

Traitement d'images numériques en microscopie

Yves Usson

Reconnaissance et Microscopie Quantitative, Laboratoire TIMC UMR5525 CNRS
Institut d'Ingénierie et d'Information de Santé (IN3S), La Tronche

1	<u>INTRODUCTION</u>	2
2	<u>NATURE DE L'IMAGE, DÉFINITION DE L'IMAGE NUMÉRIQUE.....</u>	2
3	<u>LES CAPTEURS</u>	3
3.1	DÉFINITION	3
3.2	LES CAPTEURS PONCTUELS.....	4
3.2.1	LES PHOTOMULTIPLICATEURS (PMT)	4
3.2.2	PHOTODIODES.....	4
3.3	LES CAPTEURS D'IMAGES	5
3.3.1	BARRETTE ET RÉSEAU DE PHOTODIODES	5
3.3.2	CAMÉRA CCD – CMOS.....	5
3.4	LES AMPLIFICATEURS DE LUMIÈRES	6
4	<u>ECHANTILLONNAGE</u>	6
4.1	ECHANTILLONNAGE SPATIAL	6
4.2	ECHANTILLONNAGE DYNAMIQUE	7
5	<u>TRAITEMENT DE LA DYNAMIQUE</u>	8
5.1	VISUALISATION, ÉCHELLE DYNAMIQUE.....	8
5.2	TRANSFORMATIONS D'HISTOGRAMME.....	9
5.2.1	ETIREMENT LINÉAIRE D'HISTOGRAMME	9
5.2.2	ETIREMENT NON LINÉAIRE D'HISTOGRAMME	9
6	<u>FILTRAGE, « AMÉLIORATION » ET RESTAURATION.....</u>	10
6.1	FILTRAGE, CONVOLUTION	10
6.2	FILTRAGE DU BRUIT.....	10
6.3	REHAUSSEMENT DE CONTRASTE	12
6.4	RESTAURATION DE LA RÉSOLUTION SPATIALE	13

Traitement d'images numériques en microscopie

1 Introduction

Etant donné qu'il règne une confusion certaine dans l'esprit des non-spécialistes, il semble utile de définir clairement ce que l'on entend par « Traitement des images numériques » et par « Analyse des images numériques ».

a) *Traitement des images numériques* : séquence d'opérations et de transformations visant à « améliorer » la lisibilité des images et à en faciliter l'observation; ou bien encore des opérations de restauration de l'information qui a été altérée par la chaîne de formation et d'acquisition de l'image. Il faut réaliser que ces opérations modifient le contenu objectif des images et sont donc à utiliser avec précaution et en maîtrisant les effets si ces traitements constituent un préalable à l'analyse d'image.

b) *Analyse des images numériques* : séquence d'opérations et de transformations visant à extraire du contenu des images les structures significatives (objets d'intérêt) et à effectuer des mesures quantitatives objectives.

Dans ce premier cours, nous concentrerons essentiellement sur les méthodes de traitement des images numériques.

2 Nature de l'image, définition de l'image numérique

Qu'est-ce qu'une image ? De la façon la plus générale, on peut considérer qu'une image représente une distribution spatiale d'une « information visuelle ».

Cette information visuelle peut être de différente sorte : par exemple une intensité lumineuse correspondant à un nombre moyen de photons, ou bien encore des informations spectrales (nombre moyen de photons par bande de longueur d'onde), ou tout autre indicateur.

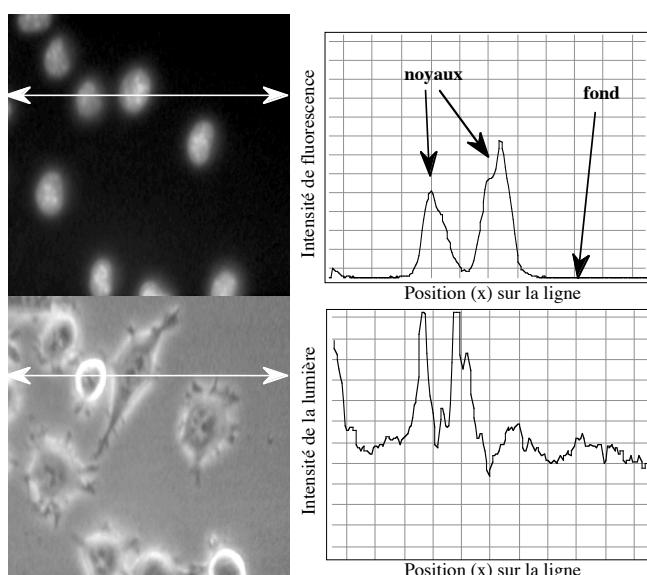


Figure 2.1 - Nature de l'image. Si l'on mesure l'intensité lumineuse le long d'une ligne au travers du champ microscopique. Une image peut donc être définie comme la variation continue de l'intensité lumineuse en fonction de la position dans le plan.

La distribution spatiale est à prendre au sens large et peut signifier espace à 1, 2 ou 3 dimensions, et, peut être étendue à d'autres dimensions par ajout d'autres indicateurs (comme le temps par exemple).

Par exemple l'image formée dans le plan image du microscope photonique conventionnel (Fig. 2.1) est une distribution bidimensionnelle de l'intensité de la lumière. On a affaire ici à un espace continu, et l'image peut-être décrite comme une fonction $I(x,y)$, où I est l'intensité, x et y les coordonnées dans le plan.

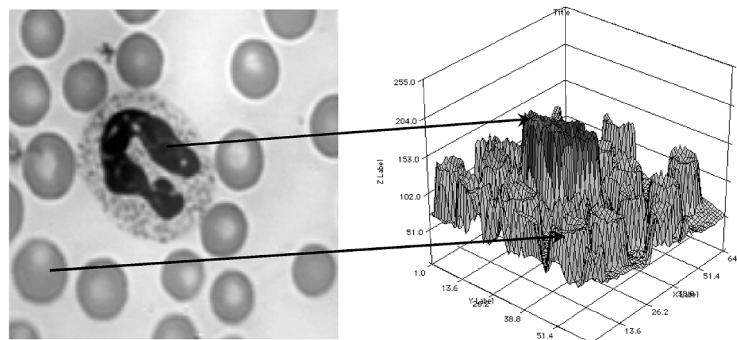


Figure 2.1 - Nature de l'image « naturelle ». Etalement de cellules sanguines en microscopie en champ clair. L'image peut-être représentée comme une fonction bidimensionnelle où l'intensité I varie en fonction des coordonnées spatiales x et y .

L'image optique va être capturée et convertie en une image numérique. L'image numérique est une représentation informatique de l'information portée par l'image « naturelle ». La numérisation peut se faire soit après capture d'une image analogique soit directement par un capteur numérique.

