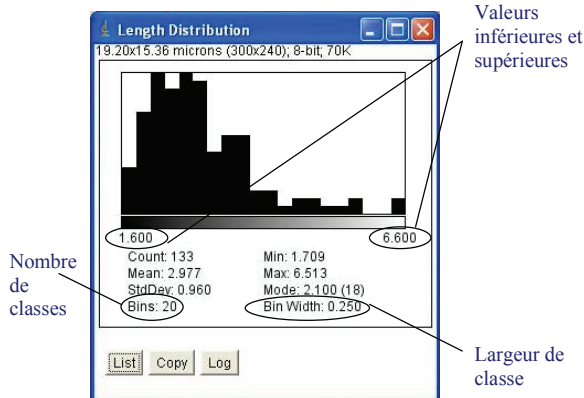


Figure 3 : histogramme issu des mesures de diamètre du tableau de la figure 2

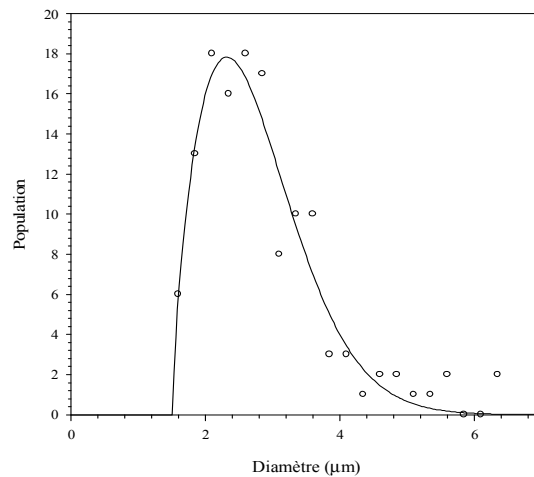


Figure 4 : exploitation de l'histogramme de la figure 3

Les résultats peuvent être finalement transférés vers un tableur (type Excel) ou éditeur scientifique (type Sigma Plot) pour ajuster la distribution par un modèle mathématique (**figure 4**).

3.2. *Yarrowia lipolytica* : détermination des dimensions d'objets (surface).

Des organismes comme les levures *Yarrowia lipolytica* ou *Saccharomyces cerevisiae* présentent des corps lipidiques au sein de leur structure. La **photo 4** est une observation au grossissement 100 X de levures *Yarrowia lipolytica*. Les petits points blancs et gris visibles dans ces organismes correspondent aux corps lipidiques.

Les mesures de surface de ces levures de forme plus ou moins ovale, ne peuvent se faire par l'outil « **Ellipse** » présent dans la barre des tâches d'ImageJ (deuxième icône) car ces organismes ne sont pas forcément situés selon les axes horizontaux et verticaux. Le plugin « **Ellipse ROI** » montre alors son utilité par la formation d'ellipses avec des axes mobiles. Comme ce plugin n'existe pas dans la version de base d'ImageJ, il est nécessaire de le télécharger et de l'ajouter aux autres plugins. Il faut également créer un raccourci (fonction « create shortcut » du menu « Plugins/Shortcuts) qui se présentera comme une icône vide à gauche du pinceau dans la barre des outils de dessin (sélectionner « Drawing tools » à l'aide de l'icône >> dans la barre des icônes). Cela permet d'obtenir une figure circulaire dont on peut ensuite modifier l'épaisseur ainsi que l'orientation. Comme précédemment, les mesures sont réalisées les unes après les autres et comptabilisées dans un tableau (**figure 5**) en utilisant le plugin « **Measure and Label** ». Si l'on veut connaître les dimensions des axes de l'ellipse, il faudra aller dans la fonction « set measurements » pour cocher l'indication « fit ellipse ».



Photo 4 : levures *Yarrowia lipolytica* observées au 100 X

Numéro de mesure	Aire en μm^2			
	Area	Mean	Min	Max
1	259.367	129.736	5	225
2	228.753	126.492	5	219
3	243.900	131.820	70	225
4	254.497	131.593	74	219
5	136.176	124.996	5	217

Figure 5 : tableau collectant les mesures effectuées sur la photo 4



Photo 5 : détail de la photo 4

Levure	Label	Area	fraction
		222.278	1
		1.294	0.006
		0.885	0.004
		0.778	0.004
		1.180	0.005
		0.786	0.004
		1.290	0.006
		1.573	0.007
		2.015	0.009

Figure 6 : tableau collectant les mesures de surface et les fractions de surface occupée par des corps lipidiques

ImageJ est un logiciel souple dont les fonctions sont faciles à adapter selon les besoins. Par exemple, quelques modifications dans le fichier `Area_Calculator.java` permettent, à l'aide de la fonction « **Area Calculator** », de mesurer des fractions de surface et non plus des sommes ou des moyennes. Ce plugin modifié est utilisé pour quantifier la surface relative occupée par les corps lipidiques dans une levure (**photo 5**). La surface de la levure étudiée devient l'aire de référence, et les surfaces des corps lipidiques sont pondérées par rapport à celle-ci. Les fonctions « **Ellipse ROI** » (pour définir la surface de référence) et « **Elliptical or Brush Selection** » (pour délimiter les corps lipidiques) sont alors utilisées et les résultats sont rassemblés dans un tableau (**figure 6**).

Conclusion

Nous avons perfectionné un ancien microscope à champ clair pour la prise d'images numériques. C'est à présent un outil utile dans le criblage des facteurs jouant sur la structure et les dimensions de nos objets (émulsion, levure). Il est possible de réaliser un travail de routine de manière autonome avant de solliciter les plateformes de microscopies pour des applications plus spécifiques (épifluorescence, microscopie électronique...). Une adaptation similaire de microscopes ancienne génération non équipés de dispositifs intégrés d'images est envisageable dans la mesure où les éléments d'optique sont en bon état. Le logiciel de domaine public ImageJ appliqué à l'analyse d'images est d'une utilisation aisée pour des applications simples et il présente des fonctionnalités similaires à Photoshop ; néanmoins, pour des applications ciblées, il peut devenir difficile de trouver le plugin adéquat parmi la multitude de petits programmes disponibles sur le site.

Bibliographie

- Jolivet P., Tailliant K., *et al.* (2006) Purification and protein composition of oil bodies from *Brassica napus* seeds. *OCL* **13**(6): 426-430
- Roux E., Baumberger S., *et al.* (2004) Oleosins of *Arabidopsis thaliana*: expression in *Escherichia coli*, purification, and functional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**(16): 5245-5249
- Tzen J.T.C., Cao Y.-Z., *et al.* (1993) Lipids, proteins, and structure of seed oil bodies from diverse species. *Plant Physiology* **101**: 267-276
- Site officiel d'ImageJ (programme et plugins téléchargeables) : <http://rsb.info.nih.gov/ij/> (consulté le 20/4/2009)
- ImageJ sur Wikipedia <http://fr.wikipedia.org/wiki/ImageJ> (consulté le 20/4/2009)

Imagerie RMN *in utero* pour la détection non invasive de l'hypoxie aigüe sur modèle ratte

Guy Bielicki¹, Cécile Keller¹ et Amidou Traoré¹

Résumé : *De nos jours, il n'existe pas encore de méthode spécifique et non invasive pour la détection intra-utérine de l'hypoxie aigüe chez le fœtus. L'intérêt de l'IRM (imagerie par résonance magnétique) utilisant le contraste BOLD (blood oxygenation level dependent) a été démontré chez la brebis gravide durant l'hypoxie. Ce modèle a été choisi car il donne un reflet des échanges materno-fœtaux sur un mode hémochorial plus proche du modèle humain, contrairement à la brebis. (Carter A.M., 2007, Animal models of human placentation-a review. Placenta; 28, Suppl. A:S41-7). Le but de notre étude était d'évaluer, chez la ratte, la faisabilité de la détection de l'hypoxie fœtale de manière non invasive en utilisant la variation du signal BOLD du cerveau des fœtus dans les conditions d'hypoxie de la mère. Le modèle ratte permet l'étude sur un grand nombre d'animaux. Pour cela, nous avons exploité la relation entre le paramètre tissulaire T_2^* et le signal BOLD par la création et l'analyse d'images paramétriques T_2^* du cerveau de fœtus dans les conditions de normoxie et d'hypoxie de la ratte gravide.*

Mots clés : Ratte gravide, hypoxie, souffrance fœtale, IRM, effet bold, T_2^*

Introduction

En dépit des avancées majeures dans les technologies de monitoring et des connaissances en médecine fœtale et périnatale, l'asphyxie périnatale demeure l'une des principales causes de mortalité et de morbidité à long terme. A l'heure actuelle, Il n'existe, aucun autre moyen non invasif de surveillance du fœtus à membranes fermées que l'enregistrement de sa fréquence cardiaque.

Au sein de la plateforme « Centre Auvergne de résonance magnétique des systèmes biologiques » nous avons mené, en collaboration avec le Pôle d'obstétrique et gynécologie de l'université de Clermont Ferrand, une étude utilisant l'IRM pour valider sur un modèle animal, la détection et l'exploration biochimique de l'hypoxie du fœtus de manière non invasive et non irradiante. La méthode est basée sur l'effet BOLD. L'IRM utilisant le contraste BOLD exploite la variation du signal en fonction du degré d'oxygénation du sang. C'est une technique puissante et largement utilisée pour l'étude non invasive de l'activité cérébrale aussi bien chez l'homme que chez l'animal (Logothetis N.K, 2003 ; Matthews P.M. et Jezzard P., 2004). Ce contraste repose sur la distribution des inhomogénéités du champ magnétique au voisinage des vaisseaux sanguins en fonction de l'équilibre entre les deux états de l'hémoglobine : l'oxyhémoglobine et la déoxyhémoglobine. L'augmentation du flux sanguin local consécutive à une activité cérébrale entraîne une augmentation du degré d'oxygénation du sang et par conséquent, une diminution de la concentration du paramagnétique déoxyhémoglobine. Il en résulte une augmentation de l'intensité du signal IRM. Ces changements détectables dans les images pondérées en T_2^* (contraste BOLD) sont

¹ INRA UR 370 QuaPA - Plateforme RMN des systèmes biologiques - F- 63122 Saint-Genès Champanelle.
gb@clermont.inra.fr, ckeller@clermont.inra.fr, atraore@clermont.inra.fr

alors interprétés comme une mesure indirecte de l'activité neuronale. L'effet BOLD peut être quantifié par la différence des T_2^* entre les deux états, repos et activé. Dans cette étude, nous formulons l'hypothèse que l'hypoxie chez la ratte gravide devrait s'accompagner d'une diminution de l'oxygénation du cerveau des fœtus, donc d'une diminution du T_2^* cérébral. La différence des T_2^* (ΔT_2^*) du cerveau fœtal sera considérée comme une mesure de l'hypoxie.

1. Description détaillée du matériel et/ou de la méthode

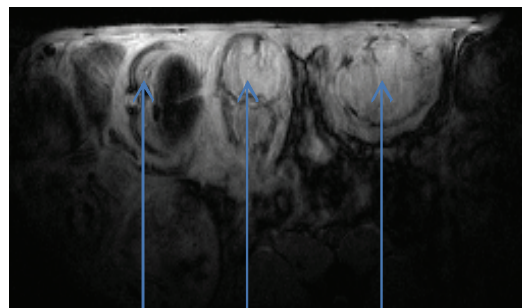
1.1 Animaux

Nous avons réalisé les expériences sur 6 rattes gravides (20-21 jours de gestation). Les animaux ont été anesthésiés par l'inhalation d'un mélange 0,3 l/mn oxygène avec 0,7 l/mn air médical et isoflurane 2 % (1,5 à 2,5 %). Ce mélange assure une fréquence respiratoire moyenne à 67 BPM. Avec notre système de contention, nous avons placé la ratte en décubitus dorsal, au centre magnétique de l'aimant, l'antenne de surface positionnée sur son abdomen. Le protocole d'induction de l'hypoxie était le suivant : un mélange oxygène (41,7 %)/azote (58,3 %) pour la condition normoxique avec l'obtention d'une saturation en oxygène de 97 % du sang maternel. Tandis que la condition hypoxique est obtenue par un mélange 15 % oxygène et 85 % azote résultant en une saturation moyenne en oxygène de 63 %. Le temps moyen d'obtention d'une hypoxie stable était de 120 secondes après le début de l'induction. Ceci a été vérifié par un contrôle de la désaturation maternelle par un oxymètre de pouls placé sur la langue maternelle, et confirmé par une mesure des lactates sanguins. L'installation de l'hypoxie est accompagnée d'une cyanose et de l'augmentation de la fréquence respiratoire moyenne de la ratte de 67 cycles/mn à 76 cycles/mn.

1.2 Outil RMN

Toutes les mesures IRM ont été réalisées sur un aimant horizontal 4,7 T (Biospec 47/40, Bruker, Ettlingen, Allemagne) d'un diamètre horizontal de 40 cm et équipé d'un système de gradients rapides (Bruker, BGA12 200 mT/m) dont le diamètre interne est de 11,6 cm. L'antenne de surface Bruker ^1H ayant un diamètre interne de 5 cm a été utilisée aussi bien pour l'émission du signal RF que pour la réception du signal. Toutes les images ont été acquises en utilisant un champ de vue (FOV) $2,90 \times 7 \text{ cm}^2$. Après acquisition d'images pilotes, la localisation des cerveaux de fœtus est obtenue par l'acquisition de 30 images transversales de haute résolution (matrice 128×256 , 2 mm d'épaisseur) couvrant l'ensemble de l'abdomen de la ratte (**figure 1**).

Pour caractériser l'effet BOLD en fonction de l'état d'hypoxie, le même volume (30 coupes de 2 mm d'épaisseur) est couvert en utilisant la séquence multi-gradient-écho MGE (Ma J. et Wehrli F.W., 1996). Pour chaque coupe, 6 images sont acquises avec 6 temps d'écho (TE) différents de 2,62 à 32,62 ms, par pas de 6 ms afin de générer des cartes T_2^* .



Fœtus 1 Cage thoracique Fœtus 2 cerveau Fœtus 3 cerveau

Figure 1 : Image pour la localisation des fœtus.

Les autres paramètres d'acquisition sont : TR/TE = 2 000/2,62 à 32,62 ms, angle de bascule = 90°, matrice = 128 × 256 et 4 accumulations pour augmenter le rapport signal sur bruit. Dans ces conditions, on obtient 180 images pour une durée totale d'acquisition de 34 mn. Pour chaque animal, la session BOLD est constituée par 34 mn d'acquisition en état normoxique (n) suivie de 34 mn d'acquisition après induction et stabilisation de l'hypoxie (h).

1.3 Outils de traitement

Les images ont été transférées pour être analysées sur une station de travail IRIX O2 (Silicon Graphics Inc., Mountain View, CA) à l'aide d'une plateforme logicielle maison « Xstim » développée en utilisant la bibliothèque numérique IMSL (Visual Numerics, Inc., Houston, TX, USA). Nous présentons sur la **figure 2** les étapes de traitement. Pour chaque animal et pour chaque phase (normoxie et hypoxie), la décroissance des intensités de signal (SI) de chaque pixel (de chacune des 30 coupes transversales) en fonction du TE ont été ajustés avec l'expression $SI = S_0 \cdot \exp(-TE/T_2^*)$ en utilisant l'algorithme d'ajustement non linéaire basé sur les moindres carrés résiduels (NLLS). Les paramètres T_2^* ainsi déterminés donnent une image paramétrique T_2^* de la coupe.

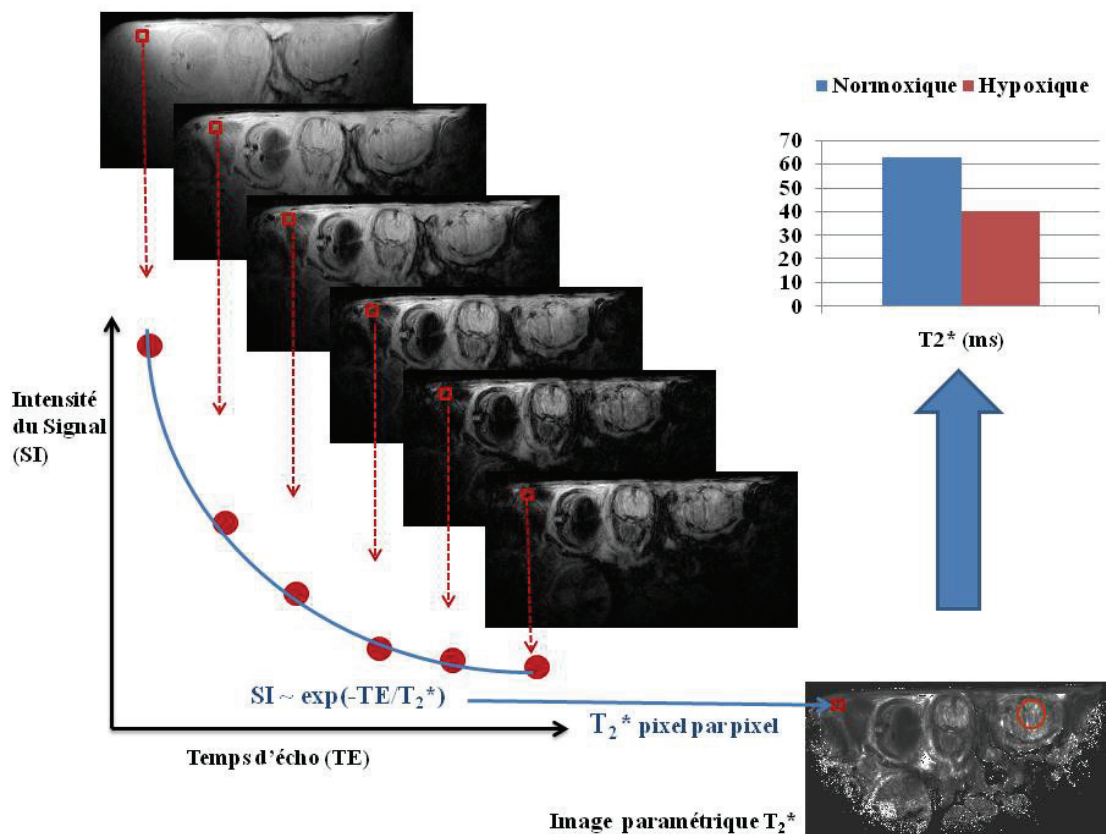


Figure 2 : Chaîne de traitement d'images

Construction de l'image paramétrique T_2^* à partir des images d'écho de gradient à différents temps d'écho. A gauche, 6 images d'une même coupe acquises aux différents TE et la courbe de schématisation du calcul du T_2^* pixel par pixel. En bas à droite, l'image paramétrique T_2^* générée. En haut à droite, un résultat de la variation du T_2^* de la ROI circulaire placée dans le cerveau d'un fœtus dans les conditions d'hypoxie de la ratte.

Afin de quantifier l'effet BOLD dû à l'oxymétrie, une région d'intérêt (ROI) circulaire a été positionnée sur le cerveau identifié d'un fœtus de chaque animal. Le T_2^* moyen de chaque ROI a été calculé pour les deux états. On obtient le pourcentage de variation du T_2^* , par la différence des T_2^* moyens des deux états rapportée au T_2^* moyen dans l'état normoxique : $\% \Delta T_2^* = (T_{2\text{hypoxique}}^* - T_{2\text{normoxique}}^*) / T_{2\text{normoxique}}^*$.

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Statistica (Stat Soft Inc., Tulsa, OK, USA). La corrélation entre l'effet BOLD et l'état d'hypoxie maternel a été analysée pour chaque animal et pour l'ensemble des animaux. Les différences ont été considérées comme significatives pour des valeurs de $p < 0,05$.

2. Résultats et exemple d'application

Ce protocole d'imagerie permet d'observer *in utero* des fœtus et leur cerveau (**figure 1**). Ces résultats montrent que les mouvements respiratoires de la ratte n'affectent que faiblement la qualité des images ce qui nous a affranchis de l'utilisation de la synchronisation de l'acquisition sur la fréquence respiratoire. Nous présentons dans le **tableau 1** les résultats de mesures de T_2^* des cerveaux de fœtus dans les conditions de normoxie et d'hypoxie de la ratte. Pour toutes les rattes, l'induction de l'hypoxie s'accompagne d'une diminution du T_2^* des cerveaux fœtaux allant de 14 % à 56 %. Ces résultats montrent une corrélation entre la diminution de l'apport en oxygène à la ratte et la variation du signal BOLD telle que reflétée par la diminution du T_2^* du cerveau fœtal. Ces résultats suggèrent que l'IRM à contraste BOLD est un outil de diagnostic prometteur pour caractériser l'état d'oxygénation des organes fœtaux dans les grossesses à risque compliquées. En effet, l'invasion des trophoblastes qui précède les atteintes vasculaires placentaires à l'origine d'une forme d'hypoxie fœtale humaine a été récemment démontrée chez la ratte ; ce qui suggère que la ratte gravide pourrait devenir un excellent modèle expérimental dans l'étude de la réponse fœtale à l'hypoxie aiguë et chronique (Vercruyse L. *et al.*, 2006).

Ratte	Normoxique	Hypoxique	$\% \Delta T_2^*$ (hypoxique)
#1	43,4 ± 8,3	23,6 ± 13,9	-46%
#2	68,4 ± 18,5	44,8 ± 17,4	-35%
#3	54,9 ± 11,2	37,9 ± 14,7	-31%
#4	43,6 ± 16,3	19,4 ± 14	-56%
#5	33,2 ± 17	28,7 ± 19,4	-14%
#6	68.3 ± 24.3	35.3 ± 19.7	-48%

Tableau 1 : T_2^* (ms) moyen des ROI de cerveaux de fœtus dans les deux conditions et % de variation de T_2^* induit par l'hypoxie.

Conclusion et perspectives

Nous avons montré que l'IRM à contraste BOLD était une technique bien adaptée pour appréhender l'hypoxie fœtale chez le modèle rat, puisque la baisse de signal T_2^* est contemporaine de l'apparition d'une hypoxie maternelle. Cela permet d'envisager des études plus larges pour, à terme, transposer la méthode chez l'homme. En plus de la variation du T_2^* , nous évaluons actuellement la possibilité de détecter l'hypoxie fœtale par des mesures en spectroscopie localisée du ^1H pour la détection des lactates et en ^{31}P pour déterminer le pH.

Bibliographie

- Carter A.M. (2007) Animal models of human placentation-a review. *Placenta*, 28 Suppl A:S41-7
- Logothetis N.K. (2003) MR imaging in the non-human primate: studies of function and of dynamic connectivity. *Curr Opin Neurobiol* 13:630-42
- Ma J., Wehrli F.W (1996) Method for image-based measurement of the reversible and irreversible contribution to the transverse-relaxation rate. *J Magn Reson B*. 111:61-9
- Matthews P.M., Jezzard P. (2004) Functional magnetic resonance imaging. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75:6-12
- Vercruyse L., Caluwaerts S., Luyten C., Pijnenborg R. (2006) Interstitial trophoblast invasion in the decidua and mesometrial triangle during the last third of pregnancy in the rat. *Placenta* 27:22-33

Mesure de couleur des végétaux.

