

## Estimation du nombre de graines assistée par ordinateur

Rares sont les amateurs de cactus qui ont besoin de compter les graines d'un fruit. Cependant, lorsque la question se pose, le travail devient vite fastidieux.

La méthode développée ici consiste à scanner les graines et à les compter à l'aide du logiciel libre ImageJ. Cet outil a été développé pour de nombreuses applications scientifiques par l'institut national américain de la santé. Il est écrit en Java et fonctionne sous Windows, Linux et Mac OS X.

<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/index.html>

### Scannage des graines

Les graines, lors de leur récolte, doivent avoir été lavées et débarrassées des funiculus puis séchées.

Celles-ci sont disposées sur un support translucide, peu profond afin d'éviter les ombres portées. Les graines sont réparties sur l'ensemble de la surface de façon homogène, sans trop d'amas. C'est là une des conditions de la précision du comptage.

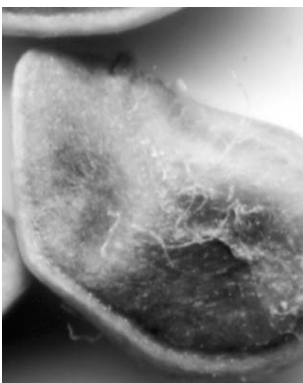
Il est conseillé d'éloigner les graines du bord du support en les rapprochant du centre. Cette opération facilite le recadrage de l'image.

Recouvrir l'ensemble d'une feuille blanche avant de scanner.



Graines, ici disposées dans un blister sur le scanner

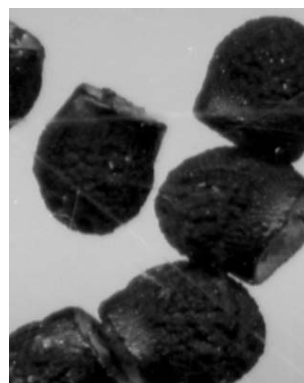
Tailles comparées de différentes graines. Champ de 3,4 mm x 4,4 mm



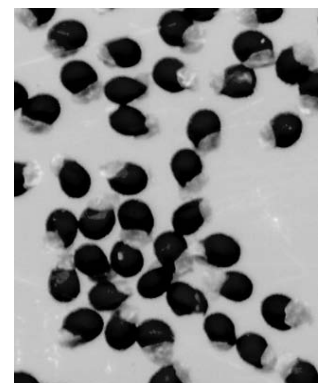
*Opuntia ficus indica*



*Thelocactus rinconensis*



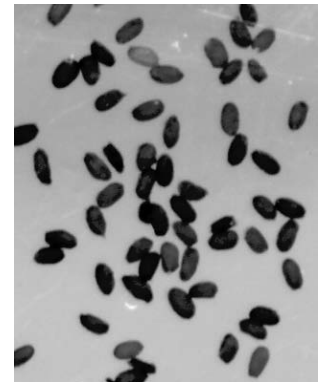
*Echinocereus pulchellus*



*Strombocactus disciformis*

## Conditions d'acquisition de l'image

- Une résolution à 600 dpi, (8-bits gris) permet une bonne reconnaissance des contours et un comptage fiable pour des graines grosses ou moyennes. Pour des graines fines, la définition peut être poussée à 1200 dpi et même jusqu'à 2400 dpi pour des très fines comme *Strombocactus disciformis* ou *Crassula falcata*. Dans ce cas, l'image pèse alors presque 1 Mo/cm<sup>2</sup>.
- Considérer les graines sur leur support comme un document opaque.
- Enregistrement de l'image au format TIFF (.tif)



*Crassula falcata*

## Traitement avec ImageJ

L'application peut être téléchargée ici :  
<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>