La numérisation consiste à convertir une information analogique en une suite de nombres organisée en une matrice de $n \times n$ dimensions. Autrement dit, une image numérique 2D est ni plus ni moins qu'un tableau constitué de lignes et de colonnes à l'intersection desquelles se trouvent stockées des valeurs numériques discrètes. La numérisation réalise donc une discréétisation selon deux domaines, une discréétisation spatiale au cours de laquelle on passe de l'espace continu à l'espace discret du tableau numérique et une discréétisation dynamique au cours de laquelle les intensités mesurées sont représentées à l'aide de valeurs discrètes.

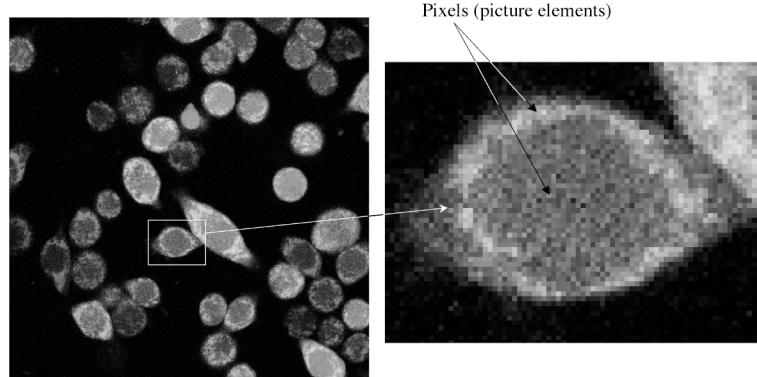


Figure 2.2 – Nature de l'image numérique. Culture de cellules en microscopie de fluorescence. Une image numérique est le résultat de la capture et de la conversion d'une image « naturelle ». L'espace et la dynamique sont discréétisés en petites unités appelées pixels.

L'élément de base d'une image numérique est le pixel. Le terme de pixel provient d'une contraction linguistique de « picture element » (élément d'image) et n'est pas sans évoquer le mot grec tesselle qui correspond à la petite pièce carrée en terre cuite qui constitue l'élément de base des mosaïques antiques. Le pixel possède des dimensions physiques (largeur et hauteur) puisqu'il correspond à une division de l'espace ainsi qu'à une position (coordonnées x, y). Enfin, lui est associée une valeur appelée niveau de gris correspondant à la numérisation de l'intensité en ce point.

3 Les capteurs

3.1 Définition

En microscopie de fluorescence, les niveaux de lumière sont très faibles, parfois seuls quelques photons sont effectivement mis en jeu. Les capteurs doivent donc être d'une extrême sensibilité et offrir un excellent rapport signal sur bruit. On peut distinguer deux grandes familles de capteurs : les capteurs ponctuels et les capteurs d'images. Ces capteurs photo-électriques (tubes à vides

ou à semi-conducteurs) peuvent être associés à des systèmes d'amplification photoélectrique. Le rôle du capteur consiste à convertir l'intensité lumineuse en une intensité électrique mesurable.

3.2 Les capteurs ponctuels

Comme leur nom l'indique, ces capteurs sont uniquement capables de mesurer l'intensité de la lumière dans un seul point du champ microscopique. La constitution d'une image complète sera obtenue par déplacement du point de mesure dans le champ du microscope à l'aide d'un système de défexion de la lumière par des miroirs orientables ou des dispositifs acousto-optiques. Ce genre de détecteur est utilisé dans la plupart des microscopes confocaux à balayage laser.

Il existe essentiellement deux types de capteurs ponctuels : les tubes photomultiplicateurs et les photodiodes.

3.2.1 Les photomultiplicateurs (PMT)

Le PMT est un tube dans lequel règne un vide poussé (Fig.3.1). À une extrémité, on a ménagé une fenêtre transparente par où les photons peuvent pénétrer. Dans le tube se trouve une série d'électrodes (appelées dynodes) portées à potentiels électriques croissants. Un photon qui pénètre dans le tube vient frapper l'électrode au potentiel 0V (photocathode) et arrache un ou plusieurs photoélectrons qui sont attirés par la première dynode au potentiel 100V. Ces électrons vont rebondir sur la dynode et vont être attirés par la dynode à 200V. Au cours du choc avec la dynode à 100V une partie de l'énergie du choc va permettre d'arracher des électrons secondaires qui sont à leur tour attirés par la dynode à 200V. Il y a donc multiplication du nombre d'électrons.

Photomultiplicateur

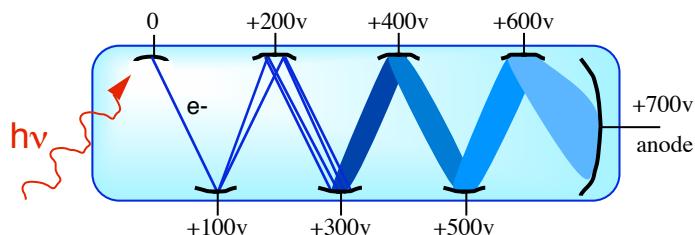


Figure 3.1. Schéma de principe du tube photomultiplicateur. Le photon ($h\nu$) entre par une fenêtre transparente et vient frapper l'électrode au potentiel 0V. Un ou plusieurs électrons sont arrachés et attirés par la dynode au potentiel 100V. L'énergie cinétique des électrons provoque la libération d'une gerbe d'électrons secondaires.

Le phénomène de multiplication va se produire en cascade, d'une dynode à l'autre et enfin donne lieu à l'existence d'un courant électrique mesurable entre la photocathode et l'anode.

3.2.2 Photodiodes

La photodiode est un capteur à semi-conducteur de type PN. Le principe électrique consiste à monter la diode en polarisation inverse (Fig.3.2). Dans cette situation, la jonction PN est bloquée et est dépourvue de porteur de charge négative (électrons) ou positive (trous). Il en résulte un courant en principe nul, en fait il circule un courant très faible appelé « courant d'obscurité » ou encore « courant noir ».

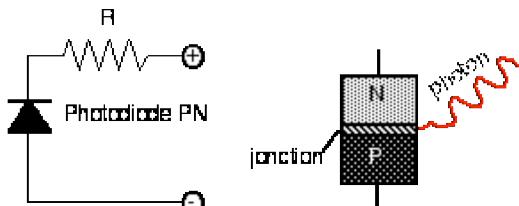


Figure 3.2. Principe de la photodiode: la diode est polarisée en inverse et donc ne laisse passer qu'un courant très faible (courant d'obscurité). L'arrivée de photons au niveau de la zone de jonction PN permet l'établissement d'un courant au travers de la jonction.

Quand on éclaire la photodiode, les photons qui arrivent à la zone de jonction provoquent l'apparition de paires trous-électrons au niveau de la jonction et donc l'établissement d'un courant. Ce courant sera proportionnel aux nombres de photons. Les photodiodes sont des détecteurs très sensibles, très rapides et très économiques à produire.

Les photodiodes à avalanche représentent un type particulier, en fait il s'agit d'une jonction PN Zener qui se trouve être polarisée à la limite de l'effet Zener. L'arrivée d'un seul photon peut donc provoquer le basculement vers l'effet Zener et donc la production d'un fort courant. Ces photodiodes offrent la sensibilité maximale et sont donc idéales pour faire du comptage de photons et étudier les fluorescences à très bas niveau.