Eric Pietri, Patrice Reling¹

Résumé : Pour mesurer la couleur des végétaux nous utilisons un chromamètre de marque Minolta de type CR 400 dont le logiciel de pilotage fourni par la marque ne nous convient pas, nous avons donc développé un logiciel de pilotage convivial qui nous permet d'effectuer des mesures fiables et rapides. Reste un problème de représentativité de ces mesures. En effet la fenêtre de mesure de 8 mm ne permet pas par exemple l'estimation de surface de modèle multicolore. Nous présenterons des applications ainsi que les perspectives d'analyse d'image.

Mots clés : réflectance, couleur, calibration, image numérique,

Introduction

L'unité de recherche Sécurité et qualité des produits d'origine végétale (SQPOV) du centre Inra d'Avignon et plus particulièrement l'équipe « qualité des fruits » a pour mission la caractérisation biochimique, physiologique et physique. La mesure de couleur via un chromamètre de marque Minolta de type CR 400 est utilisée pour évaluer des stades de maturité, pour différencier des variétés contrastées, des descendances hybrides, l'évolution post récolte et la qualité au cours de la conservation des fruits et légumes.



Photo 1 © Minolta : CR 400

1. Mesurer la couleur

Les mesures de couleur sont réalisées à l'aide d'un chromamètre Minolta CR 400/410 (photo 1). C'est un analyseur de couleur tristimulus, composé d'une tête de mesure et d'un calculateur. La tête de mesure est constituée d'une lampe à xénon pulsé qui fournit l'illumination qui va éclairer la surface de l'objet. La lumière réfléchiée par l'objet est lue par six capteurs photoélectriques au silicium. Le calculateur analyse les données qu'un processeur calcule dans l'espace couleur choisi avec un illuminant de D-65 (standard de la CIE pour la lumière du jour), un angle 0° et 8 mm de diamètre d'ouverture. L'espace L^* , a^* , b^* (figure 1) est un espace qui décorrèle la luminance et la chrominance L^* , a^* , b^* (CIELAB), c'est à dire des valeurs proche de la perception de l'œil humain.

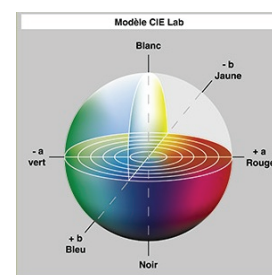


Figure 1 : espace de couleur $L^*a^*b^*$

L^* indique la clarté ou luminance et varie de 0 pour le noir à 100 pour le blanc
 a^* varie de -60 pour le vert à +60 pour le rouge
 b^* de -60 pour le bleu à +60 pour le jaune.

¹ UMR408 Sécurité et qualité des produits d'origine végétale - SQPOV INRA-Univ. Avignon et Pays de Vaucluse - F-84914 Avignon – ☎ 04 32 72 25 37 ✉ reling@avignon.inra.fr

Les informations données par l'appareil sont calculées par rapport à une couleur de référence ou étalon.

Cet appareil de mesure est fiable (données répétables et reproductibles), les frais de fonctionnement sont réduits (une plaque de calibration tous les ans : 200 €) et l'investissement initial est relativement faible (7 000 €). La tête de lecture est reliée à un ordinateur via la liaison RS 232 qui pilote cet appareil et où sont sauvegardés les fichiers de mesure.

2. Le logiciel de pilotage développé au laboratoire

Le logiciel de pilotage payant proposé par Minolta apparaît complexe et il n'est pas très convivial. Nous avons donc développé en interne, au laboratoire en Delphi : un langage de programmation orienté Pascal objet, un logiciel de pilotage (**figure 2**) simple d'utilisation, automatique, convivial et accessible à tous : stagiaires, CDD... Ce logiciel intègre la calibration, sans pénaliser la fréquence des mesures puisque cet appareil réalise près de 40 000 mesures par an sur une période très courte de mai à juillet. Les données sont exportées automatiquement sous la forme d'un tableau Excel.

année	2004	2005	2006	2007
nbre d'analyses	41 861	37 757	27 771	37 904

Tableau 1 : nombre de mesures du chromamètre ces dernières années.

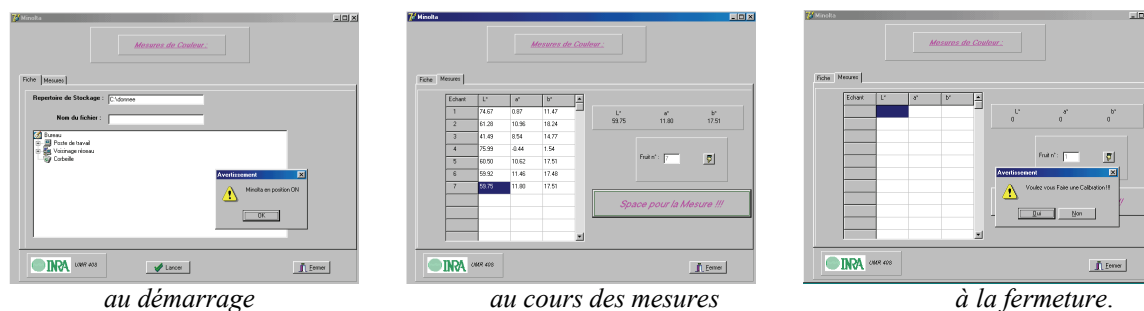


Figure 2 : différentes fenêtres du logiciel.

3. Applications

Les applications sont de deux types : une première est utilisée pour le tri des végétaux : évaluer des stades de maturité, différencier des variétés contrastées, des descendances hybrides (**figure 3**). La seconde permet la mesure de couleur comme par exemple pour l'évolution post récolte et de la qualité au cours de la conservation.

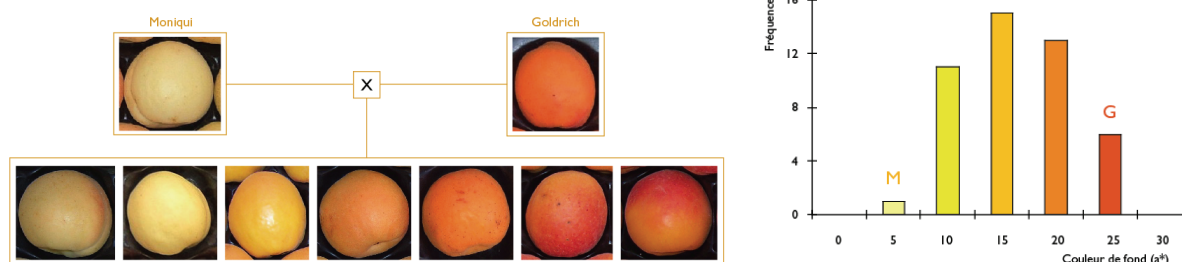


Figure 3 : classement d'une descendance d'abricot en fonction de sa couleur de fond (axe chromatique a^* de, L^* , a^* , b^*)

3.1 Le tri de végétaux

Les végétaux sont des produits vivants que nous sommes amenés à évaluer toute ou partie de leur vie : évolution de la qualité au cours de la conservation, suivi post-récolte,... Il est donc essentiel que les mesures aient le moins possible d'incidence sur leur comportement et soient non destructives, nous utilisons au laboratoire plusieurs techniques :

- mesure d'élasticité (fermeté/compression),
- mesure du spectromètre proche infrarouge sur des fruits entiers.
- mesure de couleur dans l'espace L^* , a^* , b^* et un illuminant de D-65 (lumière du jour).

Après plusieurs années d'expérience, nous présentons dans le **tableau 2** la pertinence de ces différentes mesures à des fins de tri. La couleur d'un fruit n'étant pas homogène dans l'espace, il est délicat d'effectuer un tri sur ce seul critère. Par convention, l'opérateur prend la mesure sur les endroits les moins colorés, (ou le plus, couleur de fond/couleur de surimpression).

Critères	analyse		
	fermeté	proche IR	couleur
destructif	oui	non	non
rapidité	lent	rapide	très rapide
cohérence des résultats	moyen	en cours d'étude	bonne
rapport surface de mesure / surface globale	élevé	petit	petit

Tableau 2 : mesures non destructives effectuées au laboratoire, classées par pertinence

3.2 Les mesures

La mesure de couleur est une mesure physique discriminante pour nos études, illustrée **figure 4**.

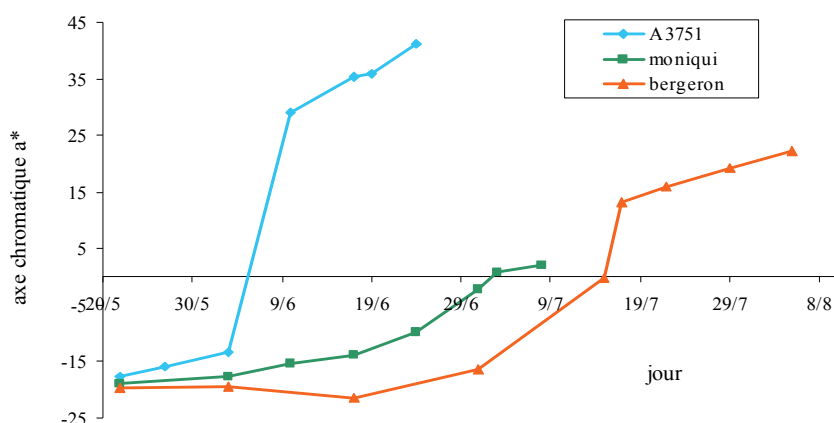


Figure 4 : évolution post récolte de la couleur de fond de trois variétés d'abricot dans l'espace L^* , a^* , b^*

4. Bilan

Après quelques années d'utilisation, ce logiciel de pilotage, a subi quelques évolutions et nous permet maintenant de collecter rapidement et simplement des données fiables. Cependant, il restait un problème de représentativité. En effet, la fenêtre de mesure est de 8 millimètres, et si dans la plupart des cas cette mesure constitue une bonne indication cette surface est elle bien représentative du fruit ? L'utilisation de la fenêtre de mesure de 50 mm du CR 410 s'avère irréaliste du fait de convexité des surfaces à mesurer. Tout comme multiplier les points de mesure qui pénaliserait le temps d'analyse, et comment mesurer la couleur des fruits bicolores ? (photo 2).



Photo 2 © P. Reling/Inra : abricots bicolores.

Conclusion et perspectives

Nous envisageons de développer une nouvelle méthode capable de mesurer non seulement les couleurs de ces fruits mais également d'en estimer les surfaces correspondantes. Nous utiliserons l'analyse d'image : la chaîne d'analyse d'image numérique commence par l'acquisition de l'image avec un capteur et des conditions d'éclairage optimales pour obtenir une image pertinente exempte de défauts : défocalisation, contraste...) et elle se poursuit avec le traitement via un logiciel (figure 5).

L'image obtenue est seuillée. Ainsi simplifiée, cette image numérique devient binaire pour séparer les régions d'intérêts qui vont être traitées via le logiciel.

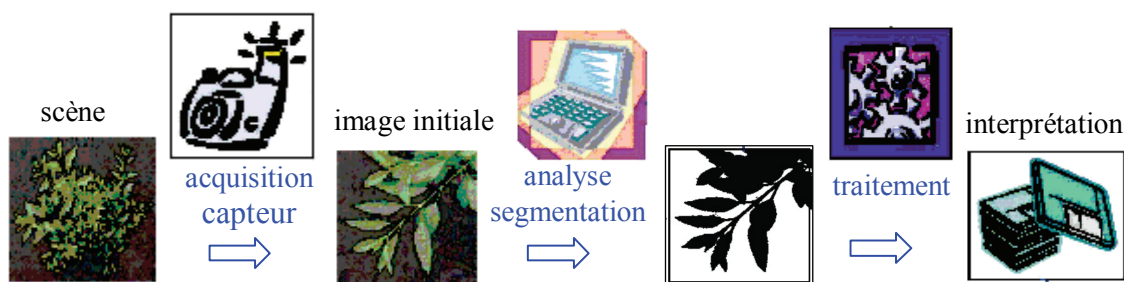


Figure 5 : l'analyse et le traitement de l'image numérique

Le traitement des images portera une attention particulière à la calibration, que cela soit de la valeur du point blanc de la caméra (utilisation de la plaque de calibration du chromamètre du laboratoire (Minolta CR 400) pour contrôler les conditions d'éclairage. Avec l'utilisation d'une mire de couleur de référence : la MacBeth Color Chart, pour comparer nos valeurs obtenues L^* , a^* et b^* avec les valeurs du chromamètre du laboratoire. Les surfaces calculées pourront aussi être contrôlées en comparant avec l'aire d'objet connue.

Le budget global du matériel nécessaire à l'acquisition de l'image équivaut à 17 500 €.

Pour l'acquisition de l'image, nous utiliserons une caméra couleur Pixelink 1/2" CMOS, 2 048 × 1 536 avec un objectif Pentax 16 mm (**photo 3**).



Photo 3 : caméra couleur CMOS

L'éclairage dans les trois canaux R, G et B est effectué sous un dôme axial plus éclairage rasant (Darkfield), de 324 mm de diamètre équipé de 480 et 240 leds (DMC/DMK 3218) plus un back light 200 × 200 à leds (phlox/LRGB 200 × 200) (**photo 4**). La gestion de l'éclairage (intensité, proportion des canaux) est réalisée par un utilitaire que nous avons développé.



Photo 4 : dôme axial équipé d'un darkfield

Le traitement de l'image sera effectué par le logiciel Aphelion® d'une valeur de 4 500 € chez ADCIS. Il est utilisé par d'autres unités de recherche de notre département « Caractérisation et élaboration des produits issus de l'agriculture » (CEPIA). Il permettra le pilotage de la caméra et l'automatisation du traitement une fois qu'il sera validé. Il s'agit d'une suite de bibliothèque Aphelion® qui est automatisée par un script Visual Basic.

A noter également que les qualités de notre chaîne d'acquisition et les multiples possibilités logiciel nous permettrons d'autres mesures comme la reconnaissance d'objet, de forme, leur comptage, mesure, classement...

Actuellement, tous les éléments sont acquis, il nous reste la mise en œuvre de ces méthodes d'analyse et la validation scientifique de ces mesures.

Références

<http://www.konicaminolta.com/instruments/products/color/index.html> (consulté le 6 juillet 2009)

<http://www.adcis.net/index.html> (consulté le 6 juillet 2009)

<http://www.elvitec.fr/> (consulté le 6 juillet 2009)

<http://www.emse.fr/spip/IMG/pdf/animage.pdf> ((consulté le 6 juillet 2009)

Étude par microscopie à force atomique de l'organisation cœur-couronne de nanoparticules hétéroxylanes-lignine de synthèse, modèles des parois végétales lignifiées

Cédric Gaillard¹ et Bernard Cathala¹

Résumé : *L'alcool coniférylique, un monomère des lignines a été polymérisé en présence d'hétéroxylanes, un polyoside caractéristique des parois végétales de graminées. La réaction conduit à la formation de particules de dimension nanométrique contenant les hétéroxylanes et les dehydrogénopolymères (lignines synthétiques) formés par la polymérisation de l'alcool coniférylique. Nous avons étudié l'organisation interne de ces particules par microscopie à force atomique en mode intermittent. En faisant varier l'amplitude de vibration de la pointe, donc la force d'appui sur l'objet, nous avons observé deux types de morphologies. Pour une force d'appui faible, les nanoparticules apparaissent avec une forme régulière alors qu'en appliquant une force d'appui environ vingt fois plus intense, une morphologie plus complexe apparaît où l'on distingue clairement deux zones : au centre et en périphérie. Cette différence peut être interprétée comme l'existence de deux régions avec des propriétés mécaniques différentes dans les nanoparticules, suggérant ainsi une structure cœur-couronne. Cet exemple souligne également l'importance des paramètres d'acquisition, notamment la force d'appui en mode intermittent sur la morphologie apparente des matériaux mous tels que les assemblages de biopolymères.*

Mots-clés : Microscopie à force atomique (AFM), nanoparticules, lignine de synthèse, hétéroxylanes.

Introduction

Une des caractéristiques des plantes supérieures est l'existence, en dehors de la cellule, d'un matériau complexe : la paroi végétale. Cette structure est un matériau composite formé de trois principaux types de polymères. La cellulose, un polymère de cellobiose de très haut degré de polymérisation, est organisée sous forme cristalline au milieu de microfibrilles qui forment l'armature de la paroi. La principale fonction du réseau cellulosique est de conférer aux parois végétales des propriétés mécaniques remarquables notamment au regard de la faible densité de ce matériau. Les microfibrilles sont entourées d'une matrice amorphe formée par des polysaccharides (hémicellulose) et de lignine. Parmi les rôles importants de ce ciment, on peut citer notamment l'hydrophobation des parois et la résistance aux pathogènes.

Alors que l'organisation de la cellulose est relativement connue, la structure fine et l'organisation du ciment ligno-hemicellulosique reste encore mal connue. Toutefois, les études *in planta* restent délicates et sont rendues difficiles par la grande diversité structurale des hémicelluloses et des lignines. Afin de pallier ces difficultés, des stratégies utilisant des systèmes reconstruits mimant les assemblages naturels ont été développés (Chanliaud *et al.*, 2002 - Touzel *et al.*, 2003 - Chanliaud *et al.*, 2004 - Cathala *et al.*, 2005 - Lairez *et al.*, 2005 - Zykwiniska *et al.*, 2007 - Barakat *et al.*, 2008). Le principal avantage de ces systèmes biomimétiques est de varier à façon les proportions et les structures des polymères qui les composent et de pouvoir les étudier par des techniques inadaptables aux substrats

¹ UR1268 Biopolymères, interactions assemblages URIBIA- INRA - F-44316 Nantes

☎ 02 40 67 51 68 ✉ Cedric.Gaillard@nantes.inra.fr

naturels. Les dehydrogénopolymères sont issus de la polymérisation *in vitro* de monomères de lignines. Ces produits, également appelés lignine de synthèse, ont permis d'approfondir la connaissance des réactions de lignification. Lorsque cette réaction se produit en présence de polysaccharides, des assemblages complexes se forment entre les deux espèces (polysaccharide et lignine de synthèse). Ces complexes peuvent exister sous forme de particules de taille nanométrique possédant une bonne stabilité colloïdale.

L'observation de la morphologie précise de particules nanométriques et la caractérisation de leur composition précise sont des questions complexes auxquelles les outils de microscopie résolutive peuvent apporter des éléments de réponse. Alors que la microscopie électronique à transmission s'est avérée efficace dans la connaissance de la structuration de nanoparticules composites (Gaillard *et al.*, 2007), la microscopie à force atomique peut également y contribuer pleinement (Samori P. 2008).

L'AFM, technique d'analyse de surface mise au point en 1986, (Binnig G., 1986) est basée sur la mesure des forces d'interactions qui se mettent en place lorsqu'une pointe solide est rapprochée de la surface d'un échantillon. Les atomes de la surface et ceux de l'extrémité de la pointe ont tendance à s'attirer jusqu'à ce qu'ils soient à une distance proche, où ils se repoussent alors. La pointe AFM est fixée à l'extrémité d'un levier souple dont la mesure précise de la flexion, par le biais d'une réflexion laser, permet d'accéder à une mesure de la force d'interaction. Nous montrons sur la **figure 1**, un schéma type du principe de fonctionnement d'un AFM. En imposant une consigne de force (ou set point), la pointe parcourt l'échantillon en variant son inclinaison pour compenser les fluctuations de la force d'interaction et pour la conserver constante. L'inclinaison de la pointe est traduite par des variations de hauteur entre deux points consécutifs d'une même ligne de l'image en cours d'acquisition. En balayant la pointe ligne par ligne, on reconstruit l'image de la surface de l'échantillon.

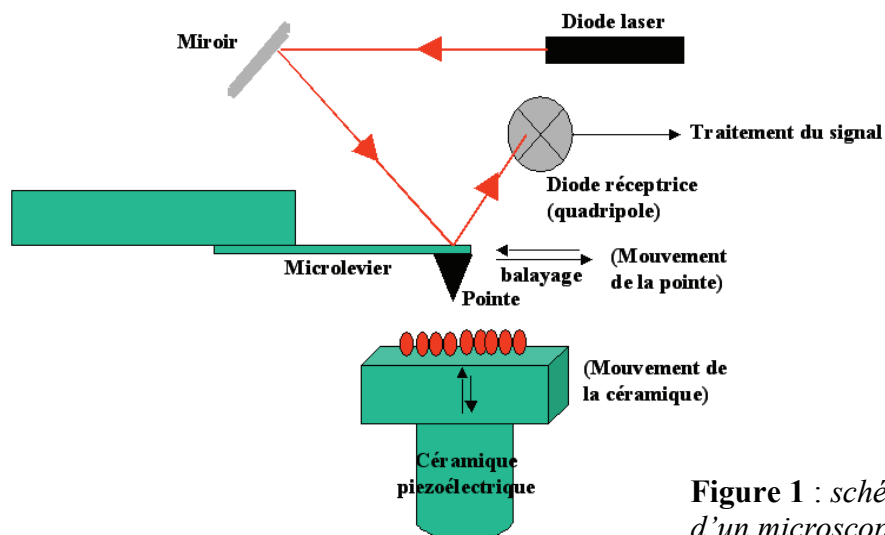


Figure 1 : schéma du fonctionnement d'un microscope de force atomique

Les différents modes de fonctionnement (contact, non-contact, intermittent) apportent des informations complémentaires en termes d'imagerie. En mode contact, la pointe est balayée de façon continue en surface de l'échantillon. En mode résonant, ou en mode contact intermittent ou 'tapping', le micro levier supportant la pointe est mis en oscillation forcée avec une fréquence d'oscillation de valeur voisine de la fréquence propre de résonance du système levier/pointe. Dans ce mode, la pointe n'est pas en contact permanent avec l'échantillon, ce qui préserve mieux les échantillons les plus mous. De plus, l'enregistrement

de l'amplitude d'oscillation peut être utilisé comme signal d'erreur pour détecter toute modification en surface de l'échantillon ou être traité pour suivre le retard de phase de l'oscillogramme du levier en interaction avec l'échantillon et reconstituer ainsi une image de détection de phase très sensible aux changements des propriétés de la surface (adhésion, viscoélasticité, ...) qui apparaissent sur l'image par des variations de contraste. Outre l'ADN qui reste l'exemple de l'échantillon biologique le plus étudié par AFM, les caractéristiques structurales et les propriétés physiques de très nombreux biopolymères ont été obtenues par AFM (Alessandrini *et al.*, 2005 – Ellis *et al.*, 2006 – McIntire et Brant, 1997 – Bottomley *et al.*, 2004). Nous rapportons ici, l'étude par AFM de nanoparticules formées par des hétéroxylyanes, une famille d'hémicellulose caractéristique des graminées et des lignines de synthèse issues de la polymérisation de l'alcool coniférylique (**figure 2**).