### Lancer ImageJ

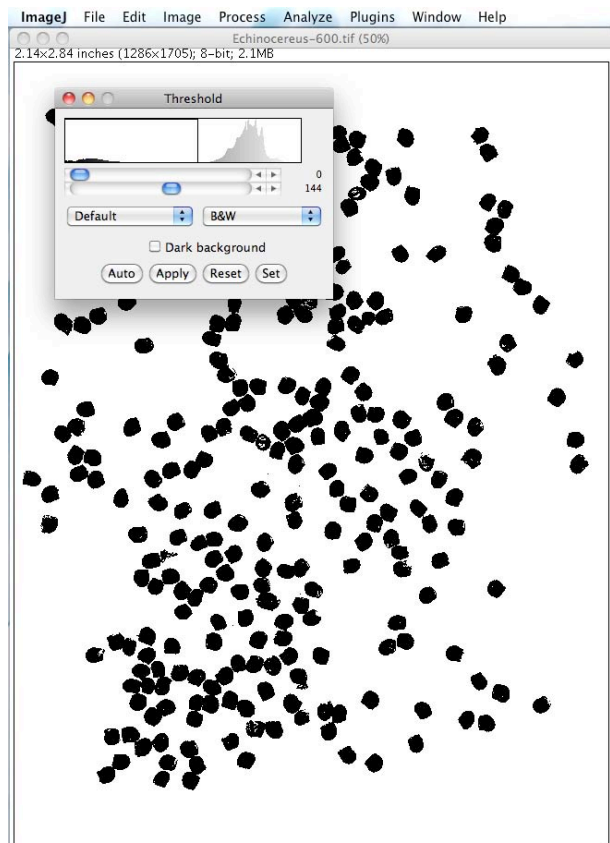
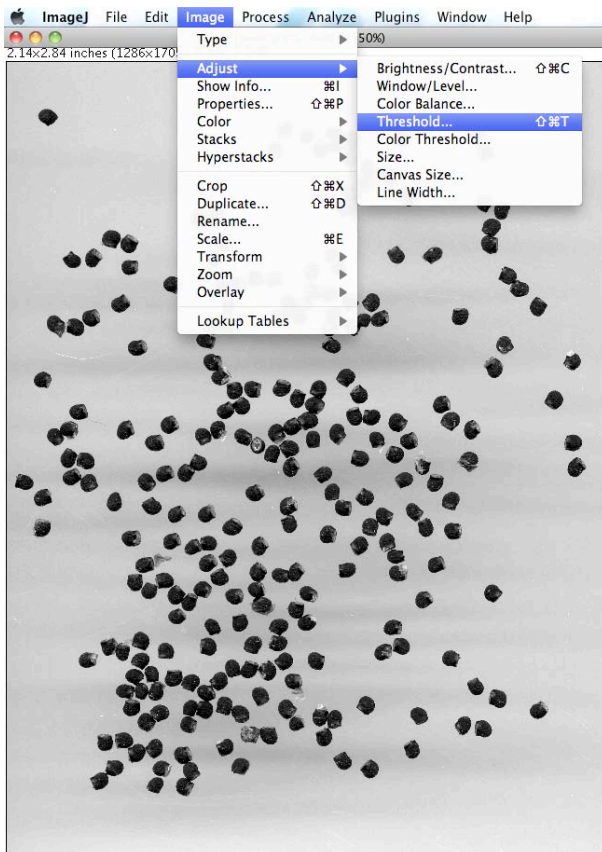
Les fonctions de ImageJ utilisées ici sont simplifiées à l'extrême. Certaines, comme le partage des amas de graines ont été abandonnées parce que les reflets sur le tégument introduisaient des artefacts. Il a semblé plus simple et surtout plus juste de réaliser cette séparation par la technique des rapports de surfaces à l'aide d'Excel.

### File —> Open

Ouvrir l'image .tif acquise au scanner.

### Image —> Adjust —> Threshold

Cette fonction permet d'ajuster le seuil où le fond d'image apparaît blanc et les graines noires à l'aide des deux curseurs. Il y a un optimum à trouver car le moindre pixel restant générera une aire parasite inutile qu'il faudra exporter et éliminer ensuite dans Excel.