3.3 Les capteurs d'images

3.3.1 Barrette et réseau de photodiodes

Ces capteurs sont en fait des circuits intégrés électroniques (Fig.3.3) constitués par l'assemblage d'une multitude de photodiodes arrangeées selon une simple ligne (barrette de photodiode) ou un maillage rectangulaire (lignes et colonnes). Chaque photodiode correspondra alors à un pixel (point élémentaire d'image). Ces capteurs offrent une grande sensibilité avec un faible courant d'obscurité.

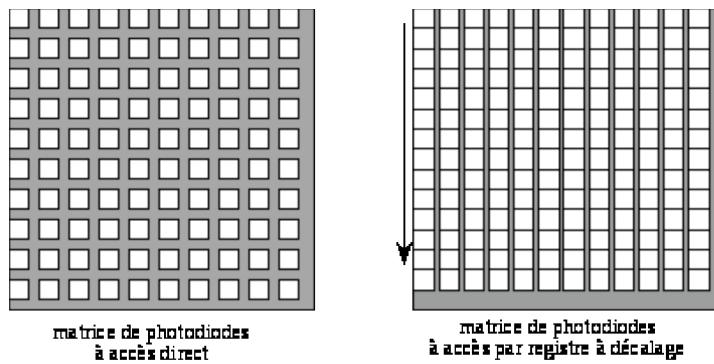


Figure 3.3. Réseau de photodiodes. A gauche: organisation par accès direct aux photodétecteurs, une grande surface du circuit est utilisée pour la circulation des courants, il existe donc des zones aveugles. A droite: organisation par registres à décalage, les photodétecteurs sont organisés en colonnes et sont accessibles en séquence, les photodétecteurs occupent un espace maximal, mais le temps d'accès est limité.

3.3.2 Caméra CCD – CMOS

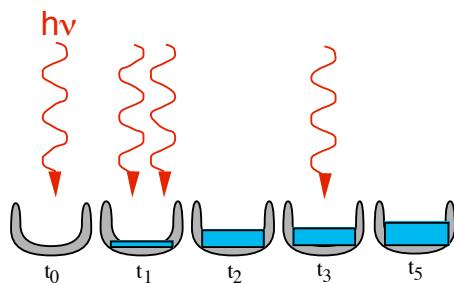


Figure 3.4. Caméra CCD: Au niveau d'un élément sensible l'arrivée de photons va se traduire par une accumulation de charges. On peut considérer comme un puits qui se remplit d'eau (les charges électriques) au fur et à mesure qu'arrivent les gouttes de pluie (les photons). Au bout d'un temps t on vide le contenu du puits (on mesure la charge électrique accumulée).

Les caméras C.C.D. sont des réseaux de photocapteurs d'un type particulier. Les éléments sensibles sont réalisés en technologie semi-conducteur à haute densité d'intégration. Chaque détecteur ponctuel constitue également un microcondensateur (ou micro capacité) électrique. En fait, les photons

au niveau d'un élément sensible s'accumulent sous forme de charges électriques. A un moment donné, on va lire le contenu de chacun de ces éléments en vidant les petites micro-capacités (Fig.3.4). Le terme C.C.D. (charge coupled device) fait référence à ce stockage sous forme de charges électriques.

Ce dispositif d'une grande sensibilité permet de considérablement augmenter le rapport signal sur bruit en utilisant des temps d'exposition longs. Cependant plus on augmentera le temps plus le signal sera contaminé par le courant d'obscurité.

Pour pallier le problème précédent, on peut utiliser des caméras CCD refroidies. En effet en portant le circuit CCD à basse température (de 0°C à -80°C) on réduit très fortement le courant d'obscurité et l'accumulation des charges créées par l'agitation thermique des capteurs. Ainsi on est certain que les charges mesurées correspondent bien à des photons.

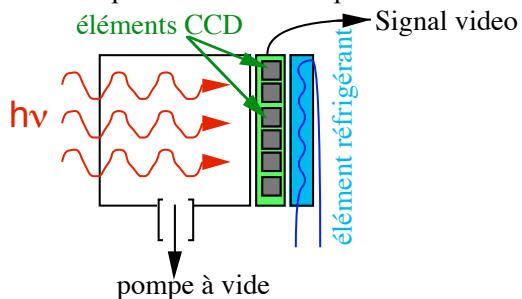


Figure 3.5. CCD refroidie. Un élément Peltier est plaqué le long du capteur CCD et pompe les calories de dernier. Ainsi le capteur se trouve réfrigéré. Pour les très basses températures, on place une chambre à vide en avant du capteur pur interdire la formation de givre.

Le refroidissement du circuit intégré est en général réalisé en plaquant un élément Peltier sur face non sensible (Fig. 3.5). Le Peltier agit comme une pompe à chaleur, il absorbe les calories du capteur et donc le refroidit et rayonne la chaleur vers l'extérieur. En général un circuit de ventilation forcée ou de circulation d'eau aide à évacuer la chaleur du Peltier. Pour les très basses températures (< -30°C) on place une chambre à vide sur la face sensible du capteur pour éviter la formation de givre.

3.4 Les amplificateurs de lumière

Pour les bas niveau de lumière, il existe une solution alternative aux précédentes. Elle consiste à associer un capteur de faible sensibilité (tube vidéo, caméra CCD standard) à un système d'amplification de lumière. Autrement dit on amplifie le signal avant de le mesurer.

4 Echantillonnage

4.1 Echantillonnage spatial

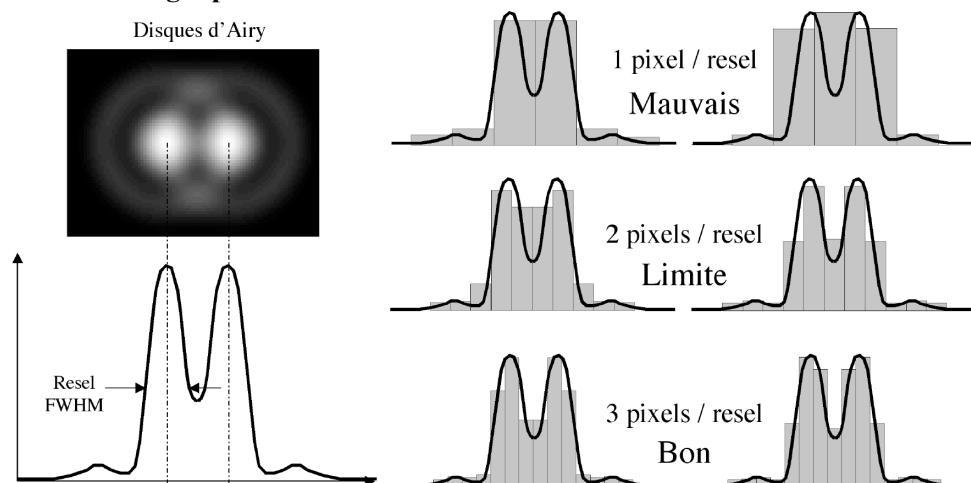


Figure 4.1.-Règles de l'échantillonnage spatial. Pour respecter le critère de Nyquist il faut que la taille du pixel soit strictement inférieure à la distance de résolution, c'est-à-dire à la largeur de la tache de diffraction mesurée à mi-amplitude (FWHM, full width half maximum), cette distance est aussi appelée résel (élément de résolution).