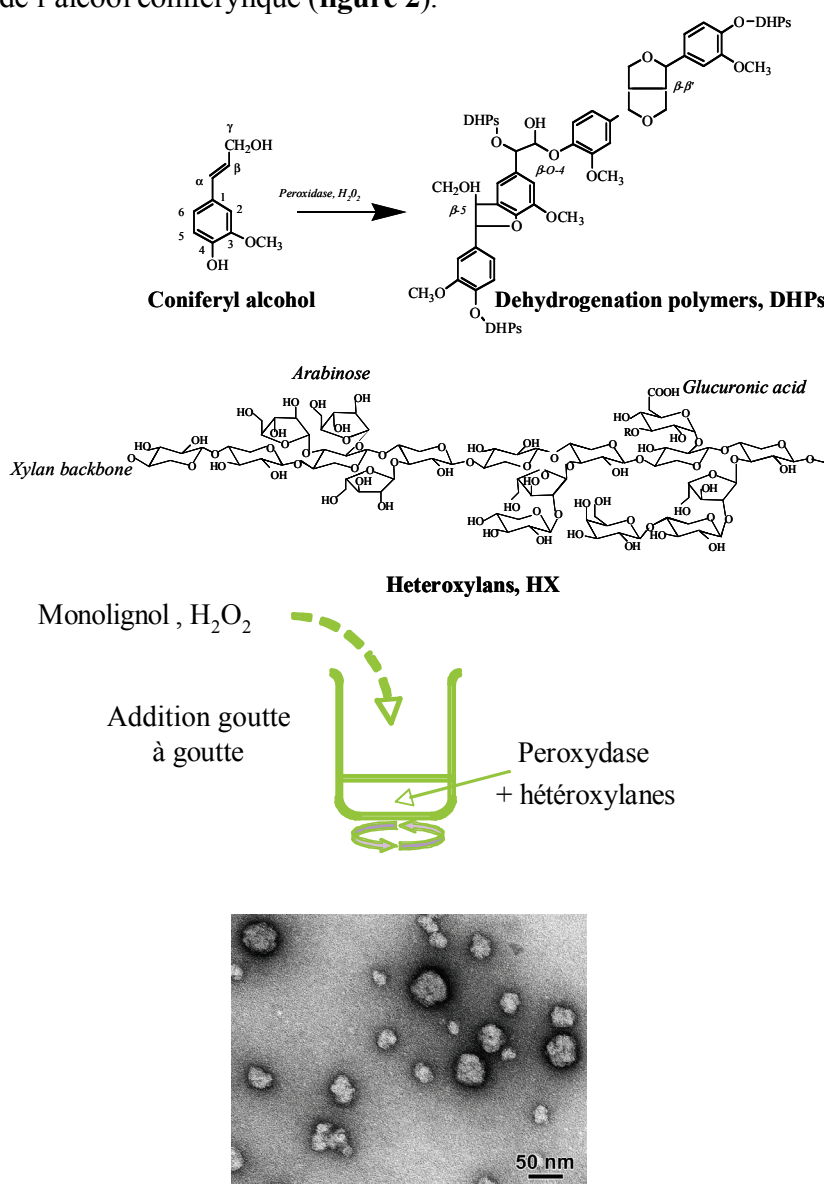


Figure 2 : schéma de la structure des dehydrogénopolymères, des hétéroxylyanes et du protocole de polymérisation. Les complexes hétéroxylyanes/dehydrogénopolymères forment des nanoparticules de forme sphérique (observation en microscopie électronique à transmission après coloration négative).

Nous avons étudié l'organisation interne de ces particules en mode intermittent. En faisant varier l'énergie de vibration imposée à la pointe AFM, on peut observer deux types de morphologie.

1. Matériels et méthodes

Nous avons acquis tous les réactifs utilisés dans cette étude auprès de la société Sigma-Aldrich et ils sont utilisés sans purification additionnelle.

1.1 Synthèse des composés hétéroxylyanes/lignine de synthèse

Les hétéroxylyanes utilisés dans cette étude sont extraits à partir de son de Maïs selon le protocole préalablement décrit par Chanliaud *et al.*, (1995) Nous avons réalisé l'extraction en milieu alcalin (1% Ca(OH)₂), à forte température (90°C). Par conséquent la fraction obtenue est presque entièrement dépourvue d'acide férulique.

Nous avons effectué la synthèse des complexes hétéroxylyanes/lignine de synthèse (ou hétéroxylyanes/dehydrogénopolymères) selon le protocole de Barakat *et al.*, (2007). Brièvement, l'alcool coniférylique est obtenu à partir du coniféraldéhyde selon la méthode proposée par Ludley et Ralph (1996). Nous avons synthétisé des complexes hétéroxylyanes/lignine selon la méthode « Zutropfverfahren » qui consiste à additionner goutte à goutte du monomère (concentration finale 1g/l) et du peroxyde d'hydrogène, le co-facteur de l'enzyme (2 équivalents par rapport à l'alcool coniférylique) sur une solution d'hétéroxylyanes contenant 5 mg de peroxydase (Peroxydase de raifort, 250-330 unité par mg de solide). Le temps d'addition total est de 4 heures et le volume final de 250 ml. Toutes les solutions d'hétéroxylyanes sont préparées à 1g/l dans un tampon phosphate 0,15 M pH=6.

1.2 Microscopie à force atomique

- Préparation des échantillons

Les solutions concentrées de HX-DHPs sont préalablement diluées dans de l'eau ultra pure pour obtenir une concentration de 10 µg/ml. Pour réaliser une observation par AFM, un volume de 5 µl de la solution diluée est placé sur un support plan de mica dont la surface a été rafraîchie en clivant le premier plan atomique. Le support est séché par balayage à l'argon pendant 10 min puis stocké à l'abri de la poussière avant son observation.

- Imagerie et traitement de l'image

Les images AFM sont acquises à sec et à température ambiante sur un microscope Autoprobe CP Park Scientific Instrument (Sunnyvale, CA). Le microscope est utilisé en mode intermittent, ou tapping, avec des pointes de silicium dopées au phosphore (Veeco Probes, CA – USA), de constante de raideur du levier de 50 N/m et mises en vibration à une fréquence proche de leur fréquence de résonance (282 kHz). Les vitesses de balayage varient entre 0.5 et 1 Hz. Deux forces d'appui F_{av} de la pointe sur la surface de l'échantillon ont été choisies ici : $F_{av} = 4,1$ nN et $F_{av} = 77,8$ nN.

2. Résultats et discussion

2.1 Synthèse des nanoparticules

Les hétéroxylyanes utilisés dans cette étude ont été extraits de son de maïs. Le son de maïs n'étant pas lignifié, présente l'avantage d'être exempt de toute contamination par de la lignine résiduelle qui pourrait rendre difficile l'exploitation des résultats. Le choix des xylanes est basé sur le fait qu'il représente la famille d'hémicellulose majoritaire des parois lignifiées. Le

monomère de lignine choisi, l'alcool coniférylique (monomère G pour Gaiacyl) correspond également au monomère le plus abondant des parois lignifiées.

Nous avons obtenu les complexes hétéroxyloxygènes/lignine de synthèse par la méthode d'ajout « Zutropfverfahren » qui consiste à ajouter goutte-à-goutte les monolignols et le cofacteur de l'enzyme sur une solution de peroxydase. La réaction de polymérisation appartient à la classe des polycondensations par recombinaison de radical. Le monomère est oxydé par la peroxydase par un mécanisme monoélectronique. Le radical formé existe sous quatre formes mésomères limites qui se recombinent entre elles pour former des dimères en début de réaction puis avec des espèces de plus haut poids moléculaires par la suite pour former le polymère final. Ce processus, de par l'existence des quatre formes mésomères en équilibre, est donc initié par voie enzymatique et dirigé par les conditions physico-chimiques de la réaction (concentration des réactifs, pH, polarité du milieu, etc.). La présence de polysaccharides peut influencer la réaction ; par conséquent, l'influence de la concentration des polysaccharides pouvant être importante, nous avons solubilisé tous les réactifs dans une solution à 1g/l d'hétéroxyloxygènes dissous dans un tampon phosphate afin d'éviter de faire varier leur concentration au cours de la réaction. La réaction conduit à la formation d'une solution opalescente stable durant des mois. L'observation au microscope électronique des particules présentes dans la solution (**figure 2**) indique que ces objets sont de taille nanométrique expliquant la stabilité colloïdale observée. Leur morphologie est notamment liée à la structure des éléments constitutifs des complexes (monomères de lignine, présence de substituants féruliques etc.) (Barakat *et al.*, 2008). Dans le cas présent, les hétéroxyloxygènes et le monomère choisis forment des objets relativement sphériques de quelques dizaines de nanomètres. Afin d'étudier la structuration interne de ces molécules, nous les avons soumises à une étude par microscopie à force atomique.

- Calcul des forces d'indentation

Au cours de cette étude, l'énergie de vibration imposée à la pointe est optimisée de façon à produire une force d'appui moyenne (F_{av}) plus ou moins importante selon le niveau de déformation que l'on souhaite appliquer à l'objet. Cette déformation sera plus ou moins prononcée en fonction des variations de rigidité des zones scannées de ce même objet.

La force d'appui moyenne se définit selon l'équation empirique suivante (Lei *et al.*

, 2007).

$$F_{av} = \frac{1}{2} \frac{k}{Q} \left[1 - \frac{A_{sp}}{A_0(f_0)} \right] A_0(f) \beta \quad (1)$$

où :

k représente la constante de raideur du levier

A_{sp} correspond à l'amplitude d'oscillation de la pointe lorsque celle-ci est au contact de l'échantillon (également appelé 'set point')

f_0 est la fréquence de résonance de la pointe lorsque le cantilever est en mouvement d'oscillation libre (hors du contact avec l'échantillon)

$A_0(f_0)$ est l'amplitude libre d'oscillation de la pointe mise en mouvement à la fréquence f_0

f correspond à la fréquence d'oscillation choisie pour imager l'échantillon

$A_0(f)$ est l'amplitude libre correspondant à une oscillation de la pointe dans l'air avec la fréquence de travail f

$\beta = \frac{A_0(f)}{A_0(f_0)}$ est le paramètre de résonance

$Q = \frac{f_0}{\Delta f}$ donne le facteur de qualité, Δf étant la largeur de bande correspondant à une amplitude de 0,707 l'amplitude maximale (**figure 3**).

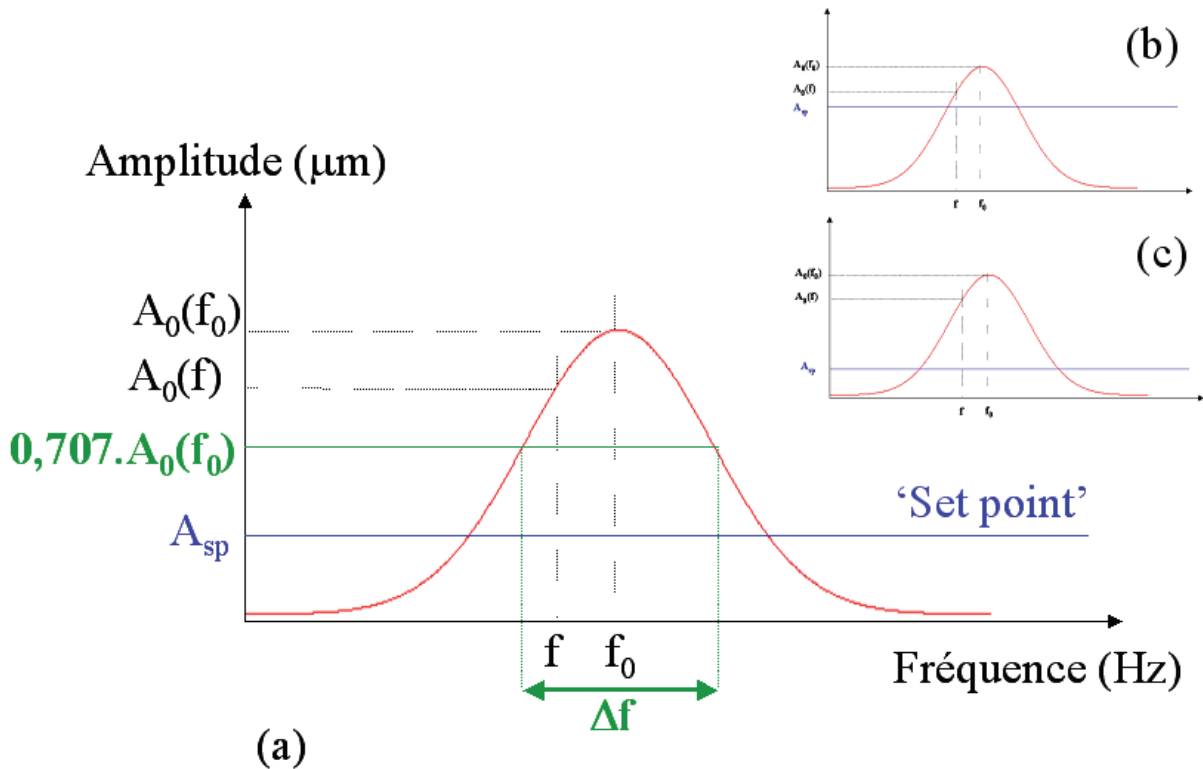


Figure 3 : (a) schéma de la courbe de résonance de la pointe donnant l'amplitude du mouvement de la pointe en fonction de la fréquence de vibration imposée à la pointe ;
 (b) positionnement des paramètres de fréquence et d'amplitude pour imposer une faible énergie à la pointe et obtenir une force d'appui moyenne (F_{av}) faible ;
 (c) positionnement des paramètres de fréquence et d'amplitude pour imposer une forte énergie à la pointe et obtenir une force d'appui moyenne (F_{av}) forte.

La **figure 3a** montre la représentation schématique de la courbe de résonance d'une pointe AFM en mode intermittent ainsi que le positionnement des principaux paramètres expérimentaux intervenant pour le calcul de la force d'appui moyenne (F_{av}) d'après l'équation empirique de Lei.

En fixant une fréquence d'oscillation f importante (mais restant inférieure à la fréquence de résonance), et en choisissant une amplitude d'oscillation du set point A_{sp} élevée, il est possible d'imposer à la pointe AFM une énergie de vibration faible et produire une valeur de force d'appui moins importante (**figure 3b**). Inversement, en choisissant une amplitude d'oscillation du set point A_{sp} plus faible, il est possible d'imposer à la pointe AFM une énergie de vibration forte et produire une valeur de force d'appui plus élevée (**figure 3c**).

Pour cette étude, nous avons choisi deux valeurs de force d'appui F_{av} pour caractériser la morphologie des objets étudiés : $F_{av} = 4.1$ nN et $F_{av} = 77.8$ nN. Elles communiquent,

respectivement, une énergie de vibration à la pointe faible et élevée. Les valeurs de ces deux forces d'appui F_{av} sont calculées d'après l'équation (1) à partir des valeurs expérimentales des différents paramètres rassemblées dans le **tableau 1**.

f_0 (Hz)	$A_0(f_0)$ (μm)	f (Hz)	$A_0(f)$ (μm)	A_{sp} (μm)	β	Δf (Hz)	Q	F_{av} (nN)
281710	0.183	281420	0.134	0.06	0.732	710	396.7	4.1
282530	0.297	278070	0.271	0.123	0.912	6070	46.5	77.8

Tableau 1 : paramètres expérimentaux mesurés à partir des courbes de résonance du levier de la pointe AFM

2.2 Imagerie des nanoparticules

A faible force d'appui, les nanoparticules déposées sur une surface de mica apparaissent comme des objets ovoïdes dispersés (**figures 4a, 4d et 4g**). Cette observation est cohérente avec les images MET (**figure 2**) où les nanoparticules ont une forme sphérique révélée par coloration négative. Lors du dépôt sur la surface, les particules s'étalent comme attesté, dans le cas d'une faible indentation, par les mesures des hauteurs sur les profils linéaires (**figure 4c**). Les particules qui présentent en solution des diamètres de l'ordre de la centaine de nanomètres ont une hauteur de seulement quelques dizaines de nanomètres. Cette observation indique la nature fragile et molle des nanoparticules, cohérente avec une structure de type gel gonflé d'eau. Cette caractéristique explique les images observées à plus forte force d'appui.

En effet, dans cette configuration d'analyse, les particules apparaissent également avec une forme globalement ovoïde mais présentent une morphologie interne différente (**figures 4b, 4e et 4h**). Ces particules ont un profil beaucoup plus accidenté, laissant apparaître deux zones distinctes (**figure 4f**). La partie externe est aplatie alors que la partie interne forme une zone plus abrupte.

Ces différences entre expériences à faible force d'appui et force d'appui plus élevée sont visibles en comparant les profils linéaires des **figures 4c et 4f** ainsi que sur les représentations en trois dimensions (**figures 4g et 4h**). Tout semble donc indiquer que la partie périphérique des particules est très fortement indentée alors que la partie centrale est plus résistante à la déformation.

Ces résultats sont cohérents avec d'autres exemples rapportés dans la littérature sur les matériaux composites. Ainsi, les images de particules cœur-couronne obtenus à une force d'indentation de 100 nN sont également affectés par l'indentation (Sommer *et al.*, 1995). De même, une autre étude, portant sur des particules de films sensibles à la pression, rapporte que ces objets apparaissent concaves à faible force d'appui et convexes quand une force plus importante est appliquée (Lei *et al.*, 2007).

Ces résultats indiquent que la structure des particules est hétérogène. Un matériau possédant une plus grande résistance mécanique, en raison, soit de la densité de matière soit de la nature du matériau, est localisé au centre des particules alors que l'extérieur des particules est constitué d'un matériau présentant de plus faibles caractéristiques mécaniques. En combinaison avec d'autres techniques d'investigation (diffusion de la lumière, sonde

chimique), nous avons démontré que le cœur des nanoparticules est constitué de lignine de synthèse et d'hétéroxyanes alors que l'extérieur des particules est formé d'une couronne d'hétéroxyanes.

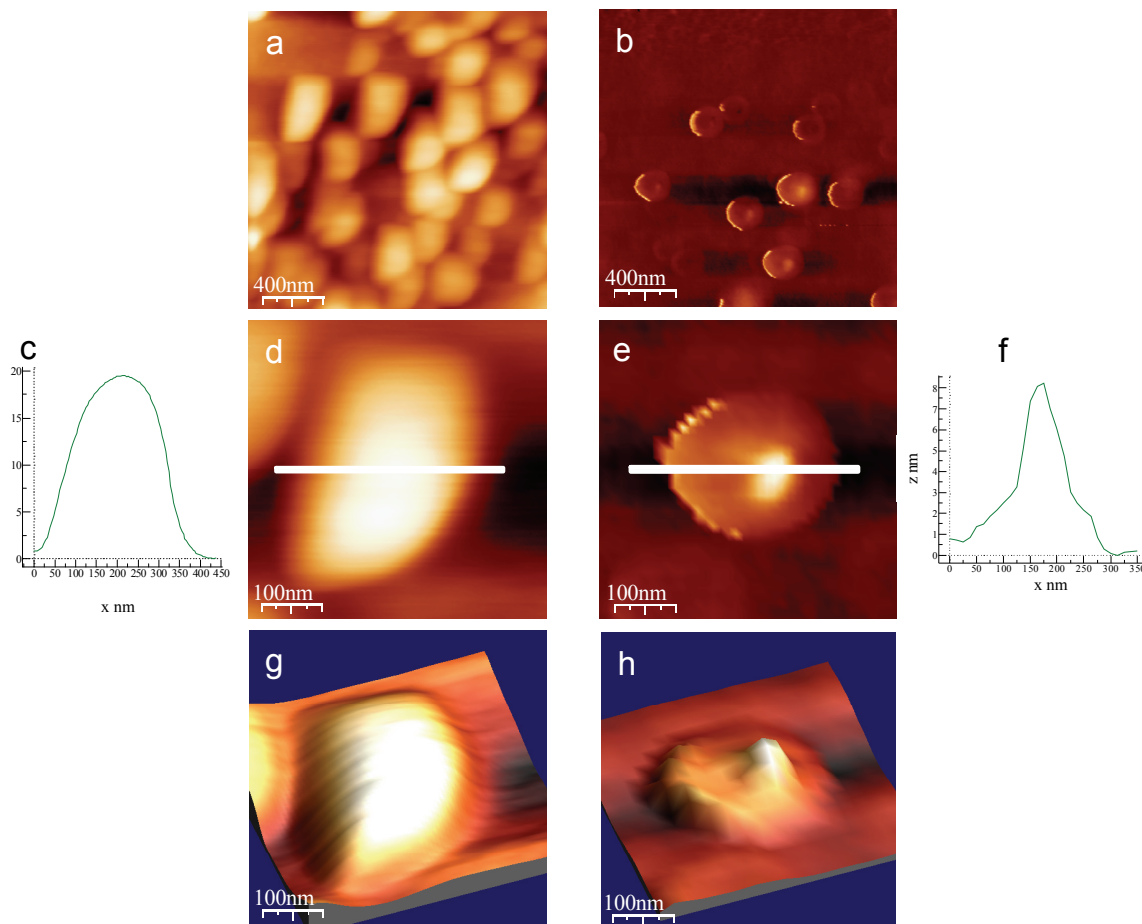


Figure 4 : Images AFM en mode topographie des nanoparticules arabinoxylanes/lignines de synthèse obtenues : (a, d, g) à faible force d'appui ; (b, e, h) à forte force d'appui. Les représentations (c) et (f) correspondent aux profils linéaires obtenus au travers des particules (d) et (e) respectivement à faible et forte force d'appui.

Conclusion

Les résultats acquis par AFM pour obtenir des informations sur la morphologie et sur la structuration interne de nanoparticules démontrent l'efficacité de cet outil de microscopie, en complémentarité avec la microscopie électronique, pour approcher la structure fine de nanoparticules complexes à base de biopolymères et plus largement l'organisation d'assemblages biologiques. Pour une énergie de vibration correspondant à une force d'appui faible, le profil présente une forme régulière alors qu'en augmentant l'intensité de la force d'appui de la pointe sur l'échantillon, les particules subissent plus fortement l'effet de la pointe laissant apparaître un profil plus abrupt entre l'intérieur et l'extérieur des particules. Cette différence est interprétée par une organisation des polymères dans la particule en

structure cœur-couronne où le cœur, moins déformé par la pointe, est logiquement plus rigide que la couronne périphérique alors plus molle.