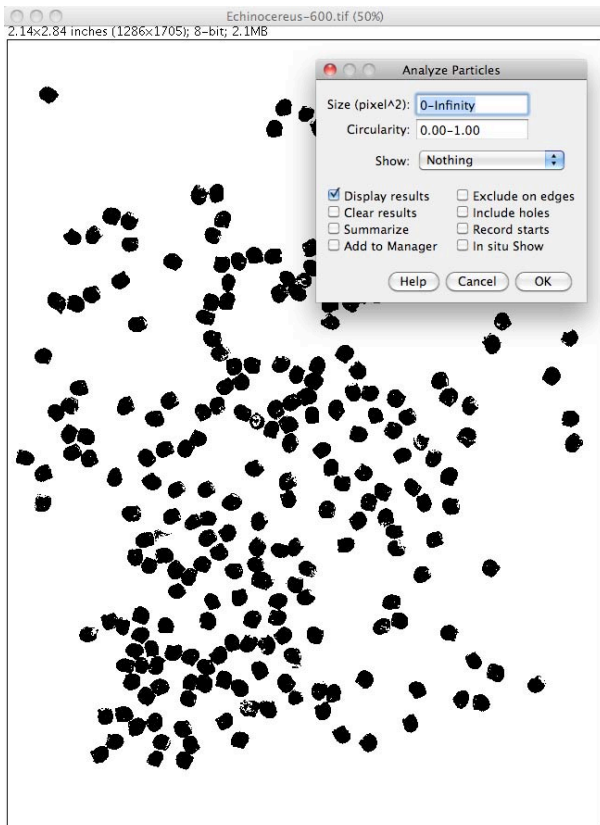


## Analyze —> Analyze particles

Avant de compter les graines, ImageJ propose de rejeter des taches trop petites ou trop grosses (Size pixel). Il est préférable de laisser les chiffres installés par défaut. Idem pour la forme (Circularity). Là encore, Excel se chargera d'éliminer les trop petites qui ne correspondent pas à des graines et divisera les gros amas pour les transformer en graines individualisées.

—> OK

Un tableau est alors généré avec un numéro d'ordre de chaque tache noire (220 dans le cas présent) et sa surface exprimée en  $\text{inch}^2$ .



	Area
195	0.005808333
196	0.002794444
197	0.006369444
198	0.000013889
199	0.008994444
200	0.002955556
201	0.000016667
202	0.000005556
203	0.000002778
204	0.002897222
205	0.003116667
206	0.006636111
207	0.000002778
208	0.009800000
209	0.002897222
210	0.002888889
211	0.002816667
212	0.009469444
213	0.003011111
214	0.003163889
215	0.003133333
216	0.006177778
217	0.002902778
218	0.000002778
219	0.000002778
220	0.002583333

## Traitement avec Excel

Les valeurs des aires et les numéros d'ordre sont copiés de ImageJ dans Excel. Le fichier ci-dessous est formaté pour recevoir environ 5000 valeurs. Les cellules de la colonne contenant les surfaces (Aire) sont formatées "nombre" et le point (séparateur décimal) est transformé en virgule décimale.

Les surfaces, exprimées en  $\text{inch}^2$  doivent être multipliées de façon à obtenir des chiffres intelligibles. Ici, le multiplicateur est 1 million et les cellules sont formatées sans aucun chiffre après la virgule. Cette opération permet d'appréhender du premier coup d'œil l'ordre de grandeur de la surface des graines individuelles. Dans cet exemple on constate une forte proportion de valeurs aux environs de 3000, chiffre qu'il faut introduire en E3. L'affinage peut se faire en deux temps après le premier calcul de l'aire moyenne d'une graine.

Pour éliminer les poussières, on discrimine à 50% de la valeur moyenne des aires des graines solitaires. Ainsi, s'il y avait de petites graines dans un lot, elles seraient quand même comptabilisées car il est rare qu'elles fassent moins de la moitié des graines normales.

Les amas de graines sont recherchés au-delà de 150% de cette même moyenne. Là encore, cette valeur est fixée pour ne pas compter double une grosse graine. On somme les aires des amas et on divise par

la valeur moyenne. Après avoir déduit les poussières du total, on somme les solitaires et les groupées réduites en solitaires. Ce fichier Excel est joint à ce document pdf mais ne peut s'ouvrir qu'avec Acrobat Standard (Document → Pièces jointes), hélas pas avec Adobe Reader...