L'échantillonnage spatial correspond au découpage de l'image en unités élémentaires ou pixels. Afin de représenter la scène avec la meilleure finesse de détail, il faudra donc utiliser une fréquence d'échantillonnage élevée. Par exemple, si l'on veut exploiter au maximum la résolution du microscope, la taille d'un pixel devra être au maximum égale à la moitié du pouvoir de résolution conféré par l'ouverture numérique de l'objectif (critère de Nyquist, théorème de Shannon). Une bonne pratique consiste à effectuer un échantillonnage de 3 pixels par résel.

Par analogie avec pixel, on nomme résel le plus petit élément de résolution d'une image « naturelle », par exemple en microscopie, le résel est défini comme étant la largeur de la tache centrale du disque d'Airy mesurée à mi-hauteur. On le trouve également défini comme la FWHM de l'Anglais Full-Width at Half-Maximum.

4.2 Echantillonnage dynamique

L'échelle de numérisation va définir la dynamique de l'image numérique, c'est-à-dire l'écart entre la plus petite et la plus grande intensité (niveaux de gris). De plus elle définit le nombre de valeurs discrètes réparties entre les deux intensités extrêmes.

Plusieurs échelles de numérisation peuvent être utilisées dans la pratique. Le plus fréquemment une image noir & blanc sera numérisée sur 256 niveaux d'intensité (ou niveaux de gris) s'échelonnant linéairement du noir au blanc. On pourra utiliser des échelles avec plus de niveaux (1024, 2048...) pour une plus grande finesse dynamique (augmentation du rapport signal sur bruit de la chaîne de numérisation), ou bien encore les niveaux pourront s'échelonner de façon non linéaire (logarithmique par exemple). La figure 4.2 illustre l'effet du choix d'une échelle de numérisation bien adaptée à la dynamique de la scène. Avec 256 niveaux, les variations d'intensité sont convenablement représentées alors qu'avec 16 on obtient un effet caricatural. Les dégradés sont perdus et la texture est gommée.

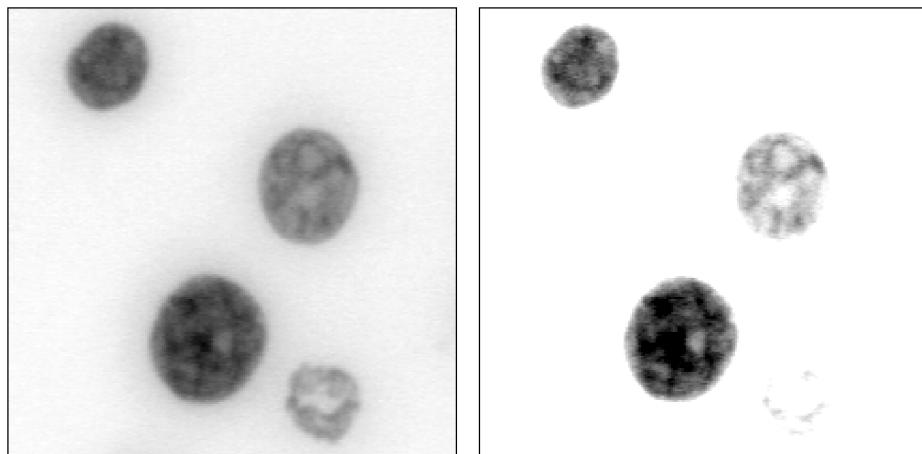


Figure 4.2. Echantillonnage dynamique. A gauche: image numérisée avec une échelle de 256 niveaux de gris; à droite: image numérisée avec une échelle de 16 niveaux de gris. De façon à mieux percevoir les variations d'intensité de ces images de fluorescence, celles-ci sont imprimées en négatif.

L'examen de la dynamique d'une image au moyen de l'histogramme des niveaux de gris offre déjà une information importante sur le contenu de l'image. L'histogramme des niveaux de gris dresse une statistique de tous les pixels de l'image. Les pixels sont regroupés en classes homogènes de niveaux de gris.

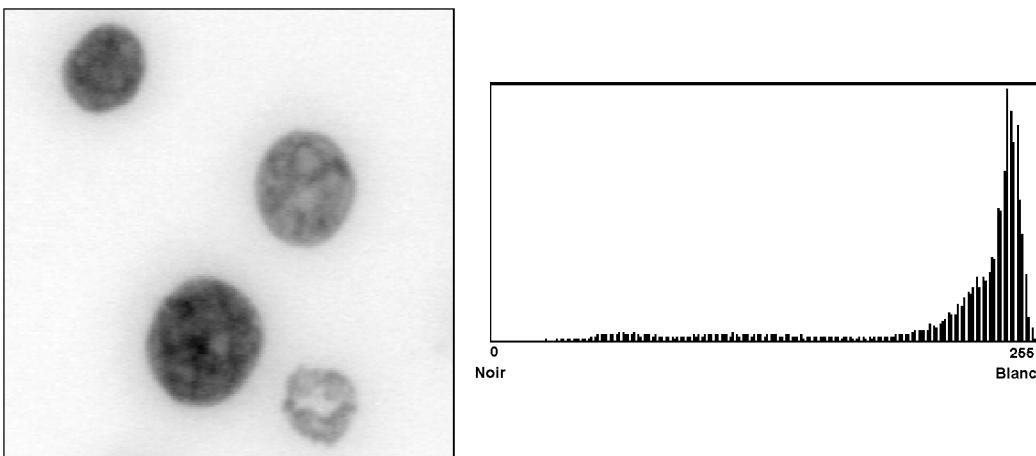


Figure 4.3. Distribution des niveaux de gris dans une image numérique. L'axe vertical correspond au nombre de pixels par classe de niveau de gris. L'axe horizontal correspond aux niveaux de gris : 0 -> noir et 255 -> blanc.

5 Traitement de la dynamique

5.1 Visualisation, échelle dynamique

Les capteurs délivrent un signal qui est proportionnel à l'intensité des signaux. Suivant les réglages d'acquisition et de numérisation, les valeurs numérisées vont plus ou moins bien être réparties sur l'échelle de numérisation. L'affichage de ces données dans un but de visualisation, requiert souvent d'opérer des transformations de l'échelle dynamique. Dans le cas de l'imagerie en fluorescence, l'utilisation de larges plages dynamiques est nécessaire (numérisation sur 12 bits). La représentation des 4096 niveaux correspondants sur un écran d'ordinateur pose un problème. Premièrement, il faut être conscient que nous voyons les images avec nos yeux et que ceux-ci sont limités en termes de capacité à distinguer les variations d'intensité. En fait, il est établi que selon les individus nous ne sommes capables de distinguer au plus qu'une soixantaine de niveaux d'intensité !. Les écrans d'ordinateurs sont conçus eux pour afficher 256 niveaux distincts d'intensité. Il est clair que la simple visualisation brute de ces images ne suffit pas à rendre compte de l'information contenue dans les images.