Toutefois, il faut souligner l'importance des paramètres d'acquisition, notamment la force d'appui en mode intermittent, sur la morphologie apparente des matériaux mous tels que les assemblages de biopolymères. L'optimisation de ces critères est essentielle pour une interprétation correcte des images, et elle peut être une source d'information tout à fait pertinente et riche.

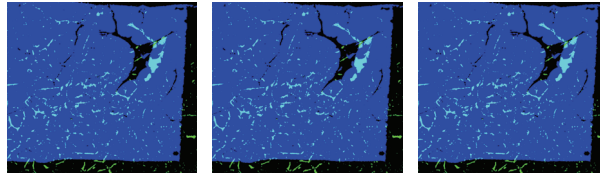
Bibliographie

- Alessandrini A., Facci P. (2005) AFM: a versatile tool in biophysics, *Meas. Sci. Technol.* 16 R65-R92
- Barakat A., Putaux J.-L., Saulnier L., Chabbert B., Cathala B. (2007) Characterization of arabinoxylan-dehydrogenation polymer (synthetic lignin polymer) nanoparticles, *Biomacromolecules* 8: 1236-1245
- Barakat A., Gaillard C., Lairez D., Saulnier L., Chabbert B., Cathala B. (2008) Supramolecular Organization of Heteroxylan-Dehydrogenation Polymers (Synthetic Lignin) Nanoparticles, *Biomacromolecules* 9: 487-493
- Binnig G., Quate C.F., Gerber C. (1986) Atomic force microscope, *Phys. Rev. Lett.* 56: 930-933
- Bottomley L.A., Lillehei P.T., Poggi M.A., Horowitz E., A. J.RConticello V. (2004) Force Spectroscopy of Biopolymers: Correlating Molecular Structure with Single Molecule Elasticity, *Microscopy and Microanalysis* 10: 204-205
- Cathala B., Rondeau-Mouro C., Lairez D., Belval F.B., Durand H., Gorrichon L., Touzel J.P., Chabbert B., Monties B. (2005) Model systems for the understanding of lignified plant cell wall formation, *Plant Biosystems* 139: 93-97
- Chanliaud E., Saulnier L., Thibault J.-F. (1995) Alkaline extraction and characterisation of heteroxylans from maize bran, *Journal of Cereal Science* 21: 195-203
- Chanliaud E., Burrows K., Jeronimidis M. G., Gidley M. (2002) Mechanical properties of primary cell wall analogues, *Planta* 215: 989-996
- Chanliaud E., De Silva J., Strongitharm B., Jeronimidis G., Gidley M.J. (2004) Mechanical effects of plant cell wall enzymes on cellulose/xyloglucan composites, *Plant Journal* 38: 27-37
- Ellis J.S., Allen S., Chim Y.T.A., Roberts C.J., Tendler S.J.B., Davies M.C. (2006) Molecular-scale studies on biopolymers using atomic force microscopy, *Polymer Therapeutics II: Polymers as Drugs, Conjugates and Gene Delivery Systems*, Springer-Verlag Berlin, Berlin, 123-172
- Gaillard C., Fuchs G., Plummer C.J.G., Stadelmann P.A. (2007) The morphology of submicron-sized core-shell latex particles: an electron microscopy study, *Micron* 38: 522-535
- Lairez D., Cathala B., Monties B., Bedos-Belval, F. Duran D., Gorrichon L., (2005) On the first steps of lignification : aggregation during coniferyl alcohol polymerisation in pectin solution., *Biomacromolecules*, 763-774

- Lei C.H., Ouzineb K., Dupont O., Keddie J.L. (2007) Probing particle structure in waterborne pressure-sensitive adhesives with atomic force microscopy, *Journal of Colloid and Interface Science* 307: 56-63
- Ludley F.H., Ralph J. (1996) Improved preparation of Coniferyl and Sinapyls Alcohols, *J. Agric. Food Chem.* 44: 2942-2943
- McIntire T.M., Brant D.A. (1997) Imaging of individual biopolymers and supramolecular assemblies using noncontact atomic force microscopy, *Biopolymers* 42: 133-146
- Samori P. (2008) STM and AFM studies on (bio)molecular systems: unravelling the nanoworld" Series: Topics in Current Chemistry, Vol. 285, Springer, p. 318
- Sommer F., Duc T.M., Pirri R., Meunier G., Quet C. (1995) Surface Morphology of Poly(butyl acrylate)/Poly(methyl methacrylate) Core Shell Latex by Atomic Force Microscopy, *Langmuir* 11: 440-448
- Touzel J.P., Chabbert B., Monties B., Debeire P., Cathala B. (2003) Synthesis and characterization of dehydrogenation polymers in *Glucunoacetobacter xylinus* cellulose and cellulose/pectin composite., *Journal of Agric. Food Chemistry* 51: 981-986
- Zykwinska A., Gaillard C., Buleon A., Pontoire B., Garnier C., Thibault J.F., Ralet M.C. (2007) Assessment of *in vitro* binding of isolated pectic domains to cellulose by adsorption isotherms, electron microscopy, and X-ray diffraction methods, *Biomacromolecules* 8: 223-232

Chapitre III

Analyse d'images



Macrovision et analyse granulométrique en niveaux de gris pour l'analyse histologique de tissus végétaux

Marie-Françoise Devaux¹, Alain Sire¹, Patrice Papineau¹

Résumé : *Les cellules végétales des fruits, des racines et dans une moindre mesure des tiges, sont souvent de très grande taille, jusqu'à 1 mm de longueur dans le cas du péricarpe de tomate. Par microscopie optique, le champ de vue avec un objectif $\times 10$ étant d'environ 1 mm², la caractérisation histologique est difficile. Nous avons développé une approche de quantification à l'échelle macroscopique avec des champs de vue de l'ordre de 1 cm² dans l'objectif de caractériser des surfaces représentatives de tissus végétaux. Un dispositif d'acquisition d'images a été construit comprenant un système d'éclairage, des platines motorisées pour contrôler le positionnement de la caméra et des échantillons. La morphologie cellulaire est quantifiée par analyse granulométrique en niveaux de gris, méthode globale ne nécessitant pas de segmentation des cellules et donnant des informations sur leur taille et leur allongement.*

Mots-clés : Macrovision, tissus végétaux, granulométrie, morphologie mathématique, taille de cellules

Introduction

La structure cellulaire des tissus végétaux est étudiée pour son rôle dans les propriétés d'usage des plantes. Par exemple, la taille des fruits ou de leurs tissus dépend de la taille, de la forme et du nombre de leurs cellules (Cheniclet *et al.*, 2005, Harada *et al.*, 2005). Le contrôle de la qualité des produits nécessite d'établir des liens entre la génétique, la structure et les propriétés des tissus végétaux (Chaib *et al.*, 2007). Pour cela, il est nécessaire d'analyser un nombre représentatif d'échantillons et de quantifier chacune de ces caractéristiques.

Classiquement, les études histologiques sont réalisées à l'échelle microscopique. Dans le cas des organes de stockage - fruits, racines, tubercules - les cellules peuvent être très grandes, jusqu'à 1 mm de longueur dans le cas du fruit de tomate et un petit nombre d'entre elles est visible dans le champ de vue d'un microscope. Afin de réaliser des analyses statistiques, les temps de préparation et d'acquisition des images doivent être minimisés. Dans cet article, nous proposons un système d'acquisition d'images à l'échelle macroscopique dédié à la visualisation de coupes effectuées sur des tissus végétaux frais et sans étapes de coloration ainsi qu'une procédure de traitement des images adaptée au type d'images acquises.

L'analyse histologique comprend la mesure de la taille et de la forme des cellules ainsi que leur arrangement. En microscopie les cellules sont identifiées individuellement et des paramètres morphologiques sont extraits pour chacune d'elle. En macrovision la segmentation de chaque cellule est difficile du fait du manque de résolution pour les plus petites et d'un recouvrement possible de plusieurs couches cellulaires. Nous proposons d'appliquer des méthodes d'analyse de *texture d'images* dont l'objectif est de quantifier les variations locales de niveaux de gris. La présence de petites cellules provoque des variations de niveaux de gris

¹ UR 1268 Biopolymères, interactions assemblages URBIA-INRA, F-44316 Nantes

☎ 02 40 67 51 93 ✉ Marie-Françoise.Devaux@nantes.inra.fr

plus fréquentes que les grandes cellules ce qui induit une texture visuelle plus fine. Il existe de nombreuses méthodes d'analyse de texture d'images (Haralick, 1979, Bharati *et al.*, 2004) basées sur le traitement du signal (transformée de Fourier, en ondelettes), sur des comptages statistiques (méthode des co-occurrences de niveaux de gris, longueur de plage), sur des modélisations de transitions de niveaux de gris (modèle autorégressif, champ de markov), sur des mesures multi résolution (fractal, granulométrie par morphologie mathématique). Si beaucoup de méthodes sont performantes notamment pour classer des images, leur interprétation n'est pas toujours évidente. Parmi les méthodes disponibles, nous avons retenu l'*analyse granulométrique en niveaux de gris* issue du domaine de la *morphologie mathématique* (Soille, 2003) car elle s'interprète directement en termes de taille et de forme des objets observés.

1. Matériels et méthodes

1.1 Préparation des échantillons

L'ensemble du dispositif a été conçu pour observer des tissus végétaux issus principalement de fruits, de racines et de tiges avec une préparation des échantillons la moins lourde possible. Des cubes d'environ 1 cm³ sont prélevés et des coupes d'épaisseur contrôlée sont effectuées directement sur le produit frais à l'aide d'un microtome à lame vibrante². L'épaisseur des coupes est choisie pour minimiser l'observation de couches cellulaires superposées. En pratique, les épaisseurs dépendent de la taille des cellules et du comportement de l'échantillon à la coupe. Elles varient de 75 à 300 µm.

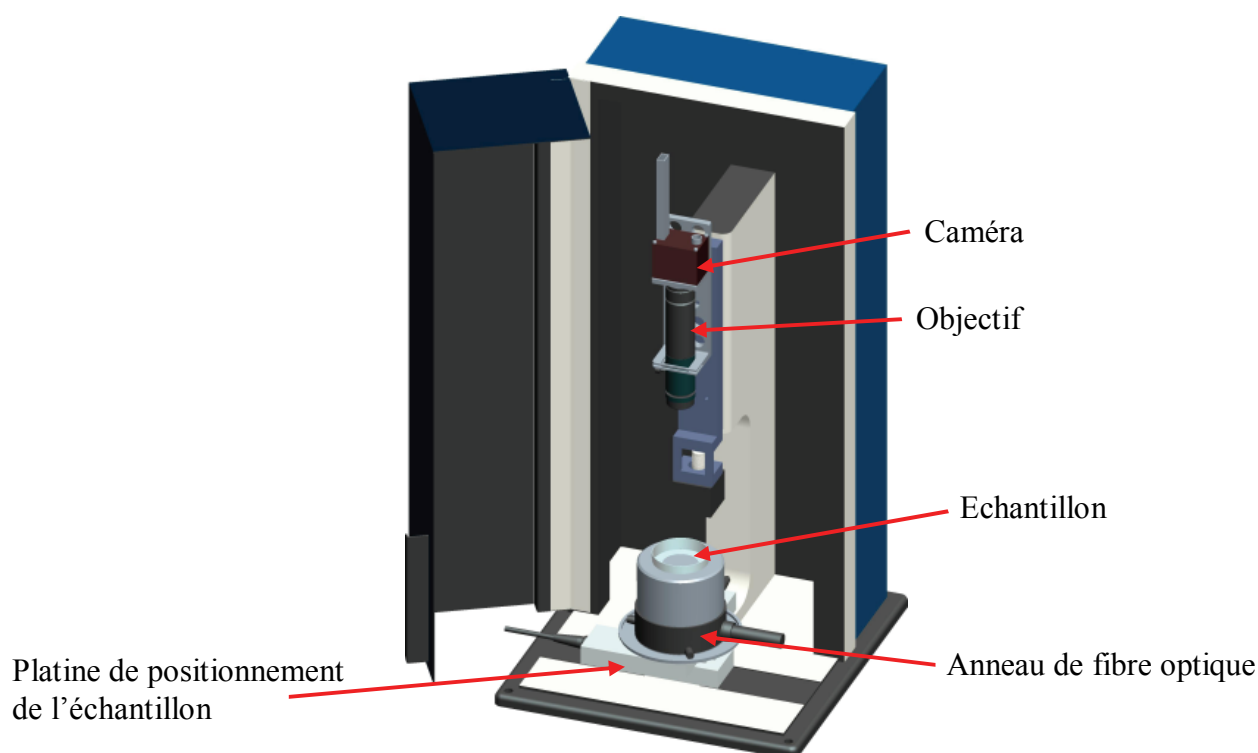


Figure 1 : système d'acquisition d'images BlueBox

² HM 650 V - Microm International GmbH, Walldorf - Allemagne

1.2 Système d'acquisition d'images BlueBox

Un dispositif d'acquisition d'images à l'échelle macroscopique a été construit comprenant une caméra CCD, des objectifs, un système d'éclairage dont l'intensité est contrôlée, des platines motorisées pour positionner la caméra et les échantillons (**figure 1**). Le matériel est décrit plus précisément dans Papineau *et al.*, (2008).

Un anneau de fibres optiques (SCHOTT DCR® IV Light Source) est placé sur un fond noir de manière à rétro-éclairer les coupes avec un angle de 35° environ. La coupe est déposée dans une boîte de pétri placée 5 cm au-dessus du fond noir.

A l'aide d'une caméra PROSILICA EC1600³ on acquiert des images monochromes de 1620 × 1220 pixels dont les niveaux de gris sont codés soit sur 8 bits entre 0 (noir) et 255 (blanc), soit sur 12 bits entre 0 (noir) et 4096 (blanc). La caméra est équipée d'un objectif PRECISE EYE de chez NAVITAR⁴ à focale fixe. Trois grossissements sont possibles en fonction de la lentille choisie : 0,6X, 1,2X et 2,4X. Les champs de vue et la résolution disponibles sont donnés dans le **tableau 1**. Le champ de vue effectif est mesuré avant chaque manipulation grâce à une mire étalon.

Objectif	0,6X	1,2X	2,4X
Taille du pixel	7,33 µm	3,66 µm	1,8 µm
Champ de vue	11,88 × 8,95 mm	5,94 × 4,47 mm	2,97 × 2,24 mm

Tableau 1 : *champ de vue et résolution disponibles*

L'ensemble caméra/objectif est placé sur un rail motorisé. La netteté de l'image est obtenue en déplaçant l'ensemble caméra/objectif, l'objectif étant réglé dans une position fixe.

L'échantillon est déplacé en X et Y sous la caméra grâce à deux platines motorisées MFA-CC⁵ placées perpendiculairement l'une sur l'autre. L'utilisation de platines motorisées permet d'acquérir des images adjacentes sans rotation de l'échantillon qui peuvent être facilement assemblées sous la forme d'images mosaïques.

Le système est piloté par un logiciel développé sous LabView 8.2 (<http://www.ni.com>) conçu pour enregistrer et recharger les réglages correspondant à un type d'acquisition sous la forme de fichiers de protocoles d'acquisition d'images.

1.3 Granulométrie en niveaux de gris

L'analyse granulométrique par morphologie mathématique a été développée à l'Ecole des Mines de Paris (Serra, 1982). Son intérêt pour l'analyse de la taille des cellules de péricarpe de tomate a été montré dans (Devaux *et al.*, 2008).

Le principe de base de la morphologie mathématique est de transformer l'image au travers d'un *masque* de géométrie connue appelé *élément structurant* que l'on déplace de façon à ce que son origine passe par toutes les positions de l'image. La taille et la forme de cet élément sont choisies pour mettre en évidence certaines caractéristiques de l'image. Les éléments

³ Distributeur : Alliance Vision, F-26000 Montélimar

⁴ Distributeur : Alliance Vision, France

⁵ MICRO-CONTROLE SPECTRA-PHYSICS S.A, F- 91000 Évry

structurants usuels sont le carré et la ligne. Le carré est caractérisé par la taille du côté et la ligne par sa longueur et son orientation (**figure 2**).

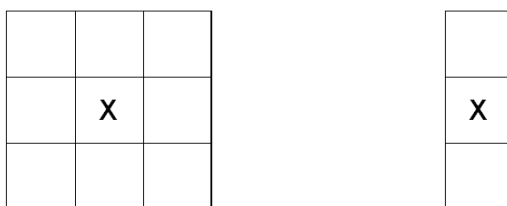


Figure 2 : éléments structurants carré et linéaire vertical de taille 3 pixels

La croix marque le pixel de référence modifié en fonction des valeurs de niveaux de gris de ses voisins. Les voisins pris en compte sont ceux vus au travers de l'élément structurant

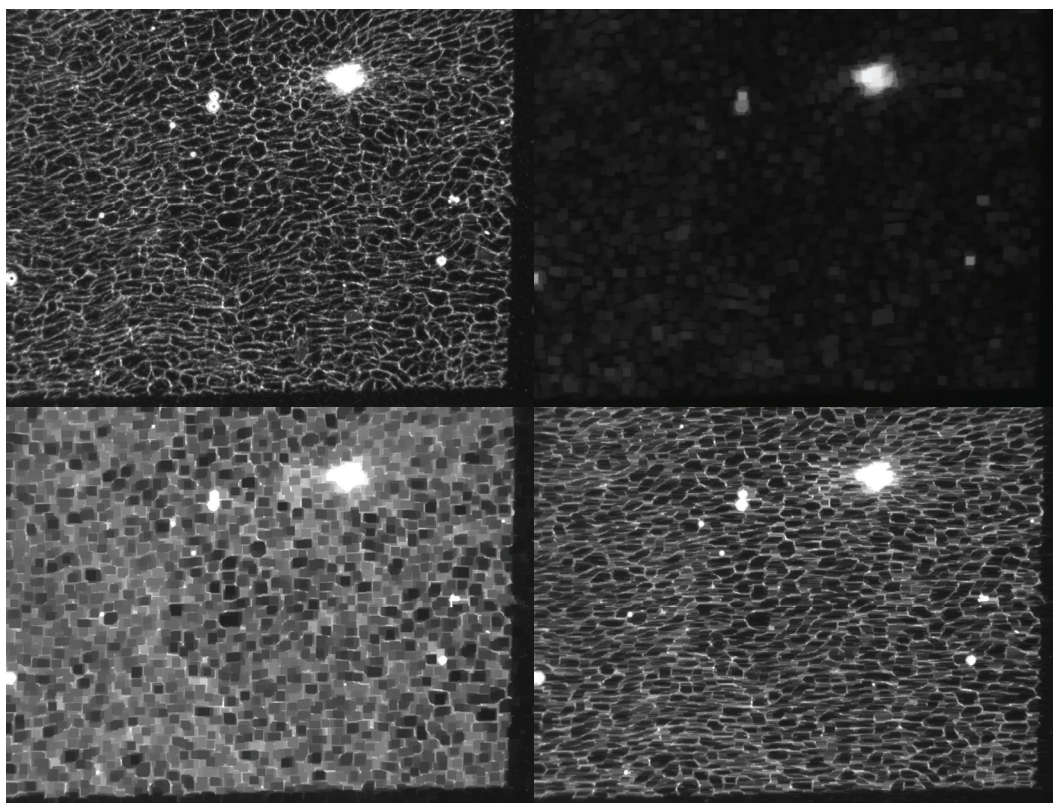


Figure 3 : image de pomme près du cœur

Coupe d'épaisseur 150 μm - Champ de vue : 5,8 x 4,4 mm^2 - résolution : 3,62 μm ;
 Haut : image d'origine : les cellules apparaissent en noir, les parois, les faisceaux vasculaires, les bulles en blanc - ouverture de taille 10 : élément structurant carré ;
 Bas : fermetures de taille 10 - éléments structurants carré et linéaire horizontal ;
 La taille de la fermeture est donnée en nombre de pixel de part et d'autre du pixel de référence : ainsi, la fermeture de taille 10 correspond à un carré de taille 21 pixels.

Les transformations de base sont l'érosion et la dilatation. L'érosion consiste à donner au pixel central la valeur minimum observée dans la fenêtre définie par l'élément structurant et la dilatation la valeur maximum. L'effet est de respectivement diminuer et augmenter la taille des objets clairs. En combinant érosion et dilatation, deux nouvelles transformations sont obtenues : l'ouverture (érosion suivie d'une dilatation de même taille) et la fermeture

(dilatation suivie d'une érosion de même taille). L'ouverture et la fermeture ont pour effet d'éliminer les objets respectivement clairs et foncés plus petits que l'élément structurant tout en préservant la taille des objets plus grands (**figure 3**). Après une ouverture de taille 10, toutes les parois des cellules sont éliminées et le faisceau et les plus grosses bulles sont conservés. Après une fermeture, les cellules dont au moins une dimension est plus petite que la taille du carré sont éliminées ; la taille des cellules les plus grandes est préservée. Ouverture et fermeture peuvent être comparées à un tamisage des objets respectivement clairs et foncés observés dans l'image.

Une distribution de taille s'obtient en appliquant des transformations de taille croissante et en effectuant une mesure après chaque transformation. Dans le cas des images de tissus végétaux, les cellules apparaissent en sombre et la taille des cellules est analysée en utilisant des fermetures de taille croissante. Après une fermeture, la somme des niveaux de gris dans l'image, notée V , augmente. Cette augmentation dépend de la quantité de cellules éliminées. Une courbe granulométrique est calculée comme le pourcentage d'augmentation de la somme des niveaux de gris en fonction de la taille de fermeture :

$$g(i) = \frac{(V(i) - V(i+1))}{(V(\text{initial}) - V(\text{final}))} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

où $V(i)$ est la somme des niveaux de gris après la fermeture de taille i , $V(\text{Initial})$ la somme des niveaux de gris de l'image de départ et $V(\text{final})$ la somme des niveaux de gris après la dernière fermeture.

Les courbes granulométriques sont tracées en fonction de la taille de l'élément structurant exprimée en pixel ou en μm . Des procédures d'analyse granulométrique en niveaux de gris ont été développées sous Matlab (V2007a - www.mathworks.fr) pour s'appliquer à des collections d'images.

1.4 Régions d'intérêt

L'analyse granulométrique ne doit porter que sur la région des cellules, appelée *région d'intérêt* et pas sur le fond sur lequel sont observés les tissus végétaux. Les régions d'intérêt peuvent être déterminées manuellement lorsque le nombre d'images n'est pas trop important. Des procédures automatiques doivent être développées pour les grandes collections d'images.