	A	B	C	D	E	F
1			<b>Echinocereus 600 dpi</b>			
2	<b>Ordre</b>	<b>Aire</b>	<b>x 1 million</b>			
3	1	0,00299722	2997	Valeur de l'aire + fréquente	3067	
4	2	0,00300833	3008	Poussières inférieures à	1533,5	
5	3	2,778E-06	3	Amas supérieurs à	4600,5	
6	4	0,01443056	14431			
7	5	0,00249722	2497	Détection IMAGE J	220	
8	6	0,00281944	2819	Aire totale	764003	
9	7	0,00321944	3219	Nb Poussières	42	
10	8	0,00308889	3089	Aire totale des poussières	317	
11	9	0,00310833	3108	Nb d'amas de graines	43	
12	10	2,778E-06	3	Aire totale des amas	349594	
13	11	0,01173056	11731	Nb graines dans les amas	114	
14	12	1,3889E-05	14	Nb graines solitaires	135	
15	13	0,00303611	3036	Aire moyenne d'une graine	3067	
16	14	0,00310556	3106			
17	15	2,778E-06	3	<b>TOTAL GRAINES</b>	<b>249</b>	
18	16	0,00283611	2836			
19	17	0,00298056	2981			
20	18	0,00299722	2997			
200	198	1,3889E-05	14			
201	199	0,00899444	8994			
202	200	0,00295556	2956			
203	201	1,6667E-05	17			
204	202	5,556E-06	6			
205	203	2,778E-06	3			
206	204	0,00289722	2897			
207	205	0,00311667	3117			
208	206	0,00663611	6636			
209	207	2,778E-06	3			
210	208	0,0098	9800			
211	209	0,00289722	2897			
212	210	0,00288889	2889			
213	211	0,00281667	2817			
214	212	0,00946944	9469			
215	213	0,00301111	3011			
216	214	0,00316389	3164			
217	215	0,00313333	3133			
218	216	0,00617778	6178			
219	217	0,00290278	2903			
220	218	2,778E-06	3			
221	219	2,778E-06	3			
222	220	0,00258333	2583			
223						
224						

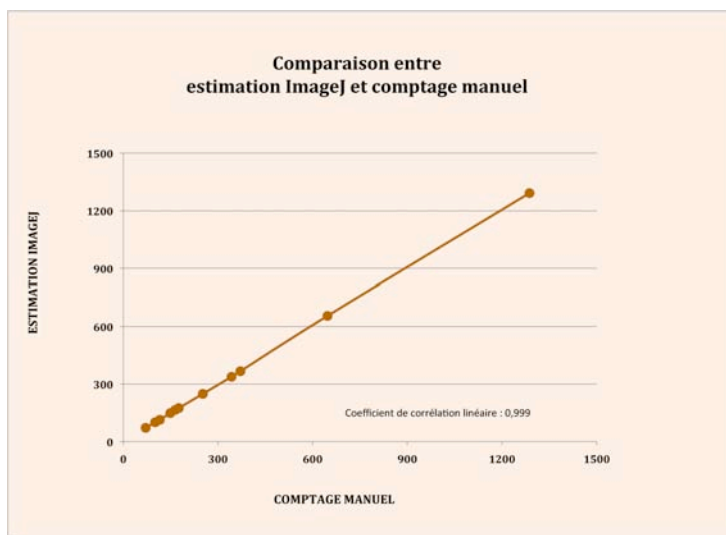
Valeur de l'aire + fréquente	3067
Poussières inférieures à	=E3/2
Amas supérieurs à	=E3*1,5
Détection IMAGE J	=NBVAL(C3:C5000)
Aire totale	=SOMME(C3:C5000)
Nb Poussières	=NB.SI(C3:C5000;"<"&E4)
Aire totale des poussières	=SOMME.SI(C3:C5000;"<"&E4)
Nb d'amas de graines	=NB.SI(C3:C5000;">"&E5)
Aire totale des amas	=SOMME.SI(C3:C5000;">"&E5)
Nb graines dans les amas	=E12/E15
Nb graines solitaires	=E7-(E9+E11)
Aire moyenne d'une graine	=(E8-(E10+E12))/E14
<b>TOTAL GRAINES</b>	<b>=E14+E13</b>

## Validation du modèle

L'influence de la résolution de scannage est marginale. Dans le cas ci-dessus le nombre de graines est estimé à 249. Sur des images scannées à 1200 dpi ou 2400 dpi, les chiffres sont à 250 dans les deux cas. Le nombre réel de graines comptées "à la main" est de 252.

Sur onze lots de graines estimés avec ImageJ et comptés manuellement, on constate que le système reste linéaire et fiable au-delà de 1000 graines.

LOT	MANUEL	IMAGE J	ECART	%
1	71	72	1	1,41
2	101	101	0	0,00
3	116	114	-2	-1,72
4	149	149	0	0,00
5	165	166	1	0,61
6	176	175	-1	-0,57
7	252	249	-3	-1,19
8	343	338	-5	-1,46
9	371	367	-4	-1,08
10	647	655	8	1,24
11	1287	1292	5	0,39



L'écart entre ImageJ et un comptage manuel se situe dans une fourchette inférieure à ± 2%. Pour conduire une estimation jusqu'au résultat final, quelques minutes suffisent et ce, quel que soit le nombre de graines.