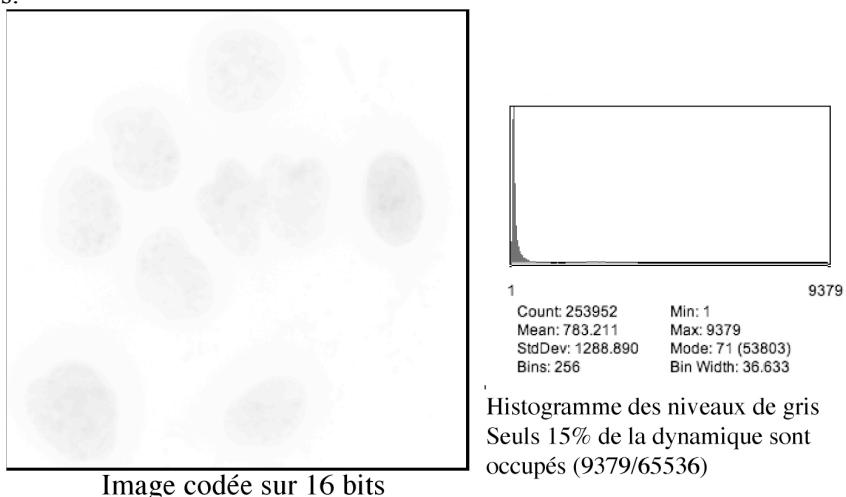


Figure 5.1-1 Etalement de cellules, coloration Hoescht. La dynamique d'acquisition est de 16 bits (soient 65536 niveaux), et la dynamique propre du signal est de 10000 niveaux environ. La représentation de cette image en pleine échelle dynamique (65536) tasse l'information sur le sixième des 60 niveaux discernables par l'œil... Les noyaux des cellules et leurs détails sont à peine perceptibles. De façon à mieux percevoir les variations d'intensité de cette image de fluorescence, celle-ci est imprimée en négatif.

5.2 Transformations d'histogramme

Les transformations d'histogramme consistent à appliquer pixel par pixel une conversion de la valeur de niveau de gris en fonction d'une loi donnée. Cette loi peut-être linéaire c'est le cas de l'étirement d'histogramme, ou non linéaire comme logarithmique par exemple. D'une manière générale, on peut écrire une transformation de la façon suivante :

$$I'(x,y) = f(I(x,y)) \text{ où } I' \text{ est la nouvelle valeur du pixel } I \text{ et } f \text{ la fonction.}$$

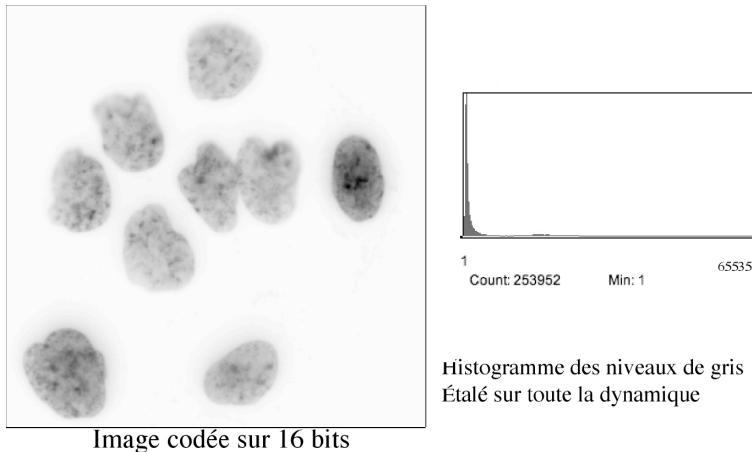


Figure 5.2 – Etirement linéaire de la dynamique de l'image de la figure 5.1. Les niveaux étant mieux répartis sur l'échelle dynamique, l'image devient plus lisible, la forme de l'histogramme reste inchangée si ce n'est qu'il occupe la pleine échelle.

5.2.1 Etirement linéaire d'histogramme

L'étirement d'histogramme consiste à répartir les niveaux d'intensité sur toute la dynamique disponible. Par exemple, si les niveaux de l'image sont tassés sur une petite partie de la dynamique, on va faire en sorte que le plus faible niveau présent devienne le niveau 0, et le plus fort présent devienne le niveau maximum possible. On réalise ainsi une homothétie linéaire :

$I'(x,y) = \text{maxdyn} * (I(x,y)-\text{minval}) / (\text{maxval} - \text{minval})$ où maxdyn est la valeur maximale possible de la dynamique (ex. 65535 pour une image 16 bits), maxval est la plus grande valeur mesurée et minval la plus petite.

5.2.2 Etirement non linéaire d'histogramme

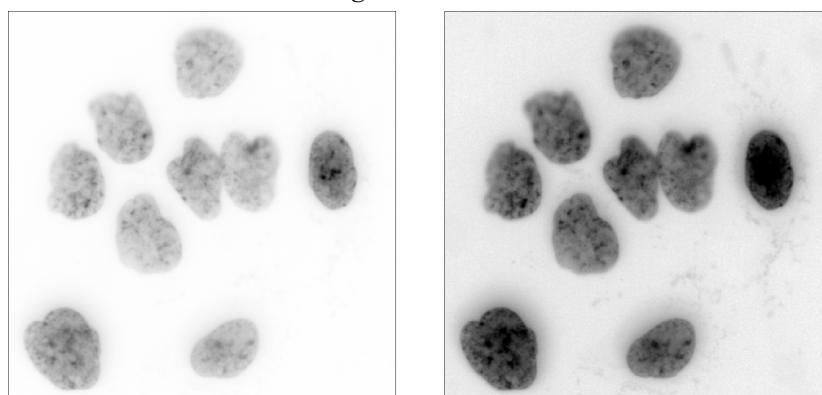


Figure 5.3 – Transformation logarithmique des niveaux d'intensité. En compressant les valeurs les plus intenses et en étalant les valeurs faibles, il est possible de rendre visibles des détails qui échappaient à l'oeil. (images en contraste inversé)

6 Filtrage, « amélioration » et restauration

6.1 Filtrage, convolution

Les opérations suivantes vont modifier de façon irréversible le contenu des images. Aussi est-il recommandé de toujours travailler sur des copies des images numériques de façon à toujours pouvoir revenir aux données originales.

Les filtrages visent à modifier le contenu d'un pixel en prenant en compte une information locale, c'est-à-dire une information extraite du voisinage plus ou moins étendu du pixel. D'une façon générale, le filtrage est obtenu par convolution de l'image avec un noyau défini. Ce noyau peut-être interprété comme une petite image ou vignette contenant un gabarit de transformation (linéaire ou non) et que l'on applique sur chacun des pixels de l'image à filtrer pour créer une nouvelle image.