2. Résultats

Dans cet article, l'intérêt de la méthode est montré pour l'analyse de différents tissus végétaux constitués principalement de cellules de parenchyme pour lesquelles les parois sont blanches et l'intérieur de la cellule noir. Les **figures 3 à 5** montrent des exemples d'images de pomme, de tige de maïs et de tomate, acquises à l'aide du système de macrovision BlueBox. Pour chacune des images, le nombre de cellules observées est important et la structure cellulaire apparaît de manière très claire.

2.1 Choix de l'élément structurant

La **figure 3** illustre le choix de l'élément structurant. Les cellules sont orientées et allongées horizontalement. Les cellules sont presque toutes fermées en utilisant un élément carré alors que très peu d'entre elles sont fermées en utilisant l'élément linéaire horizontal de même taille. En pratique, les éléments structurants carrés permettent d'analyser la plus petite

dimension. En fonction de l'information recherchée et du contrôle de l'orientation des objets dans l'image, on choisira un élément carré ou linéaire.

2.2 Tiges de maïs

La **figure 4** montre une image mosaïque de tige de maïs reconstruite à partir de 9 images de régions adjacentes pour des coupes d'épaisseur 150 μm . La tige est constituée de deux tissus : les faisceaux conducteurs de sève apparaissant comme des taches blanches de grande taille et les cellules de parenchymes situées entre les faisceaux.

La granulométrie par fermeture en niveaux de gris a été appliquée pour déterminer la taille des cellules de parenchymes. Les cellules étant de forme isotrope, des éléments structurants carrés ont été utilisés. La taille maximum d'analyse a été fixée à 250 μm en explorant les diamètres de cellules à l'aide d'outils interactifs sous ImageJ (rsbweb.nih.gov/ij). Elle correspond à une fermeture de taille 35.

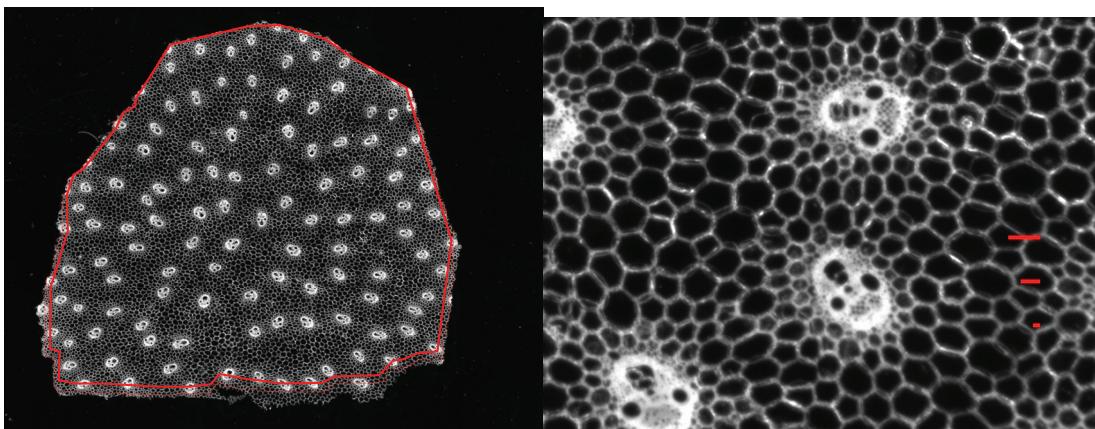


Figure 4 : image mosaïque de tige de maïs (champs de vue : 15,9 mm x 12,4 mm - Résolution 3,62 μm)
Zoom sur une région de 2,3 x 1,7 mm avec des lignes de longueur 25, 75 et 125 μm .

L'analyse granulométrique a été appliquée sur la région d'intérêt dont le contour est tracé sur la **figure 4**. La courbe granulométrique est tracée en fonction de la taille du côté des carrés exprimée en μm (**figure 5**). Les variations de niveaux de gris ont été observées principalement pour des tailles variant entre 25 et 125 μm avec un maximum à 75 μm . Les lignes de dimension 25, 75 et 125 μm tracées dans l'image de la **figure 4** montrent la cohérence des valeurs trouvées et des tailles observées pour les cellules.

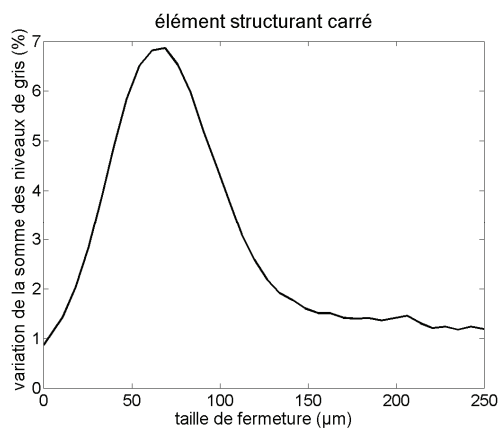


Figure 5 : Tige de maïs. Courbe granulométrique par fermeture à l'aide d'éléments structurants carrés

2.3 Péricarpe de tomate

La **figure 6** montre deux exemples d'images de péricarpe de tomate obtenues à partir de coupes d'épaisseur de 250 μm . L'épiderme est situé en haut de l'image et on observe des faisceaux vasculaires au centre du péricarpe. Les cellules sont de taille et de forme variable en fonction de la position : petites et rondes près de l'épiderme et plus allongées dans la deuxième moitié du péricarpe.

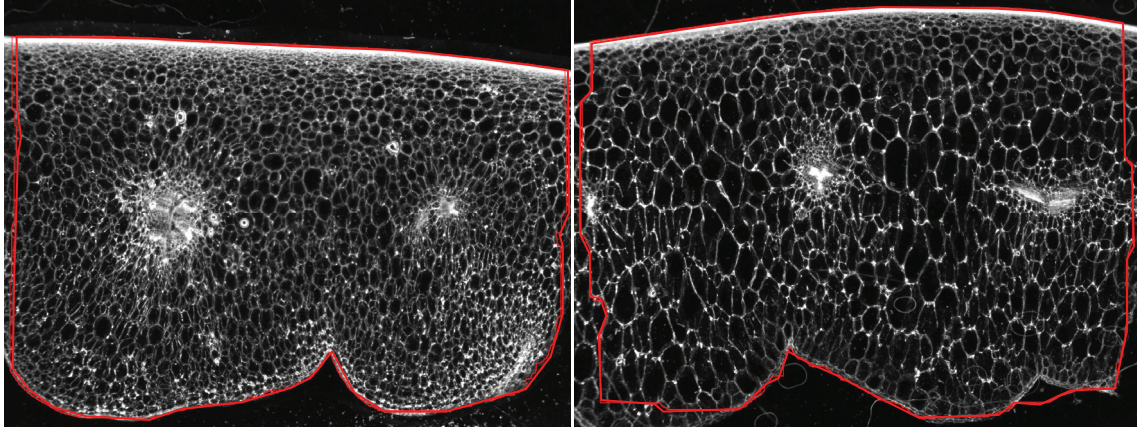


Figure 6 : exemples d'images de péricarpe de tomate et leur région d'intérêt.

L'allongement des cellules perpendiculairement à l'épiderme a été mis en évidence en utilisant des éléments structurant linéaires verticaux et horizontaux (**figure 7**). La taille maximum de fermeture a été fixée à 75, correspondant à une longueur de 1060 μm , de manière à analyser les cellules de tomate les plus longues.

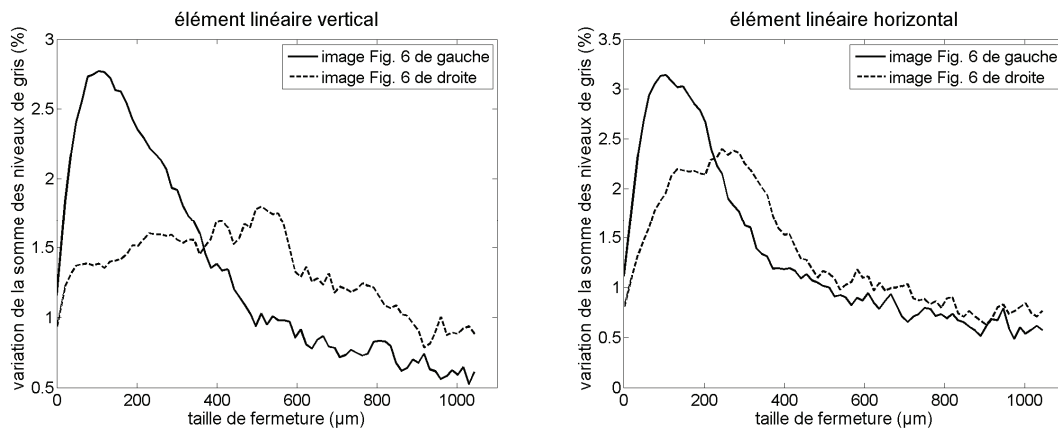


Figure 7 : Courbes granulométriques extraites pour les images de tomate de la figure 6. Gauche : élément linéaire vertical. Droite : élément linéaire horizontal.

Les différences de longueur de cellules perpendiculairement à l'épiderme sont mises en évidence en utilisant un élément linéaire vertical. Dans le cas de la première image, on observe les variations de niveaux de gris majoritairement pour des tailles inférieures à 400 μm alors que dans la deuxième image, on observe des variations jusqu'à 900 μm .

Cette analyse est rendue possible en contrôlant le positionnement de l'épiderme dans l'image lors de l'acquisition et en quantifiant l'allongement des cellules par analyse granulométrique.

Conclusion et perspectives

L'analyse granulométrique en niveaux de gris d'images de tissus végétaux acquises à l'échelle macroscopique permet d'extraire des informations sur la taille des cellules. L'analyse est dite globale par opposition aux approches quantifiant la taille et la forme de chaque cellule individualisée.

La fermeture étant comparable à un tamisage, les courbes granulométriques s'interprètent comme des distributions de taille. La mesure est basée sur des variations de niveaux de gris et dépend à la fois de la taille des cellules et du contraste entre parois et cellules. En ce sens, la méthode est classée parmi les méthodes d'analyse de texture d'images. Elle ne garantit pas *a priori* une relation de proportionnalité directe entre la variation de niveaux de gris et la quantité réelle de cellules d'une taille donnée. La mesure est proche d'une distribution de surface dans le cas où le contraste entre cellule et paroi est homogène dans les images.

L'intérêt majeur de la méthode est de pouvoir analyser et comparer des collections d'images de tissus végétaux sur la base de la taille des cellules. L'échelle macroscopique présente l'avantage d'observer des régions représentatives des tissus de manière rapide. L'analyse statistique peut être réalisée par analyse multidimensionnelle des courbes granulométriques (Chaïb *et al.*, 2007). Des calculs de *taille moyenne en niveaux de gris* à partir des courbes sont également envisageables.

Bibliographie

- Bharati M.H., Jay Liu J., MacGregor J.F. (2004) Image texture analysis: methods and comparisons. *Chemometr Intell Lab* 72: 57–71
- Chaïb J., Devaux M.-F., Grotte M.G., Robini K., Causse M., Lahaye M., Marty I. (2007) Genetic and physiologic relationship among physical, sensory, and morphological attributes of texture in tomato fruit. *J Exp Bot* 58: 1915-1925
- Cheniclet C., Rong W.Y., Causse M., Frangne N., Bolling L., Carde J.-P., Renaudin J.-P. (2005) Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth. *Plant Physiol* 139: 1984-1994
- Devaux M.-F., Bouchet B., Legland D., Guillon F., Lahaye M. (2008) Macro-vision and grey level granulometry for quantification of tomato pericarp structure. *Postharvest Biol Technol* 47: 199-209
- Harada T., Kurahashi W., Yanai M., Wakasa Y., Satoh T. (2005) Involvement of cell proliferation and cell enlargement in increasing the fruit size of *Malus* species, *Sci Hort* Amsterdam 105: 447-456
- Haralick R.M. (1979) Statistical and structural approaches to texture, *Proceedings IEEE* 67: 786-804
- Papineau P., Sire A., Devaux M.-F., Bansard S. (2008) Système de prise d'image macroscopique. Journées de la mesure et de la métrologie, Biarritz, 6-9 octobre 2008
- Serra J. (1982) *Image Analysis and Mathematical Morphology*, London: Academic Press.
- Soille P. (2003) *Morphological Image Analysis: Principles and Applications*. Berlin: Springer-Verlag

Méthode de suivi de la taille de particules de caillé dans le lactosérum pendant le processus de fabrication fromagère

Hervé Guillemain¹, Thomas Cattenoz¹, Bruno Perret¹

Résumé : *Nous proposons une nouvelle méthode pour estimer la proportion volumique des grains de caillé dans le lactosérum et leur répartition par taille en fonction du temps pendant la synérèse lors du brassage en cuve de fromagerie. Elle repose sur la mise au point d'un dispositif de prise d'images original associé à un traitement spécifique des images.*

Mots clés : mesure en ligne, analyse d'image, taille de particule, caillé, égouttage en cuve.

Introduction

Dans le cadre de ses travaux dans le domaine des capteurs et de la mesure en ligne pour l'automatisation de la fabrication fromagère, l'unité de génie et microbiologie des procédés alimentaires de Thiverval Grignon a travaillé sur la coagulation et le raffermissement des caillés, le présent document présente une méthode de suivi de la synérèse. La synérèse est une étape importante de la fabrication fromagère. Le lait passe tout d'abord d'un état liquide à un état de gel appelé coagulum puis la synérèse démarre et transforme le coagulum en caillé. Le réseau protéique constituant le gel se contracte et expulse une fraction liquide, le lactosérum. La quantité de lactosérum rejeté et sa dynamique (vitesse de la synérèse) ont une influence sur le développement microbien lors de l'affinage.

La synérèse peut affecter fortement la qualité finale du fromage. De nombreuses variables, liées au processus fromager, influencent la synérèse et plus globalement l'égouttage il s'agit essentiellement de la taille des particules de caillé, de la température et de la pression qui sera appliquée au moulage (Johnston *et al.*, 1998 ; Whitehead et Harkness, 1954). La mesure de la taille des grains améliorerait le processus de fabrication fromagère. Guillemain *et al.*, (2006), s'appuyant sur le brevet de Perret *et al.*, (2002), ont développé un système de mesure en temps réel de cette taille basé sur une mesure optique et une mesure de contrainte. Cette dernière permet de tenir compte de l'agitation. Ce système simple et facile à mettre en œuvre s'est révélé insuffisant pour une application industrielle malgré l'utilisation de traitements avancés du signal optique : une seule mesure en un point ne donne pas la précision voulue. Une autre méthode a été développée, dans le même esprit de mesure en temps réel, mais en deux dimensions en utilisant une caméra ou un appareil photographique numérique, elle nécessite une bonne prise de vue et des traitements avancés des images obtenues. Le suivi de la taille des grains de caillé au cours du temps devrait permettre de stopper la synérèse à un instant opportun pour la qualité finale du fromage. Nous proposons une méthode de mesure sur des échantillons synthétiques pour valider le système et l'analyse des images.

¹ UMR782 GMPA - Génie et microbiologie des procédés alimentaires - INRA- AgroParisTech -
F-78850 Thiverval-Grignon ☎ 01 30 81 54 93 ✉ Herve.Guillemain@grignon.inra.fr,
Thomas.Cattenoz@grignon.inra.fr, Bruno.Perret@grignon.inra.fr

1. Matériels et méthodes

1.1 Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental (**figure 1**) comporte une cuve transparente, un spot pour l'éclairage (40W, couleur jaune) et un appareil photo numérique (CANON EOS350D, Auchan) pour la prise de vue. Le spot produit une lumière permettant de contraster les grains blancs dans le lactosérum (fond opaque jaunâtre). Dans le dispositif, les grains sont préalablement calibrés à des tailles connues. Ils ont été fabriqués lors d'une précédente coagulation, triés à l'aide de tamis de 1, 2, 3 et 4 mm, puis stabilisés par du formol avant d'être stockés. Même s'ils sont tamisés, ces grains ne sont pas pour autant tous de forme identique. Le contenu de la cuve est agité à l'aide d'un barreau magnétique pour simuler le mouvement des grains dans les cuves industrielles.

Nous effectuons plusieurs mélanges lactosérum/grains pour disposer de différentes concentrations voisines des conditions fromagères (20 %, 30 %, 40 %).

Les préparations ne contiennent que de grains de taille unique (1 à 2, 2 à 3 et 3 à 4mm).

Cuve transparente (L7xH6xI14cm)

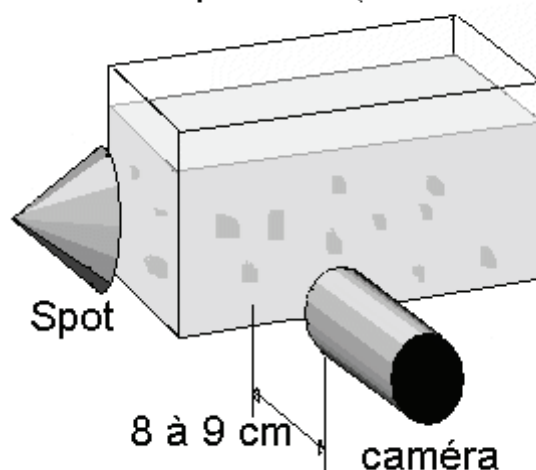


Figure 1 : *Dispositif expérimental utilisé pour traiter l'image acquise*

1.2 Prises de vues

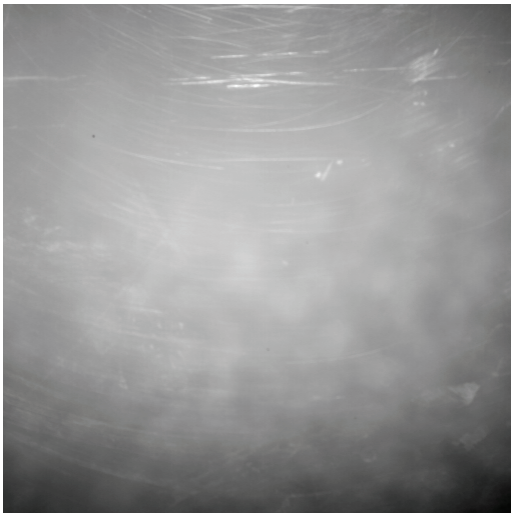
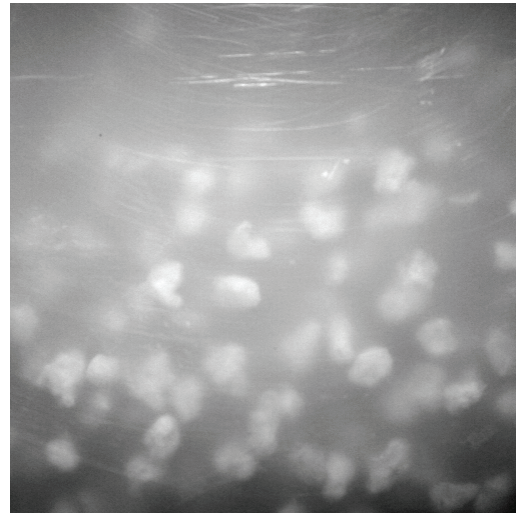
Pour un même échantillon, les images sont prises pendant l'agitation des grains à intervalle régulier de 10s (réglage manuel : temps de pause 1/200s, ouverture 5,6), pendant 3 minutes seulement pour éviter la dégradation des grains. Au total 19 images sont donc acquises pour un même échantillon. La largeur des images est de 3 456 pixels et la hauteur de 2 304 pixels. Les images d'origine sont en couleur codée sur 24 bits. Seule une région de 512 × 512 pixels est extraite de chaque image puis convertie en image monochrome dont les niveaux de gris sont codés sur 8 bits.

Le champ de vue dans les images d'origine est d'environ 8 cm de haut × 12cm de large et celui de la région 512 × 512 de 1,8 cm × 1,8 cm.

1.3 Algorithme de traitement

Nous avons réalisé les traitements à l'aide du logiciel **DefNouv** développé en C++ au laboratoire. Les bibliothèques de fonctions spécifiques (ligne de partage des eaux, ...) ont été réalisées par nos soins dans l'optique de créer un code portable occupant un minimum d'espace mémoire destiné à l'origine à être embarqué dans une caméra intelligente. Les traitements comportent six étapes décrites ci-dessous et illustrées sur une image de départ correspondant à des grains de taille de 2 à 3 mm représentant 20 % du mélange grains/lactosérum.

Image initiale (exemple)
Grains de 2 à 3 mm, mélange à 20 % de grains



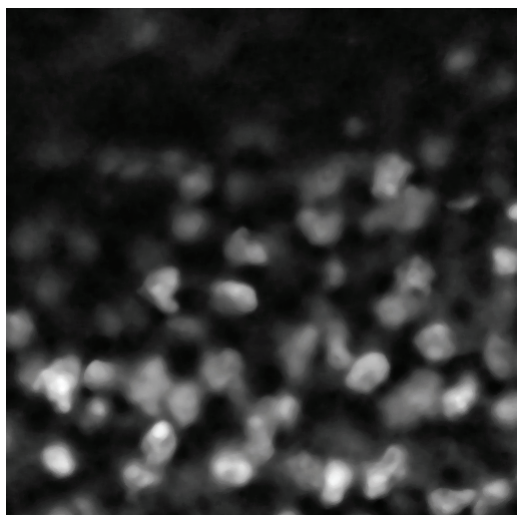
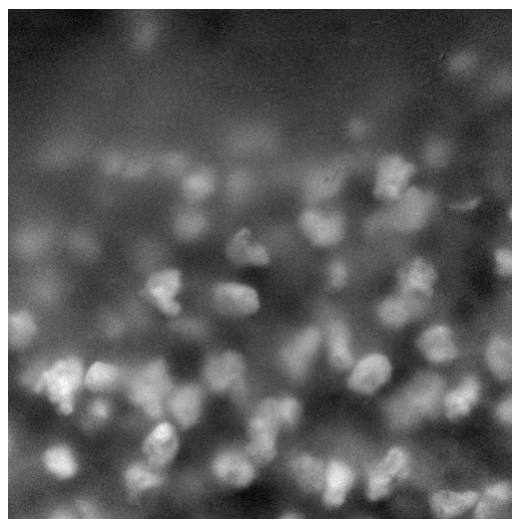
1^{ère} étape

Estimation d'une image des défauts (rayures sur la paroi de la cuve et fond non uniforme dû à la diffusion de la lumière dans le milieu opaque) en 2 étapes. La 1^{ère} étape est nécessaire pour corriger les défauts de stabilité de notre dispositif de prise de vue.