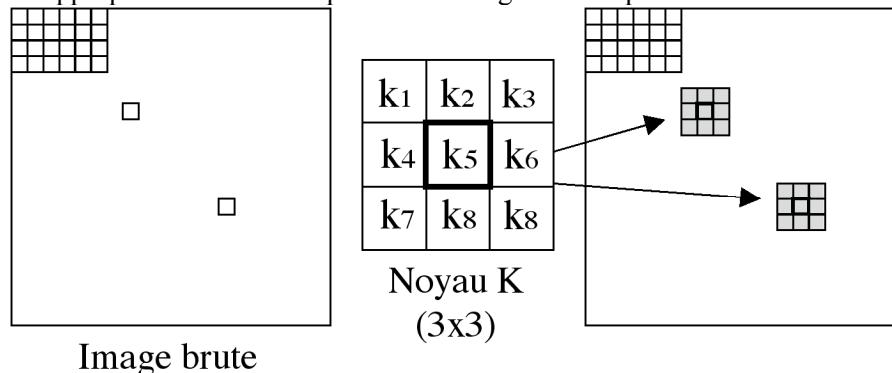


Figure 6.1 – Filtrage d'une image par un noyau de convolution. Le noyau de convolution contient des poids. Ce noyau est appliqué sur chacun des pixels de l'image brute de façon à ce que le coefficient k_5 soit positionné sur le pixel à filtrer.

L'opération de convolution dans une image numérique 2D, s'exprime ainsi :

$$I'(x, y) = \sum_{l=-k/2}^{k/2} \sum_{c=-k/2}^{k/2} K(c, l) I(x + c, y + l), \quad \text{avec} \quad \sum_{l=-k/2}^{k/2} \sum_{c=-k/2}^{k/2} K(c, l) = 1$$

où, $I'(x, y)$ est le nouveau pixel de coordonnées x et y de l'image résultat, K est le noyau de convolution de côté $k+1$ et indexé de $-k/2$ à $k/2$ en lignes et en colonnes (ainsi le noyau de la figure 6.3 est de côté 3 et la case $(-k/2, -k/2)$ contient la valeur k_1 , la case $(0, 0)$ contient la valeur k_5 et la case $(k/2, k/2)$ contient la valeur k_9 ...), et $I(x+c, y+l)$ est un pixel du voisinage de $I(x, y)$.

De façon plus prosaïque en reprenant la figure 6.3, l'ordinateur va calculer en chaque point l'opération suivante :

$$\begin{aligned} I'(x, y) = & k_1 \cdot I(x-1, y-1) + k_2 \cdot I(x, y-1) + k_3 \cdot I(x+1, y-1) + \\ & k_4 \cdot I(x-1, y) + k_5 \cdot I(x, y) + k_6 \cdot I(x+1, y) + \\ & k_7 \cdot I(x-1, y+1) + k_8 \cdot I(x, y+1) + k_9 \cdot I(x+1, y+1) \end{aligned}$$

6.2 Filtrage du bruit

Les images obtenues en fluorescence et *a fortiori* en microscopie confocale ont un rapport signal sur bruit (SNR) relativement médiocre. Ceci est dû aux très basses intensités de lumière mises en œuvre et à la nature quantique de la lumière. Les images obtenues seront donc contaminées par trois types de bruit : un bruit quantique poissonien lié à l'émission de photons, un bruit thermique gaussien lié à l'électronique du capteur et enfin un bruit impulsif lié aux parasites des lignes de transmissions entre composants électroniques.

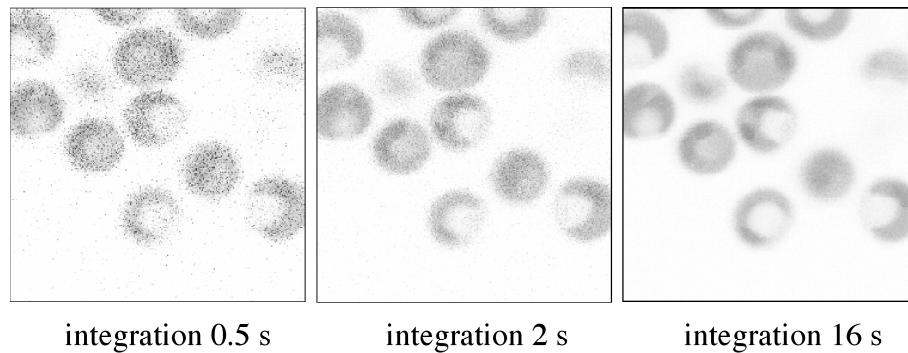


Figure 6.3 – Nature du bruit photonique . Pour un temps d'intégration bref, le nombre moyen de photons collectés reste faible, et l'image a une allure piquetée ou poivre-et-sel. L'augmentation du temps d'intégration permet d'améliorer le rapport signal/bruit.

Le bruit quantique poissonien est lié à l'émission discrète des photons par la source lumineuse. Si l'on observe un point lumineux d'une brillance donnée pendant un temps t , la probabilité de collecter un nombre donné de photons, est distribuée suivant une loi de Poisson. C'est-à-dire que la brillance mesurée dans une région aura une valeur moyenne μ et un écart-type σ égal à la racine carrée de μ . La conséquence de ceci est que le SNR sera meilleur dans les régions brillantes que dans les régions sombres. Par exemple dans une région sombre le nombre moyen de photons sera de 100 avec un écart-type de 10 soit un CV de 10% (SNR de 20dB) et dans une région 100 fois plus intense la moyenne sera de 10000 avec un écart-type de 100 soit un CV de 1% (SNR de 40dB). Différentes approches peuvent être utilisées afin d'améliorer le rapport signal sur bruit. Le moyen le plus simple est d'allonger le temps d'acquisition et donc d'augmenter le nombre moyen de photons. Une autre façon de procéder consiste à enregistrer k images (de 4 à 16 images) puis à calculer une image moyenne. La valeur d'intensité en un pixel donné étant obtenue en faisant la moyenne des intensités dans les k images. L'amélioration du SNR est proportionnelle à \sqrt{k} . Cependant, ces deux approches augmentent le temps d'exposition des fluorochromes et donc le phénomène de photodégradation. Comme cela est indiqué plus loin la photodégradation n'affecte pas uniquement les molécules de fluorochrome du plan focal mais aussi toutes celles contenues dans le double cône défini par l'ouverture numérique de l'objectif.

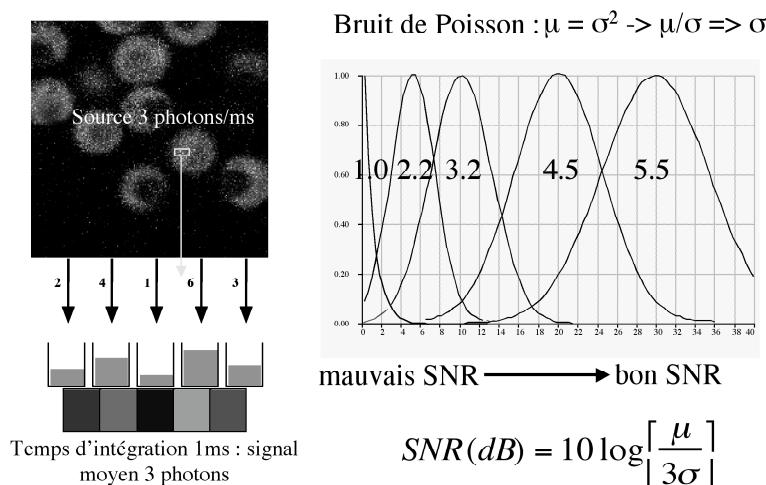


Figure 6.4 – Nature du bruit photonique – Notion de rapport signal/bruit, le bruit photonique suit une distribution de Poisson dans laquelle l'écart-type est égal à la racine carrée de la moyenne.

Une alternative à l'augmentation du temps d'exposition, est de faire appel à des techniques numériques de restauration d'images. Différents types de filtres numériques peuvent être utilisés : des filtres de convolution linéaire comme le filtrage gaussien, des filtres de rang comme le filtre médian ou des filtres plus sophistiqués combinant à la fois filtrage linéaire et filtrage de rang.

Noyau moyenne		
1/9	1/9	1/9
1/9	1/9	1/9
1/9	1/9	1/9

Noyau gaussien		
1/16	1/8	1/16
1/8	1/4	1/8
1/16	1/8	1/16

Ces filtres présentent différents avantages et limitations. En général les filtres les plus simples (gaussien ou médian) offrent une réjection du bruit très efficace. Malheureusement ils altèrent considérablement la résolution spatiale des images. En d'autres termes ils introduisent encore plus de flou dans les images. Les bords des structures et les détails fins ne sont pas préservés. Pour éviter ce genre de problèmes on utilisera plutôt des techniques de filtrages dites « adaptatives ». Ainsi que le nom l'indique, ces méthodes adaptent en chaque pixel le type et la force du filtrage en fonction de l'information locale. Ainsi ces filtres fonctionnent en deux temps: 1°) analyse de l'information locale (gradient d'intensité, écart-type des niveaux d'intensité...) 2°) le filtrage proprement dit dont la force et le type sont modulés par l'étape précédente.

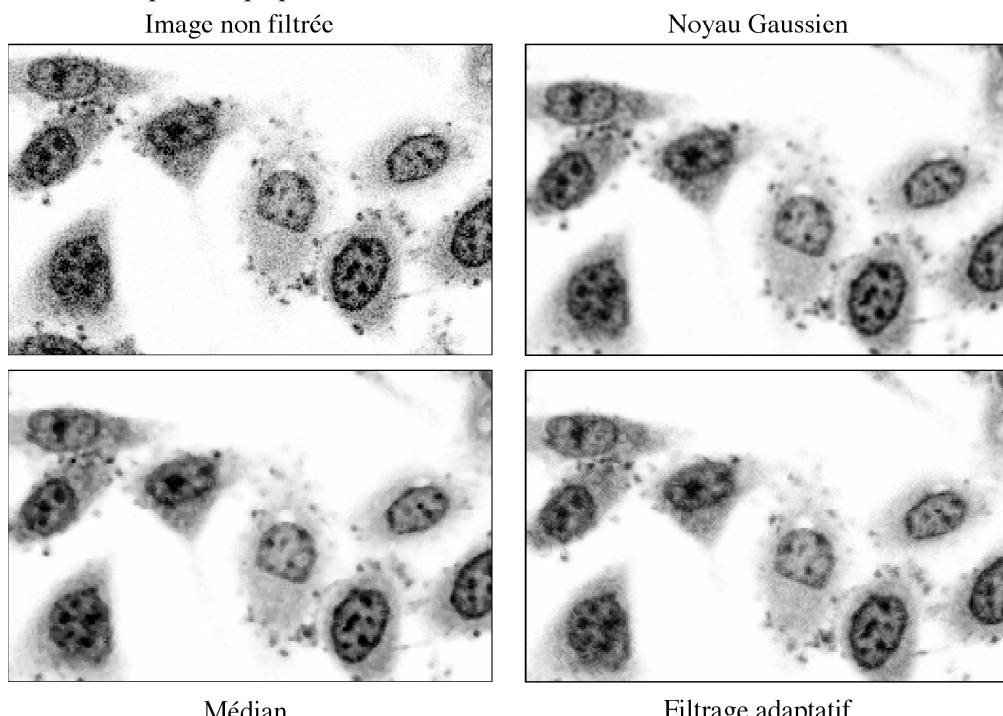


Figure 6.5 – Comparaison de différents algorithmes de filtrages appliqués à une image de fluorescence.

6.3 Rehaussement de contraste

Les techniques de rehaussement de contraste sont des méthodes empiriques dont le but est de redonner un semblant de netteté aux images comportant un léger flou. Les principes qui président à la formation des images dans un microscope font que celles-ci apparaissent légèrement floues. De ce fait les utilitaires de rehaussement de contraste présents dans les logiciels de traitement d'images permettent de rendre ces images plus « nettes » et donc plus agréables à l'œil.

Le principe général du rehaussement repose sur l'hypothèse que l'image est altérée par un flou gaussien, c'est-à-dire, que la forme de la tâche de diffraction n'est pas un disque d'Airy mais une fonction de Gauss. Ainsi un bord franc de structure comme le passage du fond de la préparation vers l'intérieur d'une zone marquée, se présente alors comme une transition de niveau de gris douce et progressive. Ainsi si l'on ajoute à l'image tout, ou partie de la dérivée de l'image (laplacien) ou renforce les bords des structures durcissant les pentes (Fig.6.6).

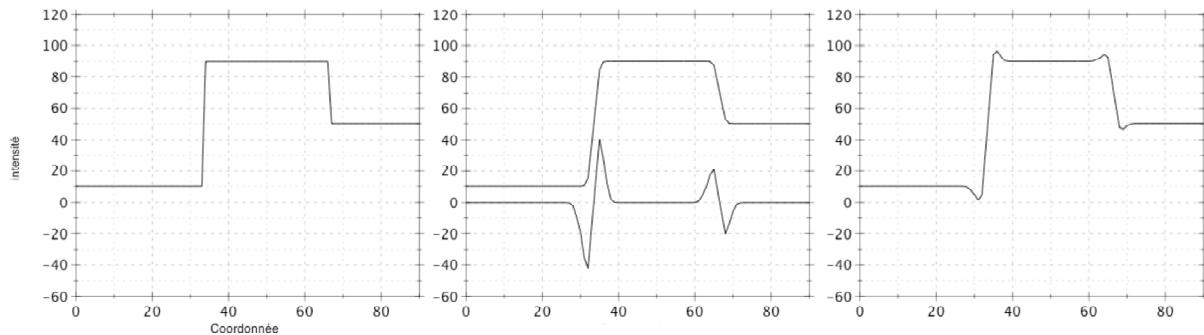


Figure 6.6 – Rehaussement de contraste. Gauche : signal idéal à bord francs ; Milieu : la courbe supérieure correspond à l'image du signal altéré par un flou gaussien, les pentes sont adoucies, la courbe inférieure correspond au laplacien de l'image ; Droite : rehaussement de l'image par addition de 25% du laplacien. Le rehaussement raidit les transitions tout en les bordant d'une frange sombre et d'une frange claire.