- Recadrage spatial de chaque image par rapport à la première image lue en déterminant le maximum de l'inter-corrélation avec la première image sur une zone contenant au moins un défaut convenablement orienté spatialement.
- Calcul de l'image moyenne de la série des 19 images recadrées. Le calcul d'une image sans grain est rendu possible par le mouvement aléatoire des grains. Un simple blanc réalisé à partir de lactosérum sans grain n'a pas été réalisé pour rester au plus proche des conditions opératoires réelles.

2^{ème} étape

Uniformisation du fond et atténuation des défauts pour chaque image en lui retranchant une combinaison linéaire de l'image moyenne sur toute la série (image obtenue à l'étape 1). Les coefficients optimaux sont obtenus par minimisation de l'*erreur quadratique moyenne* entre l'image traitée et la combinaison linéaire de l'image moyenne : $Im_corr. = Im_dép. - (a Im_moy. + b)$. a et b sont obtenus analytiquement en annulant le gradient de l'erreur quadratique. Une formule littérale permet donc d'obtenir directement les valeurs de a et b, sans recourir à un quelconque algorithme (cf. **annexe**).



3^{ème} étape

Application d'un filtre médian de taille 8 pour atténuer le bruit tout en préservant les contours.

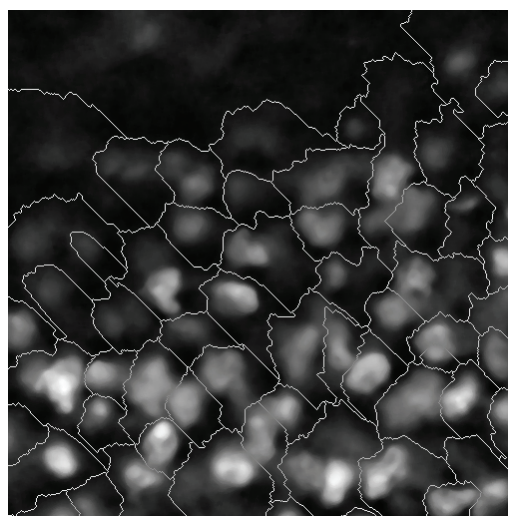
Uniformisation de l'histogramme des niveaux de gris par la méthode d'égalisation d'histogramme pour améliorer le confort visuel.

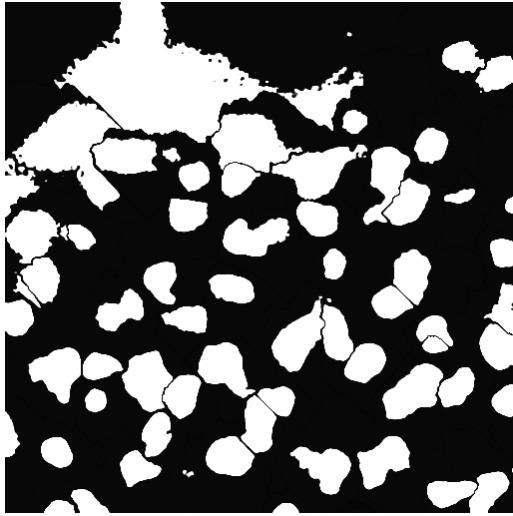
4^{ème} étape

Segmentation des images (après inversion) à l'aide de l'algorithme de ligne de partage des eaux (LPE) en négligeant tous les minima locaux dont la hauteur est strictement inférieure à un seuil de 20 sur l'échelle des 256 niveaux.

L'image obtenue est une image binaire où les frontières sont représentées par des 1 et les régions par des 0. L'image représentée est le résultat d'un opérateur 'OU' logique entre l'image de départ et l'image segmentée.

Chaque région est supposée contenir 1 grain.



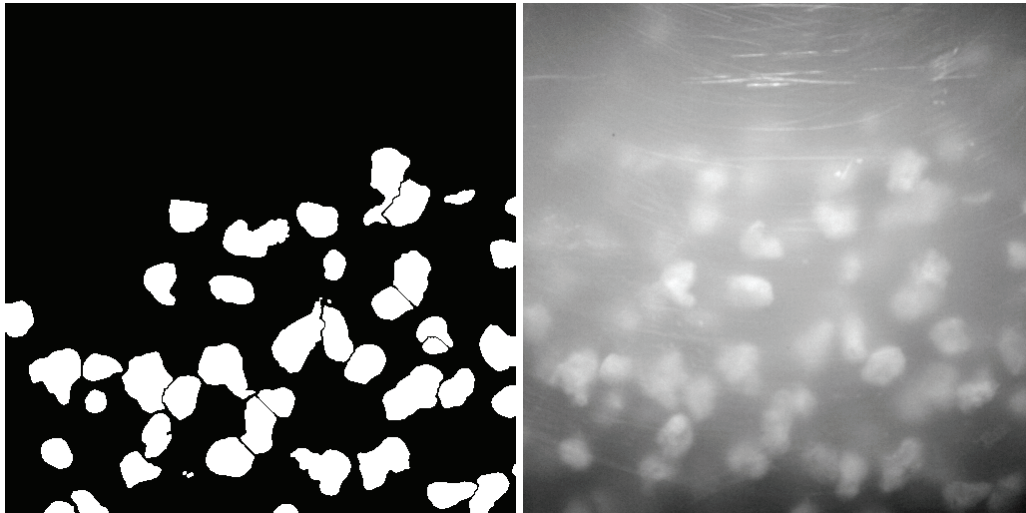


5^{ème} étape

Détermination d'une 1^{ère} approximation de la taille de chaque grain par seuillage adaptatif région par région. L'algorithme utilisé est un algorithme de relaxation probabiliste (Hummel R.A. and Zucker S.W., 1983 ; Kittler J. and Illingworth J., 1986).

La taille des grains est estimée en calculant le diamètre équivalent, et la proportion par le pourcentage de surface.

6^{ème} et dernière étape



Suppression des grains trop peu contrastés. La netteté des grains est estimée par la moyenne de la norme du gradient au niveau des contours de chaque grain trouvé. Les grains trop peu contrastés sont éliminés par comparaison du gradient avec un seuil fixé à 15. Pour comparaison, l'image initiale est placée à proximité de l'image traitée.

Figures 2 : description des 6 étapes de l'algorithme utilisé

À l'heure actuelle, tous les paramètres de réglage, à chacune des 6 étapes, sont choisis heuristiquement de façon à réaliser un bon compromis entre résultats obtenus et temps de calcul. À l'étape 1 par exemple, plus la taille de la fenêtre utilisée dans le calcul est grande, meilleur est le recalage (car les détails sont plus nombreux) mais dans ce cas, le temps de calcul est élevé. Le paramètre le plus délicat à déterminer pour arriver à cette qualité de résultat est probablement le seuil de l'algorithme LPE à l'étape 4.

2. Résultats

Nous présentons sur les **figures 3** des exemples de résultats obtenus pour les 3 tailles de grains.

Les résultats traités en termes de proportions de grains par rapport au caillé (en %) et de taille de grains (en mm) sont reportés dans la **figure 4**.

Nous avons testé deux proportions (20 et 40 % de grains dans la partie liquide) avec à chaque fois 3 tailles de grains (1 et 2 mm, 2 et 3 mm, 3 et 4 mm).

Les pourcentages de grains calculés ont tendance à être sous-estimés de 11 % pour le mélange à 40 % (quelle que soit la taille des grains). Pour le mélange à 20 %, l'erreur sur la proportion est de 4 % sauf avec les tailles 3 et 4 mm où elle est de 8,3 % (soit une erreur relative importante de 40 %).

Au niveau des tailles, les histogrammes présentés dans les figures 4 montrent une dispersion assez grande mais la moyenne correspond bien aux tailles cibles. Les histogrammes sont d'autant plus étalés que la taille standard des grains est élevée.

Du fait de l'anisotropie des grains de caillé, la solution proposée ici apporte une véritable amélioration par rapport à l'article publié en 2006 (Guillemin *et al.*), car elle donne une dimension supplémentaire et donc une estimation plus précise du volume des grains.

On pourrait poursuivre dans cette voie en imaginant une prise de vue stéréoscopique de la scène à l'aide de 2 caméras juxtaposées afin accéder enfin à la 3^{ème} dimension et par conséquent, au volume réel de chaque grain.

La solution proposée révélera tout son intérêt pour les fromagers quand une solution plus compacte sera mise en œuvre : de petites caméras embarquant toute la puissance de calcul nécessaire au traitement des images existent déjà. Au niveau industriel, il faut savoir que positionner la caméra pour avoir une bonne prise de vue ne sera pas toujours facile.

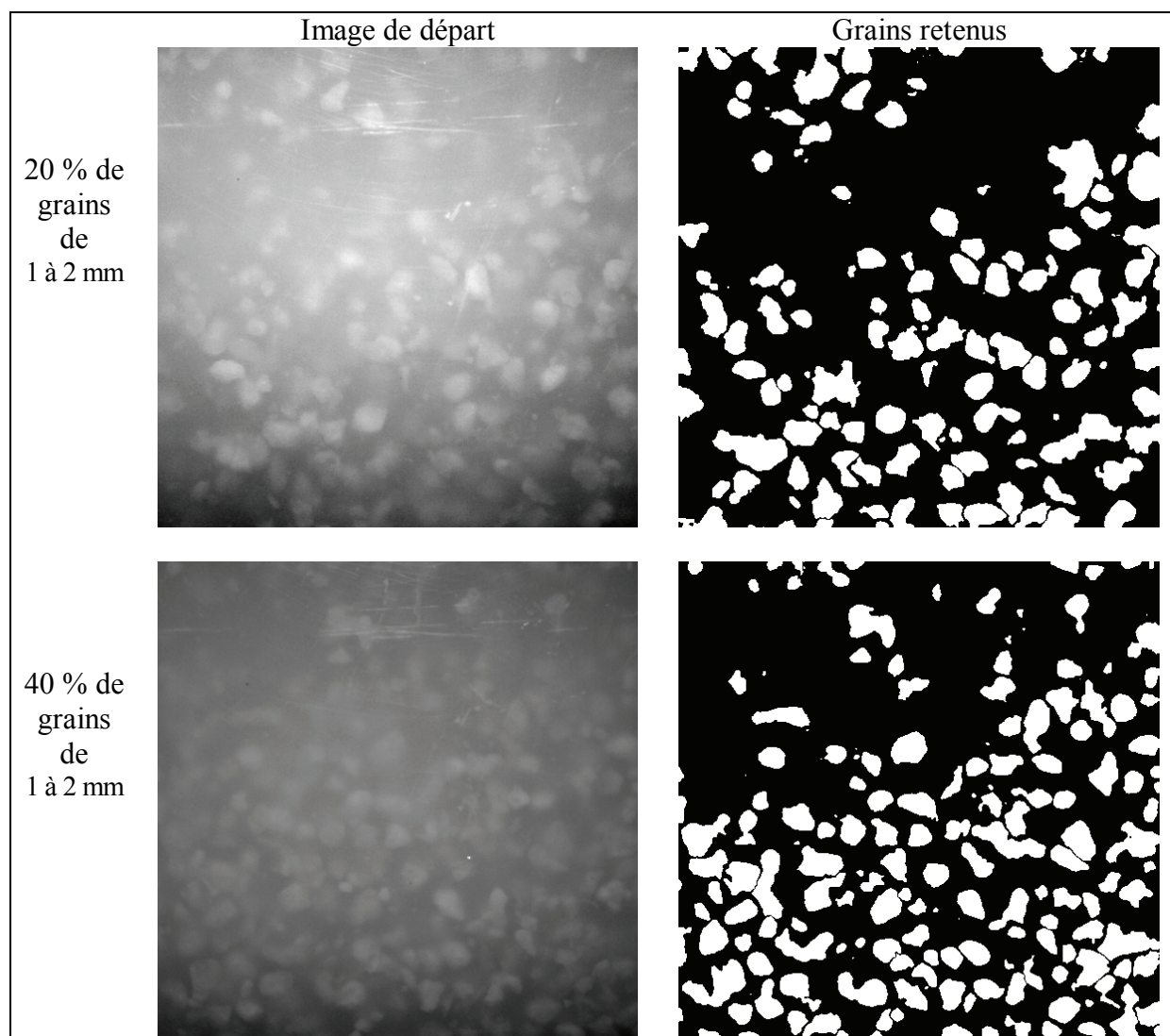


Figure 3a : *exemples d'images traitées et d'origine pour des tailles de grains de 1 à 2 mm*

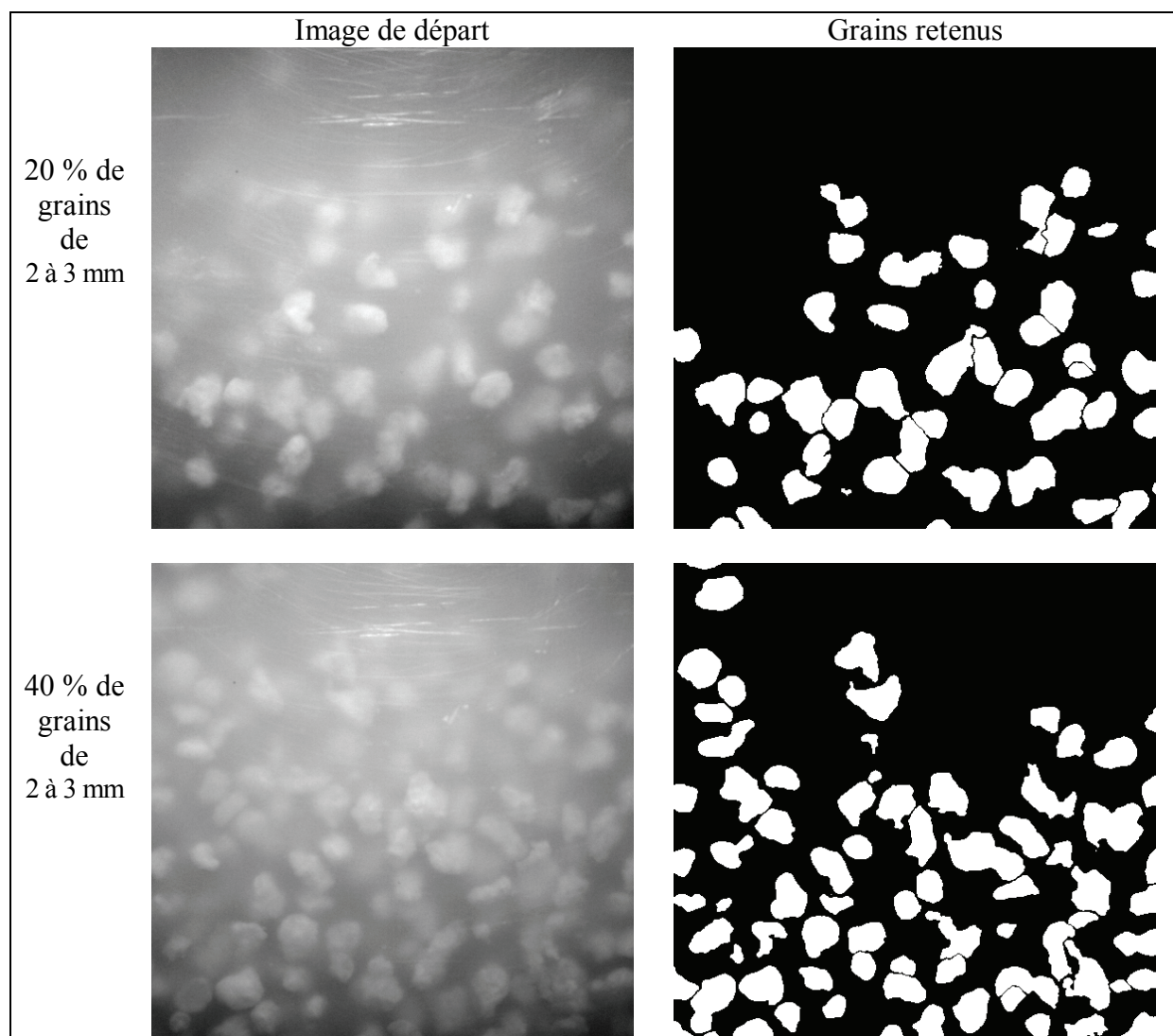


Figure 3b : exemples d'images traitées et d'origine pour des tailles de grains de 2 à 3 mm

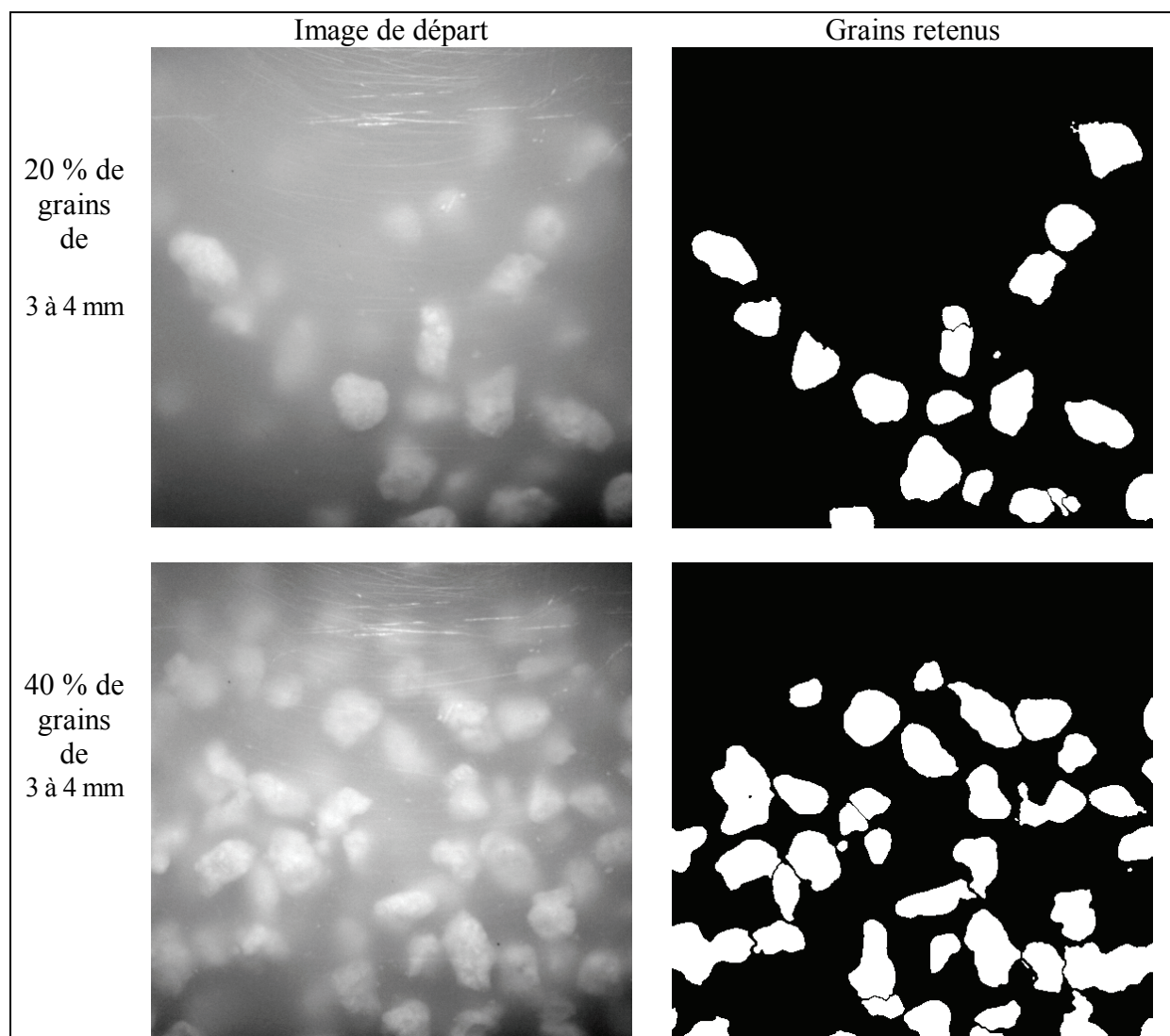


Figure 3c : *exemples d'images traitées et d'origine pour des tailles de grains de 3 à 4 mm*

	Proportion de grains par rapport au lactosérum (%)		Taille des grains (mm)	
	Attendue	Mesurée	Attendue / Moyenne calculée	Mesurée (diamètre équivalent)
grains de 1 à 2mm	20	24,0	1 à 2 / 1,96	
	40	28,2	1 à 2 / 1,69	
grains de 2 à 3mm	20	16,8	2 à 3 / 2,41	

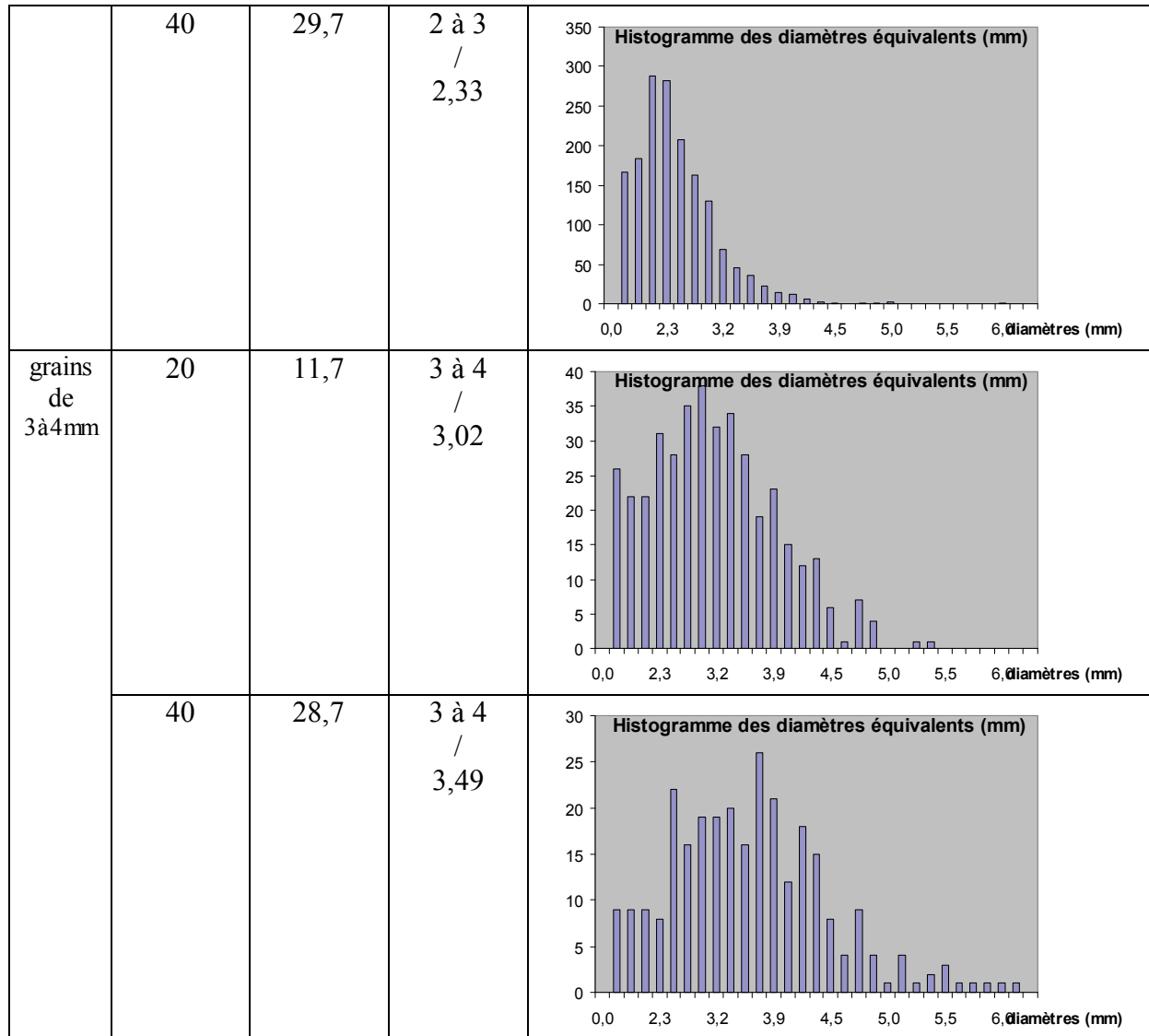


Figure 4 : résultats obtenus à 20 et 40 % de grains pour les tailles (1 à 2 mm ; 2 à 3 mm et 3 à 4 mm)

Conclusion

Les résultats obtenus peuvent paraître insuffisants dans une optique de suivi et surtout de contrôle de procédé : les écarts observés entre les proportions de grains mesurées et attendues sont parfois grands (de 3 à 12 %). En effet on ne s'attend pas à trouver, dans les résultats de la classification pour une classe donnée, des grains des autres classes. À la lecture des résultats visuels obtenus, l'algorithme utilisé, s'il peut être amélioré, n'est pourtant pas la principale cause de cette contre performance. Celle-ci s'explique par les deux faits suivants :

- il est difficile de sélectionner des grains de taille strictement comprise entre deux valeurs (du fait de l'hétérogénéité de forme des grains et aussi parce que des grains se désagrègent lorsqu'ils sont brassés) dans une proportion précise (car les grains classifiés sont humides lorsque les mélanges sont préparés) ;

- le mécanisme utilisé pour brasser le mélange est à améliorer (si possible) car dans aucune des images les grains ne sont uniformément répartis.

Les prises de vue sont à améliorer, elles ne reflètent peut être pas suffisamment le contenu de la cuve. On voit bien sur les **figures 3** que l'algorithme détecte correctement les objets qui se trouvent sur l'image d'origine. Il semble que ce qui est observé visuellement ne reflète pas correctement la globalité du phénomène, on sous estime vraisemblablement la quantité de grains, ceux ci restent en profondeur, ce que confirment les résultats.

Par ailleurs, de par sa conception, l'algorithme ainsi développé sera facile à mettre en œuvre en temps réel dans un logiciel d'acquisition.

Bibliographie

- Guillemin H., Trelea I.C., Picque D., Perret B., Cattenoz T., Corrieu G. (2006) An optical method to monitor casein particle size distribution in whey, *Lait* 86, 359–372
- Hummel R.A. and Zucker S.W. (1983) "On the foundations of relaxation labeling processes," *IEEE Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 5, (3), 267-287
- Johnston K. A. J. Luckman M. S, Lilley H. G. and Smale B. M. (1998) Effect of Various Cutting and Stirring Conditions on Curd Particle Size and Losses of Fat to the Whey during Cheddar Cheese Manufacture in Ost Vats, [International Dairy Journal](#) 8, 281-288
- Kittler J. and Illingworth J. (1986) Relaxation labelling algorithms-a review, *Image and Vision Computing*, .Nov.3, (4), 206-216
- Perret B., Picque D., Cattenoz T., Corrieu G. (2002) Procédé de contrôle de l'égouttage des grains de caillé et dispositif pour sa mise en oeuvre, French Patent n° FR2822953
- Whitehead H.R. and Harkness L. (1954) The influence of variations in cheese-making procedure on the expulsion of moisture from cheddar cheese curd, *Aust. J. Dairy Technol.* 9, 103–107

Annexe

Soient :

x l'image en cours de traitement.

Moy l'image moyenne.

N la taille des images (supposées carrées).

i, j les indices des lignes, respectivement des colonnes dans les images ($x[i][j]$ représente par exemple le niveau gris dans l'image x au pixel de coordonnées (i, j)).

On cherche à minimiser l'erreur quadratique moyenne suivante :

$$\xi = \sum_i \sum_j (x[i][j] - (a \cdot \text{moy}[i][j] + b))^2$$

(la double somme porte sur tous les pixels de l'image)

Les paramètres a et b qui minimisent ξ sont ceux pour lequel le gradient $\text{grad}_{a,b}(\xi) = \underline{0}$, autrement dit ceux qui annulent les dérivées partielles de ξ :

$$\begin{aligned} 0 &= \partial \xi / \partial a \\ &= -2 \sum_i \sum_j \text{moy}[i][j] (x[i][j] - a \cdot \text{moy}[i][j] - b) \\ &= -2 (\sum_i \sum_j \text{moy}[i][j] \cdot x[i][j] - a \cdot \sum_i \sum_j \text{moy}^2[i][j] - b \sum_i \sum_j \text{moy}[i][j]) \\ 0 &= \partial \xi / \partial b \\ &= -2 \sum_i \sum_j (x[i][j] - a \cdot \text{moy}[i][j] - b) \\ &= 2 (\sum_i \sum_j x[i][j] - a \cdot \sum_i \sum_j \text{moy}[i][j] - bN^2) \end{aligned}$$

Notons :

$$\begin{aligned} \sigma_1 &= \sum_i \sum_j x[i][j] \\ \sigma_2 &= \sum_i \sum_j \text{moy}[i][j] \\ \sigma_{22} &= \sum_i \sum_j \text{moy}^2[i][j] \\ \sigma_{12} &= \sum_i \sum_j (x[i][j] \cdot \text{moy}[i][j]) \end{aligned}$$

$\sigma_1, \sigma_2, \sigma_{22}$ et σ_{12} sont des constantes.

Nous obtenons un système de 2 équations à 2 inconnues :

$$\begin{aligned} 0 &= \sigma_{12} - a \cdot \sigma_{22} - b \cdot \sigma_2 \\ 0 &= \sigma_1 - a \cdot \sigma_2 - b \cdot N^2 \end{aligned}$$

Soit :

$$\begin{aligned} a &= (\sigma_{12} - \sigma_1 \cdot \sigma_2 / N^2) / (\sigma_{22} - \sigma_2^2 / N^2) \\ b &= (\sigma_1 - a \cdot \sigma_2) / N^2 \end{aligned}$$

Recalage d'images multimodales

Approche méthodologique et application aux images de muscles bovins acquises par auto fluorescence et par résonance magnétique nucléaire

Frédéric Peyrin¹, Jean-Marie Bonny¹

Résumé : *Un banc d'imagerie dans l'ultraviolet et le visible a été développé pour séparer, à l'échelle macroscopique, les différentes composantes structurales du muscle. Les images obtenues avec ce banc doivent être comparées à celles acquises avec la méthode de référence, l'imagerie par résonance magnétique nucléaire. Les images issues de ces deux modalités ne sont pas superposables directement en raison de leur format d'acquisition et des déformations spatiales inhérentes aux biais instrumentaux. Nous avons donc développé une approche méthodologique pour mettre en correspondance les images obtenues par auto fluorescence par rapport à celles obtenues par résonance magnétique nucléaire.*

Mots clés : viande, IRM, auto fluorescence, image, recalage, multi-modalité, MATLAB.

Introduction

La tendreté de la viande est une qualité sensorielle importante pour le consommateur. Elle est dépendante en partie de la teneur des principaux constituants que sont les fibres musculaires, les tissus lipidiques et le tissu conjonctif composé principalement de collagène. Il existe une grande variabilité du taux de collagène présent dans la viande selon différents facteurs comme le type de muscle, l'espèce, la race ou l'âge de l'animal. L'objectif de la filière de transformation de produits carnés est de trier et d'orienter automatiquement les muscles vers une destination de viande à griller pour les plus pauvres en collagène ou vers des procédés technologiques pour les plus riches en collagène.

Les études menées au laboratoire (Abouelkaram *et al.*, 2006) ont permis de caractériser les propriétés physiques et sensorielles des composants de la viande, d'évaluer leur quantité relative et leur distribution spatiale grâce à un système d'imagerie multi-spectrale. Pour cette occasion, un banc utilisant la propriété d'auto-fluorescence des différents constituants du muscle bovin *biceps femoris* a été développé : il optimise les images des échantillons selon leur signature spectrale spécifique dans l'ultraviolet et le visible. Notre projet est de comparer ce banc à la technique de référence qu'est l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM).

Cependant, pour comparer ces images entre elles, un des points essentiels concerne leur prétraitement par fusion. En effet, la fusion d'images en multi-modalité (Jégou *et al.*, 2004) est indispensable pour mettre en correspondance spatialement les images acquises par les techniques différentes que sont l'imagerie en auto-fluorescence et l'IRM.

La mise en correspondance d'image est le processus d'alignement de deux ou de plusieurs images de la même scène par transformation géométrique afin de comparer ou de combiner leurs informations respectives (Jégou et Bonmartin, 2004). Cette technique est généralement

¹ UR370 Qualité des Produits Animaux - INRA - F-63122 Saint Genès Champanelle

☎ 04 73 62 42 59

✉ peyrin@clermont.inra.fr

utilisée comme une étape préliminaire avant d'autres applications de traitement d'image. Suite à cette mise en correspondance, nous pourrions comparer les détails dans les images pour voir si tel composant de la viande est identifiable à la fois dans les deux modalités.

Dans la suite de l'article, nous présentons successivement la nature des images à mettre en correspondance, la méthode de recalage choisie pour ces images, la méthode de calcul des paramètres, et enfin les résultats obtenus.

1. Acquisition des images

Les images en fluorescence acquises avec une caméra numérique SONY XCD-SX900UV ont une résolution de 8 bits en niveaux de gris et une taille de 1280 x 960 pixels. Les images RMN acquises avec le système BRUKER² de l'équipe STIM³ ont une meilleure résolution en niveaux de gris (16 bits) et une plus faible résolution spatiale (320 x 320 pixels). Pour chacune des deux modalités, trois contrastes sont enregistrés.

Les images en fluorescence de muscles bovins mettent en évidence le gras (**figure 1a**), le collagène (**figure 1b**) et l'ensemble des tissus (**figure 1c**) grâce à la sélection des couples de longueur d'onde d'excitation et d'émission correspondants à l'auto-fluorescence de ces composés (respectivement 320-405 nm, 380-440 nm et sans filtres).

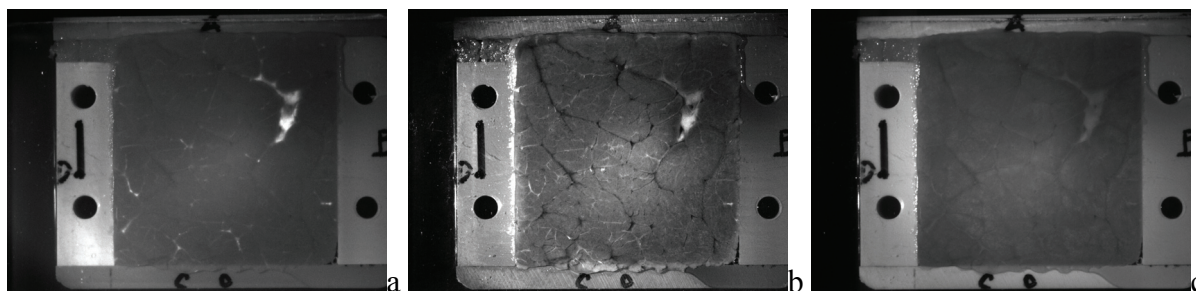


Figure 1 : image de l'échantillon 5ST1 (semitendinosus de l'animal 5) en auto-fluorescence mettant en évidence (a) le gras ;(b) le collagène ;(c) l'ensemble des tissus.

Les images RMN des mêmes muscles bovins mettent en évidence le gras uniquement (**figure 2a**), le réseau conjonctif constitué de gras et de collagène (**figure 2b**) et l'eau exsudée entre les faisceaux de fibres musculaires (**figure 2c**). Ces images ont été obtenues à l'aide de différentes méthodes d'acquisition (ou séquences) qui produisent un contraste particulier.

Pour chacun des échantillons étudiés, ces 6 possibilités correspondent à l'acquisition d'autant d'images qui seront ultérieurement traitées pour servir à la construction d'une combinaison linéaire optimale permettant de maximiser le contraste entre les différents tissus d'intérêt.

² BIOSPEC 4.7T + console AVANCE 200 + gradient d'imagerie BGA-12 + sonde volumétrique « birdcage »

³ Structures Tissulaires et Interactions Moléculaires

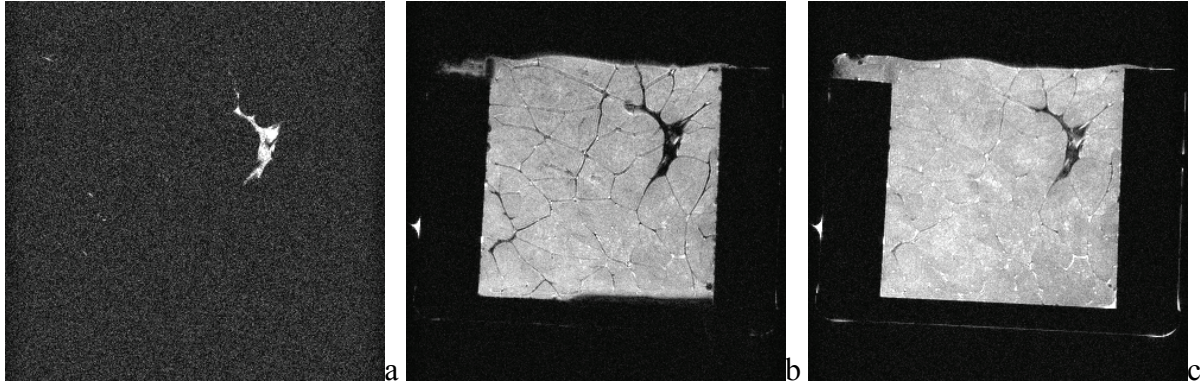


Figure 2 : images RMN de l'échantillon 5ST1 mettant en évidence différentes composantes musculaires :
 (a) le gras intramusculaire à l'aide d'une séquence annulant le signal de l'eau ;
 (b) le réseau conjonctif à l'aide d'une séquence sensible aux variations locales de champ magnétique ;
 (c) l'eau exsudée entre les faisceaux de fibres (pixels clairs) à l'aide d'une séquence sensible aux différences de mobilité des protons.

2. Méthode de recalage d'images utilisée

Une image appelée l'image de base ou de référence est considérée comme la référence à laquelle seront comparées toutes les autres images appelées images d'entrée. L'objectif de la mise en correspondance d'image est d'aligner l'image d'entrée avec l'image de base en appliquant une transformation spatiale à l'image d'entrée. Deux étapes critiques interviennent dans la qualité du résultat :

- le choix de la transformation géométrique,
- la mesure de l'alignement des images.

2.1 Choix des modèles de transformation

Pour notre application, les images acquises selon les deux modalités sont enregistrées grâce à des systèmes instrumentaux de principes très différents dont les biais, les formats de sauvegarde et les résolutions spatiales et spectrales sont très différents. Les différences entre l'image d'entrée et l'image de sortie peuvent être dues à un effet du relief ou à d'autres changements de perspective quand l'image de la même scène est prise depuis différents points de vue. Les distorsions des lentilles des objectifs et des autres capteurs ou les différences entre plusieurs types de capteurs peuvent aussi causer une distorsion (**figure 3**).

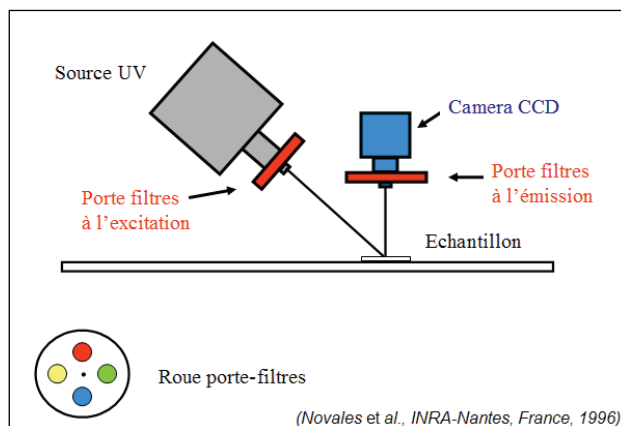


Figure 3 : principe de l'imagerie multi spectrale par fluorescence (Novaes et al., 1996).

Le type de recalage est dit monomodal si deux images de la même modalité, mais de contraste différent, sont recalées ensemble. Lorsque deux images de modalités différentes sont recalées, il s'agit alors de recalage de type multimodal. Nous avons appliqué différents modèles de déformation suivant les types rencontrés.

2.1.a Pas de transformation inter-contraste pour les images en auto-fluorescence

Pour les images en auto-fluorescence, le changement de couples de longueurs d'ondes entre l'acquisition de deux contrastes est réalisé par rotation des filtres dans un barillet. Du fait même du principe d'acquisition, il n'y a pas de déformations. Le recalage d'images entre les différents contrastes en auto-fluorescence n'est donc pas nécessaire.

2.1.b Transformation inter-contraste rigide pour les images RMN

Pour les images RMN, l'échantillon restant immobile entre l'acquisition de deux contrastes différents, il n'y a pas de déformations locales. Par contre, nous avons observé entre les différents contrastes RMN des déformations globales qui sont certainement liées aux réglages instrumentaux. Pour les recalés entre eux, nous avons donc appliqué à ces contrastes une transformation rigide de type « affine ». Nous avons ainsi corrigé les déformations induites par les différents modes d'acquisition par IRM.

2.1.c Transformation intermodale élastique pour les images RMN par rapport aux images en auto-fluorescence

Nous avons constaté que l'échantillon, même s'il est maintenu dans un portoir n'est plus exactement dans la même configuration après manipulation pour transfert entre le banc RMN et le banc d'imagerie par auto-fluorescence. Nous avons donc appliqué une transformation élastique basée sur l'algorithme dit de « moyenne pondérée localement » (LWM) pour passer d'une modalité à l'autre grâce à des déformations locales. Le sujet d'étude étant l'imagerie en auto fluorescence et les images RMN ayant une résolution spatiale inférieure, nous avons choisi de déformer la modalité RMN.

2.2 Mesure de similarité entre les images

Parmi les techniques de mesure de similarité entre deux images, on en distingue deux grandes catégories : celles qui utilisent des points de repère et celles qui exploitent l'image dans sa totalité (méthodes dites iconiques). Nous utilisons pour notre application la technique de recalage des images basée sur des points de contrôle choisis par l'utilisateur. Cette technique possède de nombreuses applications et permet de tirer partie de l'information complémentaire apportée par plusieurs images obtenues dans une même ou plusieurs modalités d'imagerie.

Une cartographie des emplacements caractéristiques visibles dans les deux images est obtenue par pointage de points de contrôle avec la souris. Dans notre application, nous utilisons des repères intrinsèques caractéristiques liés à la morphologie anatomique de la coupe de viande observée. La clé du procédé de mise en correspondance de l'image réside ensuite dans la détermination des paramètres de la transformation spatiale nécessaire pour aligner les images. La réalisation d'un recalage d'images utilisant une cartographie par points de contrôle nécessite de développer une méthode commune aux différents types de modèles présentés et dont nous décrivons les étapes. Cette méthode est commune aux différents modèles présentés.

3. Implémentation MATLAB

Dans le but d'une plus grande clarté, nous avons choisi de présenter la méthode de calcul pour une seule paire d'images. Nous avons choisi un contraste dans chacune des deux modalités

pour la coupe de muscle bovin de l'échantillon SST1 : pour l'image en auto fluorescence, le contraste correspond au collagène (**figure 1b**) et pour l'image image par IRM à mettre en correspondance, le contraste correspond au tissu conjonctif (**figure 2b**).

La boîte à outils « traitement d'images » (Image Processing Toolbox™) de MATLAB met à disposition un outil de pointage afin de déterminer les paramètres de la transformation requis et d'aligner une image par rapport à une autre. Cette boîte à outils propose un outil interactif, le « Control Point Selection Tool », utile pour sélectionner des paires de points de contrôle en correspondance dans deux images. Ces points de contrôle sont des repères, des détails particuliers, communs aux deux images. Une cartographie spatiale peut alors être déduite du maillage donné par la position de ces points de contrôle et le recalage devient possible par calcul de déformations globales ou locales.

La **figure 4** montre le principe de cette méthode de recalage d'images.