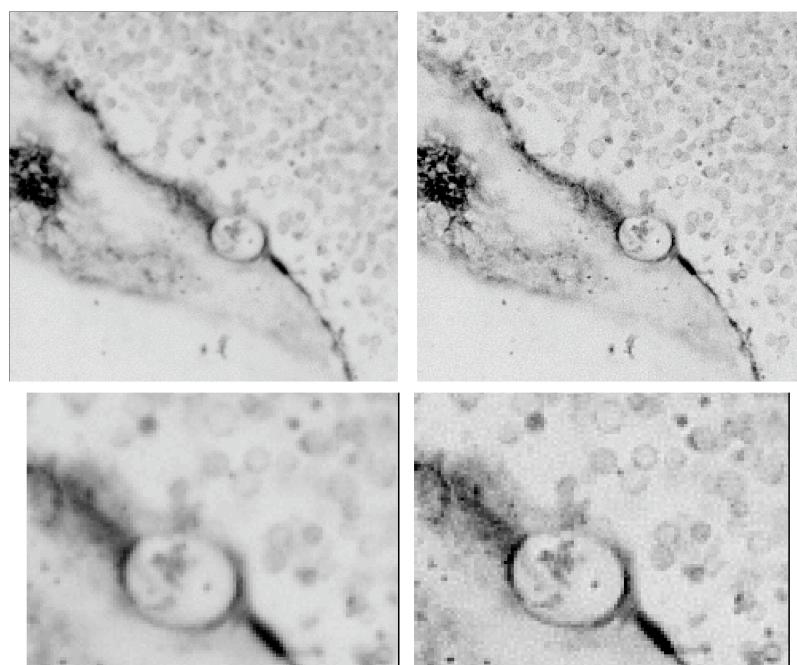


Figure 6.7 – Exemple de rehaussement de contraste. A gauche : image brute et agrandissement d'une partie de l'image. A droite : image rehaussée et agrandissement de la même partie.

6.4 Restauration de la résolution spatiale

Lors de la formation de l'image d'un objet par le système optique, celle-ci va subir des altérations dues au phénomène de diffraction. Ainsi, l'image d'un objet ponctuel apparaîtra comme une tache de diffraction nommée "*disque d'Airy*". La formation de l'image peut se résumer par la formule suivante : $\mathbf{i} = \mathbf{h} \otimes \mathbf{o}$, où i est l'image, h la fonction de flou du système (disque d'Airy) ou encore P.S.F. (Point Spread Function), o représente l'objet et \otimes est l'opérateur de convolution.

La restauration de l'objet pourrait donc se réduire à une opération de filtrage linéaire inverse : $\mathbf{o} = \mathbf{h}^{-1} \otimes \mathbf{i}$. Cette approche suppose cependant que l'on puisse établir précisément la P.S.F. inverse h^{-1} et que l'image ne soit pas bruitée. Malheureusement, dans une situation réelle il est difficile d'une part de déterminer h^{-1} et, d'autre part l'image n'est jamais exempte de bruit. Des techniques de déconvolution itérative contrainte ont été développées pour venir à bout de ces limitations. Ces méthodes sont basées sur une correction progressive d'un estimateur \hat{o} de l'objet. Entre chaque itération, on teste la qualité de l'estimateur en le convolvant par la P.S.F.. Dans l'hypothèse où l'estimateur est correct, alors son image floue devra être identique à l'image délivrée par le système optique. Si c'est le cas le processus peut être arrêté, sinon on calcule l'erreur effectuée et cette dernière sert de base pour corriger l'estimateur et procéder à une nouvelle itération.

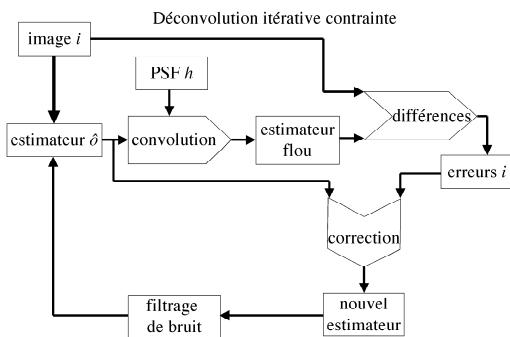


Figure 6.7 – Diagramme de l'algorithme de déconvolution itérative contrainte.

Plusieurs algorithmes basés sur ce principe ont été mis au point par de nombreux auteurs. Ils diffèrent essentiellement par la façon d'évaluer l'erreur d'estimation et la correction à appliquer entre chaque itération ainsi que la prise en compte du bruit. En pratique, il est possible d'obtenir une restauration après un nombre réduit d'itérations (entre 5 et 10). Des exemples de restauration sont donnés pour deux applications 1°) à gauche : hybridation *in situ* de sondes cosmides dans un noyau interphasique (a- image brute, b- image restaurée) et 2°) à droite : une métaphase de souris colorée au DAPI (c- image brute, d- image restaurée). On observe une amélioration notable de la résolution. Dans b) les signaux peuvent être résolus d) les bandes DAPI sont mises en évidence.

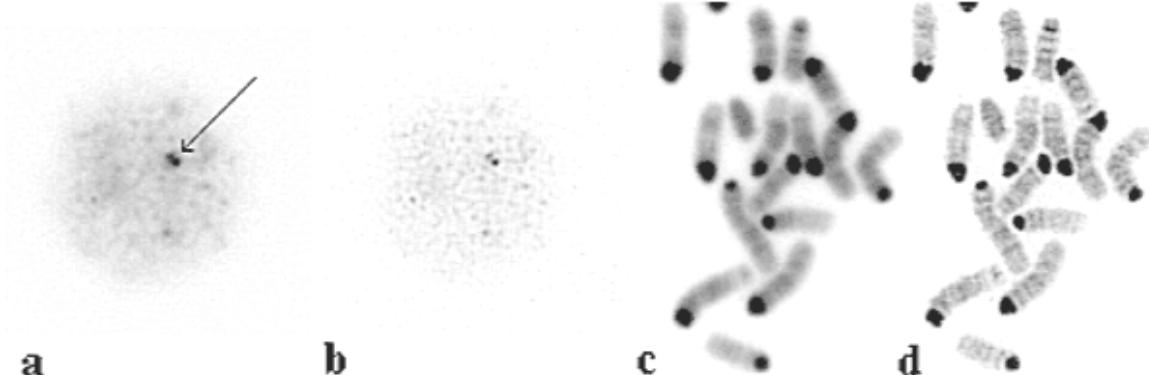


Figure 6.8-Exemples de restauration par déconvolution itérative. a et c : images brutes ; b et d : images restaurées.