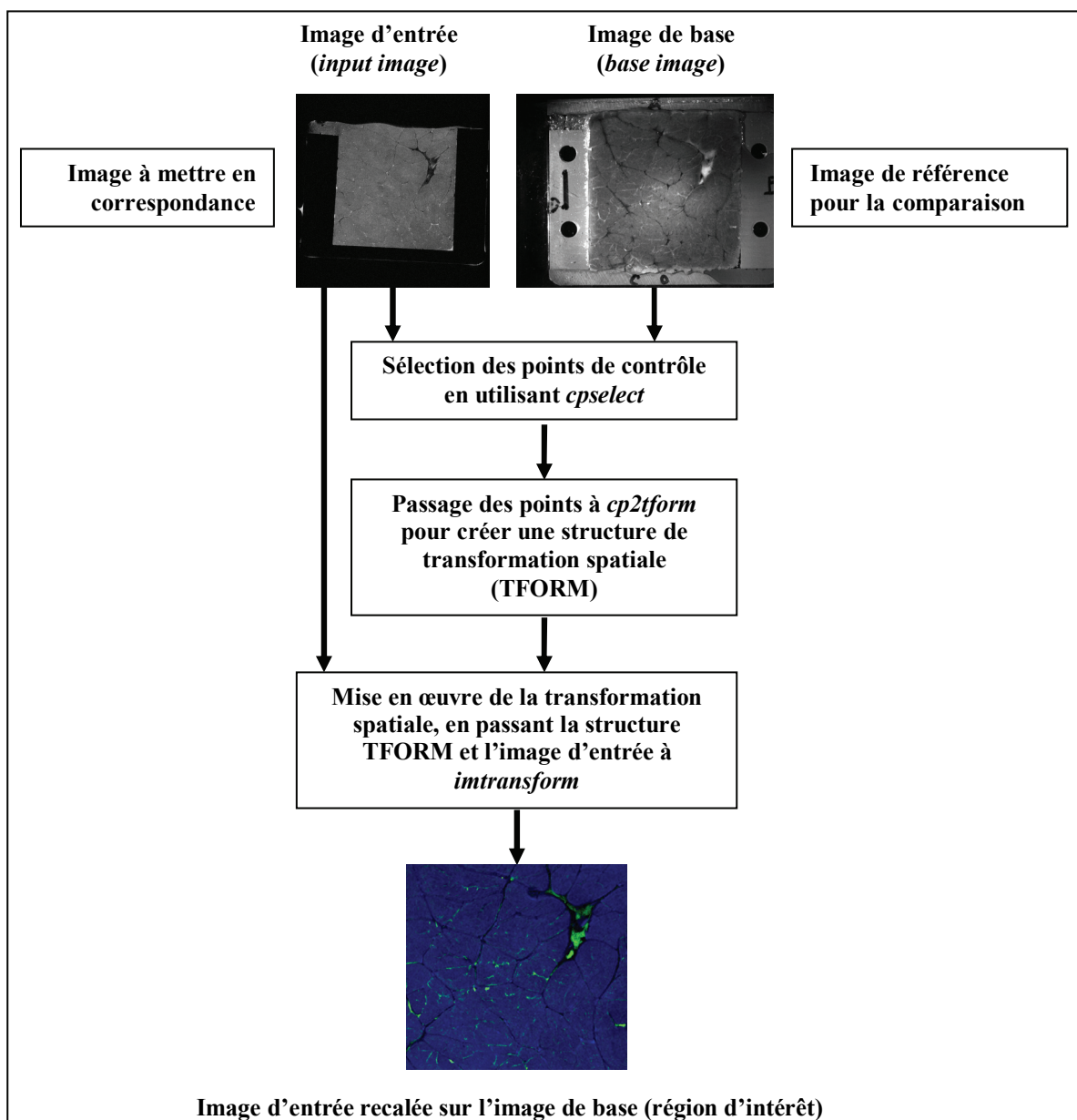


Figure 4 : méthode de recalage d'images dans l'environnement MATLAB

3.1 Lecture et mise à l'échelle des images

Cette image n'est pas corrigée *a priori* et elle inclut des distorsions liées au principe d'acquisition. La première partie du script importe les deux images dans l'espace de travail de MATLAB et les met à la même taille en utilisant :

```
Image_base=imread('base_multimod.tif');  
Image_input=imread('input_multimod.tif');  
taille= size(Image_base);  
Image_input= imresize(Image_input,taille)
```

Pour redimensionner une image, nous utilisons la fonction *imresize* en lui spécifiant le facteur de grossissement *taille*. Ce facteur est un vecteur contenant le nombre de lignes et de colonnes de l'image de sortie. Nous avons fait coïncider ces valeurs avec celles de l'image de référence. Ainsi, les images ont toutes la même taille.

L'interpolation utilisée estime la valeur d'une image à une position située entre les pixels de l'image. Quand *imresize* agrandit l'image, ce qui est notre cas, l'image de sortie de cette fonction contient plus de pixels que l'image originale. La fonction *imresize* utilise l'interpolation pour déterminer les valeurs des pixels additionnels.

Les méthodes d'interpolation déterminent la valeur du pixel interpolé en trouvant le point dans l'image d'entrée qui correspond à un pixel dans l'image de sortie et en calculant alors la valeur du pixel de sortie en procédant à une moyenne pondérée des pixels voisins de ce point. La pondération est basée sur la distance séparant chaque pixel du point.

Par défaut, *imresize* utilise l'interpolation bi-cubique pour déterminer les valeurs des pixels dans l'image de sortie, mais d'autres méthodes d'interpolation peuvent être spécifiées.

3.2 Choix et sauvegarde des points de contrôle

La fonction *cpselect* propose de voir les deux images, respectivement d'entrée et de base dans lesquelles l'opérateur doit pointer les points de contrôle avec la souris.

```
[image_points,ortho_points] = cpselect(Image_input,Image_base,'Wait',true)
```

Il faut spécifier l'option « wait » : *cpselect* bloque la ligne de commande MATLAB jusqu'à ce que les points de contrôle soient sélectionnés et que ce jeu de points de contrôle retourne les positions dans l'image d'entrée et dans l'image de base.

La **figure 5** montre cet outil qu'est le « Control Point Selection Tool » en cours d'utilisation.

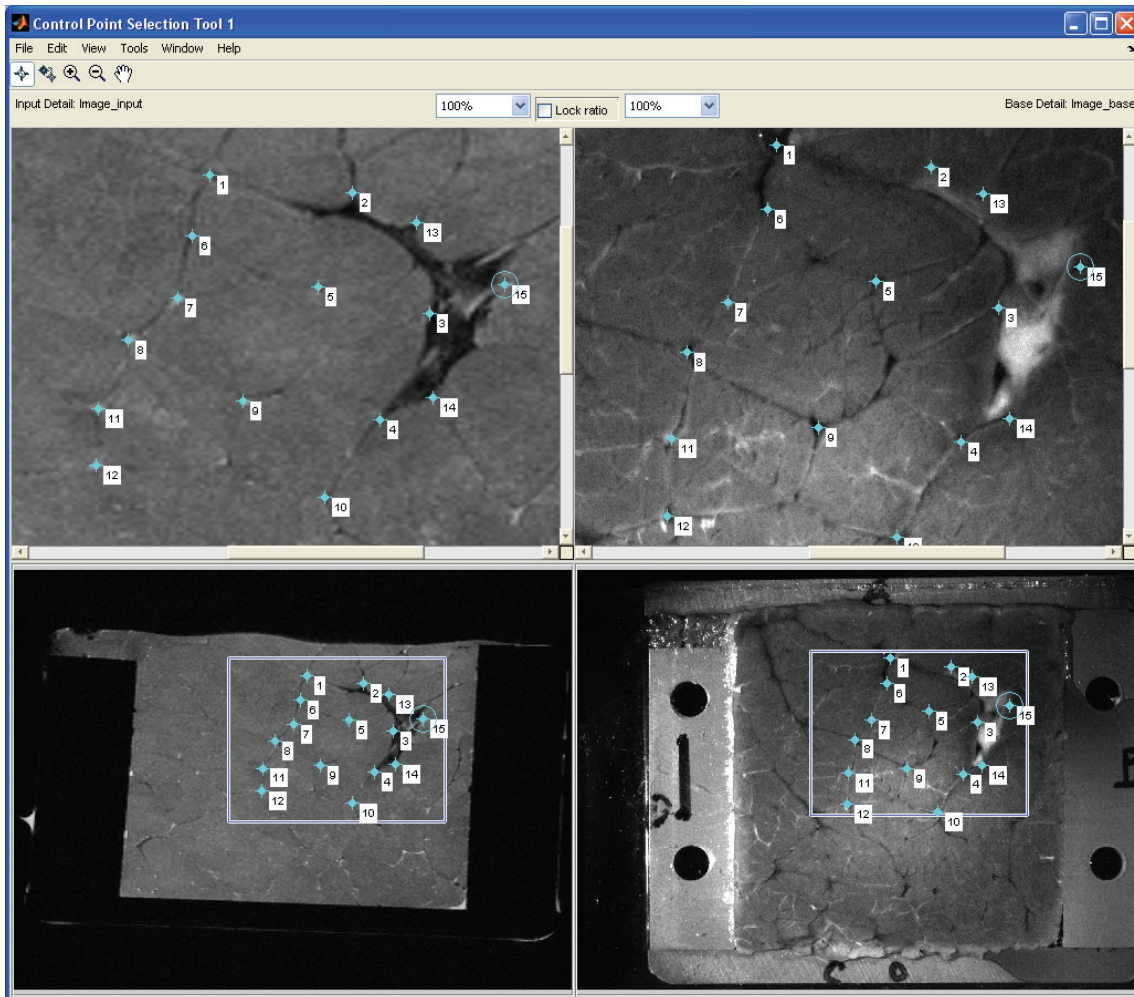


Figure 5 : copie d'écran lors de l'utilisation de l'outil de sélection des points de contrôle. Les images d'entrée et de base sont respectivement à gauche et à droite, les images « zoomées » (en haut) représentent les vues agrandies à partir des cadres bleus des images d'origine (en bas).

Le tableau des « input points » et des « base points » est ensuite sauvegardé dans un fichier TXT afin d'être exploité ultérieurement. La **figure 6** représente les maillages obtenus à partir des coordonnées spatiales de 200 points de contrôle pour les images d'entrée et de base.

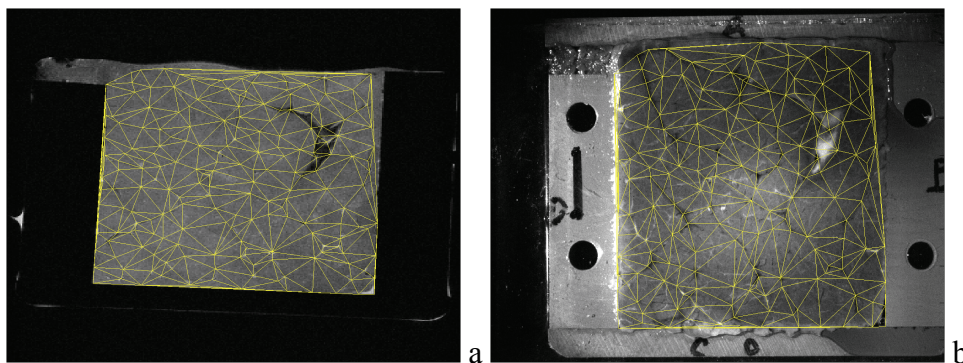


Figure 6 : maillage de la zone d'intérêt grâce à 200 paires de points de contrôle (a) dans l'image d'entrée et (b) dans l'image de base.

3.3 Choix du type de transformation

Dans cette étape, les points de contrôle sont passés à la fonction *cp2tform* qui détermine alors les paramètres de la transformation nécessaire pour aligner l'image. La fonction *cp2tform* est une fonction d'ajustement de données qui détermine la transformation basée sur une relation géométrique entre les points de contrôle. Cette fonction renvoie les paramètres dans une structure de transformation géométrique *t_concord* appelée structure TFORM.

$$t_concord = cp2tform(image_points, ortho_points, Deformation)$$

Il faut spécifier le type de transformation souhaité. La fonction *cp2tform* peut déduire les paramètres pour 6 types de transformation (**figure 7**). Il faut choisir quelle transformation corrigera le type de distorsion dominante dans l'image d'entrée. En effet, certaines images peuvent contenir plusieurs types de distorsion.

Type de transformation	Nombre minimum de paires de points requis
'linear conformal'	2
'affine'	3
'projective'	4
'polynomial' (d'ordre 2, 3, ou 4)	Resp. 6, 10, 15
'piecewise linear'	4
'lwm'	6

Figure 7 : nombre minimum de paires de points requis en fonction du type de transformation.

Les quatre premières transformations, « linear conformal », « affine », « projective », et « polynomial » sont des transformations globales. Pour ces transformations, une seule expression mathématique est appliquée à une image entière. Les deux dernières transformations, « piecewise linear » et « lwm » (local weighted mean), sont des transformations locales. Pour ces transformations, différentes expressions mathématiques s'appliquent à différentes régions d'une image. Le choix du type de transformation affecte le nombre de paires de points de contrôle à sélectionner.

Comme indiqué dans le chapitre 2, nous avons utilisé la transformation « affine » pour les corrections inter-contrastes des images RMN et la transformation « lwm » pour le recalage intermodal entre les images en autofluorescence et les images RMN.

3.4 Transformation de l'image d'entrée

L'étape finale de la mise en correspondance d'image consiste à transformer l'image d'entrée pour l'aligner avec l'image de base en utilisant la fonction *imtransform* pour effectuer la transformation, en lui passant l'image d'entrée *Image_input* et la structure *t_concord* qui définit la transformation. La fonction *imtransform* retourne l'image transformée *Ir* :

$$Ir = imtransform (Image_input, t_concord, 'XData', [1 info.Width], 'YData', [1 info.Height])$$

Cette nouvelle image est sauvegardée au format TIF sans compression.

4. Résultat

En ce qui concerne la visualisation, nous avons utilisé l'une des approches principales qui consiste à calculer une nouvelle image contenant à la fois l'image de référence et l'image recalée et à représenter leur superposition selon un codage couleur. Dans notre cas, l'image RMN est représentée en bleu et l'image par auto-fluorescence en vert. La **figure 8** représente la région d'intérêt choisie (701 x 651 pixels). Cette image fusionnée en multi-modalité permet une première validation visuelle. Elle montre qu'après transformation, les images obtenues en IRM et en auto fluorescence sont parfaitement superposées.

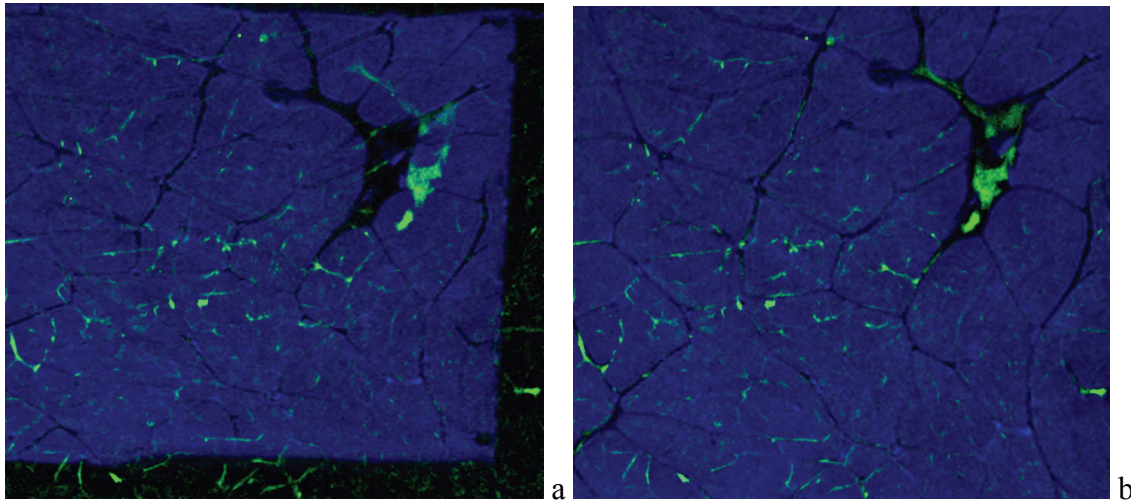


Figure 8 : représentation en fausses couleurs de la région d'intérêt, ajustement et recalage de l'image RMN en bleu par rapport à l'image par auto-fluorescence en vert. (a) avant recalage ; (b) après recalage.

Conclusion

Avec la méthode que nous avons développée, nous pouvons mettre en correspondance des images issues de différentes techniques d'acquisition. Nous avons superposé 6 contrastes issus de 2 modalités différentes. Nous avons automatisé le procédé en décrivant toutes les étapes dans un script MATLAB (**annexe**). Celui-ci à l'avantage de rendre possible le traitement d'un grand nombre d'images. Il est facilement utilisable par un utilisateur novice qui voudrait mettre en œuvre rapidement cette technique pour son application. L'utilisation de transformations rigides ou élastiques prend en compte de façon réaliste les phénomènes rencontrés comme certains bords instrumentaux ou comme la déformation des échantillons lors de leur manipulation. Les images mises en correspondance grâce à ces transformations peuvent être maintenant utilisées dans la construction et l'ajustement d'un modèle mathématique paramétrique explicatif des propriétés de la viande.

Une validation plus rigoureuse pourrait être effectuée selon d'autres techniques comme l'information mutuelle résultante des images traitées, ou bien encore par mesure de distances à partir des tableaux des coordonnées des points de contrôle.

Cette méthode de recalage peut également trouver d'autres applications : dans le domaine de l'histologie, par exemple, il s'agit de réunir des données issues de plusieurs de coupes sériées proches mais différentes. Grâce cette méthode de recalage, nous pouvons mettre en correspondance les coupes histologiques servant au marquage immunologique avec les coupes utilisées en micro-spectroscopie infrarouge (IR). Nous pouvons ainsi cartographier précisément les cellules d'intérêt, leurs types métabolique et contractile et recueillir ensuite spécifiquement leurs spectres IR afin d'étudier leurs caractéristiques chimiques.

Bibliographie

- Abouelkaram S., Chauvet S., El Jabri M., Strydom P., Bertrand D., Damez J.L. (2006) Muscle study with multispectral image analysis *in* 52nd International Congress of Meat Science and technology (ICoMST), 669-670
- Jégou C., Bonmartin A. (2004) Fusion d'images en multimodalité *in* Médecine nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique, **28** (11): 553-560
- Novalés B., Bertrand D., Devaux M.F., Robert P., Sire A. (1996) Multispectral fluorescence imaging for the identification of food products *in* Journal of the Science of Food and Agriculture, **71** (3): 376-382

Annexe : script MATLAB (*multimod_CDT.m*)

Pour procéder au même type de recalage sur un nombre important d'images, nous avons automatisé le procédé en décrivant les différentes étapes dans un script MATLAB. Celui-ci ouvre l'outil de sélection des points de contrôle avec une image d'entrée à modifier et une image de base servant de référence. Le script utilise les points de contrôle sélectionnés par l'opérateur pour créer une structure TFORM et passer à la fois cette structure et l'image d'entrée à la fonction *imtransform* dont la sortie donne l'image déformée et mise en correspondance.

Le script MATLAB suivant, accompagné de deux images de test, permet de mettre en œuvre immédiatement la méthode décrite dans cet article :

```
%% DEFORMATION D'IMAGES MULTIMODALES
% PROJET IMAGES MULTIMODALES
% FRÉDÉRIC PEYRIN
% 2009-01-16 : VERSION 1
```

```
%% INITIALISATION
```

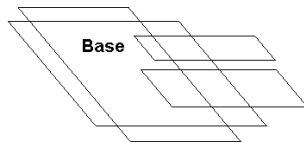
```
clear all;
close all;

% date et heure
RefTemp=datestr(now,30);
```

```
%% CHARGEMENT DES IMAGES
```

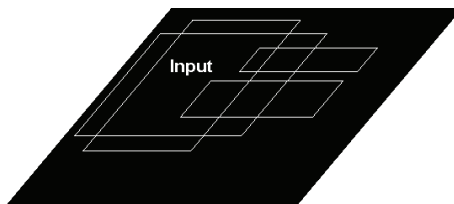
```
% chargement de l'image de base
```

```
Image_base=imread('base_multimod.tif');
```



```
% chargement de l'image à modifier
```

```
Image_input=imread('input_multimod.tif');
```



```
%mise à la même taille des 2 images
```

```
taille= size(Image_base);
Image_input= imresize(Image_input,taille);
```

```
%% CHOIX DES PARAMETRES DE TRAITEMENT D'IMAGES
```

```
R = input(strcat('Quel type de déformation voulez-vous ? \n',...
'déformations globales (toute l''image est déformée de la même façon) \n \n',...
' 1 - linear conformal \n',...
' 2 - affine (DEFAULT) \n',...
' 3 - projective \n',...
' 4 - polynomial (ORDER=3) \n\n',...
'déformations locales (l''image est déformée de façon hétérogène) \n \n',...
'
```

```

        ' 5 - piecewise linear \n',...
        ' 6 - local weighted mean (lwm) \n',...
        '\n',...
        ' fermer la fenetre "Controle point selection" après avoir sélectionné la dernière
paire de points \n'),'s');

switch R
case '1'
    Deformation='linear conformal';
case '2'
    Deformation='affine';
case '3'
    Deformation='projective';
case '4'
    Deformation='polynomial';
case '5'
    Deformation='piecewise linear';
case '6'
    Deformation='lwm';
otherwise
    Deformation='affine';
end

%% MISE EN CORRESPONDANCE DES IMAGES

% sélection des paires de points dans chacune des 2 images (voir help cpselect)
[image_points,ortho_points] = cpselect(Image_input,Image_base,'Wait',true);

% calcul de la déformation (voir help cp2tform)
t_concord = cp2tform(image_points,ortho_points,Deformation);

% transformation (voir help imtransform)
info = imfinfo('base multimod.tif');
Ir = imtransform(Image_input,t_concord,'XData',[1 info.Width],'YData',[1 info.Height]);

%% SAUVEGARDE DES RESULTATS

% Sauvegarde de l'image déformée

imwrite(Ir, [RefTemp,'_test_image_déformée.tif'],'tif','compression','none');

figure (1)
imagesc(Ir);
colormap (gray)

% Sauvegarde du tableau des « input points »

fichier_result=[RefTemp,'_test_input_points.txt'];
fid1 = fopen(fichier_result,'wt');
fprintf(fid1,'Nom_fichier\t x_image\t y_image\n');

for nn=1:size(image_points)
    fprintf(fid1,'%s\t %f\t %f\n', 'test', image_points(nn,1),image_points(nn,2));
end

fclose(fid1);

% Sauvegarde du tableau des « base points »

fichier_result=[RefTemp,'_test_base_points.txt'];
fid1 = fopen(fichier_result,'wt');
fprintf(fid1,'Nom_fichier\t x_ortho\t y_ortho\n');

for nn=1:size(ortho_points)
    fprintf(fid1,'%s\t %f\t %f\n','test',ortho_points(nn,1),ortho_points(nn,2));
end

fclose(fid1);

```




Index des auteurs

Nom	Prénom	page
Axelos	Monique	45
Ben Moussa	Abdlatif	35
Bielicki	Guy	69
Bonny	Jean-Marie	35, 115
Boulard	Céline	63
Cathala	Bernard	81
Cattenoz	Thomas	101
Delisée	Christine	17,
Della Valle	Guy	51
Devaux	Marie-Françoise	7, 93
Gaillard	Cédric	81
Guillemin	Hervé	101
Hubert	Chiron	51
Jolivet	Pascale	63
Keller	Cécile	69
Le Bon	Christel	63
Legland	David	7,
Lux	Jérôme	17,
Malvestio	Jérôme	17,
Marchal	Patrice	23
Novales	Bruno	45
Papineau	Patrice	45, 93
Perret	Bruno	101
Peyrin	Frédéric	115
Pietri	Éric	75
Réguerre	Anne-Laure	51
Reling	Patrice	75
Shehzad	Aamir	51
Sire	Alain	45, 93
Traore	Amidou	69



Numéro spécial

Année 2009

Des développements méthodologiques en imagerie à l'Inra

Sommaire

Chapitre I	p. 05
Préparation et mise sous contraintes de l'échantillon	
Chapitre II	p. 43
Mise au point de protocoles d'acquisition	
Chapitre III	p. 91
Analyse d'images	