

L'ANALYSE D'IMAGE

L'analyse d'image va avoir 3 fonctions principales

1 - retrouver le signal original émit par l'objet

2 - amélioration de l'image

3 - mesures

1 - CORRECTION DES MODIFICATIONS INDUITES PAR LE SYSTEME

1 - 1 Gamma

La caméra ne donne pas toujours une réponse linéaire en fonction de l'intensité du signal. C'était surtout vrai pour les caméras à tube. Il peut être utile d'apporter une correction et de linéariser cette réponse. Réglage du gamma. Cette correction peut se faire en cours d'acquisition sur la caméra.

1 - 2 Suppression du bruit

Le système vidéo va acquérir un signal correspondant à l'objet observé + du bruit. Il s'agit d'avoir le meilleur rapport signal/bruit. Il faut donc chercher à diminuer le bruit. Pour supprimer le bruit aléatoire la meilleure solution est de faire un filtrage temporel c'est à dire de faire l'intégration d'un certain nombre d'images et de calculer leur moyenne. On peut ainsi diminuer fortement le bruit aléatoire en supprimant le bruit aléatoire de valeur moyenne nulle. Ceci n'est possible que pour des images immobiles, sans bleaching de la fluorescence et avec un temps d'acquisition court.

1 - 3 Suppression du vignettage (shading).

Le vignettage est la modification du signal due aux défauts du système. Pour un objet d'intensité lumineuse uniforme on obtient un signal non uniforme. Sa correction est aussi appelée **correction de fond** souvent confondue avec la soustraction de fond. La correction de fond nécessite l'acquisition d'une image sans source de lumière qui est stockée en tant que référence de noir. Une image avec éclairage et absence d'objet est acquise et est stockée en tant que référence de blanc. Le système de traitement de l'image peut ainsi connaître les paramètres pour corriger le décalage (offset) et le gain pour chaque point de l'image.

Pixel corrigé = (pixel entrant - pixel de référence noir) x gain

Dans certains systèmes ce traitement peut être appliqué en temps réel lors de l'acquisition des images.

La soustraction de fond est la simple soustraction d'une image acquise sans objet.

1 - 4 Déconvolution. (voir le chapitre dédié à la déconvolution)

Lors de son passage dans le système d'acquisition le signal correspondant à 1 point de l'objet subit une série de transformations ou convolutions. La transformation inverse qui permet de revenir au point de l'objet à partir de l'image s'appelle une déconvolution. Les dégradations de l'image dues aux défauts d'optiques ou à des défocalisations pour être assimilées à des déformations dues à des filtres mathématiques. Si un opérateur inverse

existe et si on connaît le PSF (point spread function = image donnée par un filtre d'un point objet) on peut reconstruire l'image originelle sans déformation. La fonction inversant l'opération d'un filtre s'appelle une **déconvolution ou filtrage inverse**.

2 - AMELIORATION DE L'IMAGE

Pour une meilleure visualisation on peut être amené à faire des modifications sur l'image. Si les différentes opérations citées précédemment ne modifient pas les mesures ultérieures pouvant être faites sur les images puisqu'elles sont appliquées de façon identiques sur toutes les images acquises il peut ne pas en être de même si on effectue des modifications indépendantes sur les images en vue d'en améliorer la présentation.

2 - 1 Amélioration du contraste

Cette opération commence déjà lors du réglage de la camera qui doit être optimisé pour avoir une acquisition avec le meilleur contraste possible : signal non saturant et sans sous exposition.

Les modifications du contraste de l'image se font à l'aide de tables d'anamorphose. Le but est de faire apparaître dans l'image des variations utiles dans les zones faiblement contrastées. Il est important pour la suite des explications de comprendre que les distributions de niveaux de gris d'une image et d'une zone ne sont pas du tout équivalentes. Si une image possède un fond noir très important et une petite zone de niveaux de gris centrale, l'histogramme de l'image entière montre un pic important des niveaux bas et une très faible distribution des niveaux supérieurs. Par contre, Si l'on fait une sélection de la zone centrale en niveaux de gris, le pic des niveaux bas disparaît. Le résultat d'une égalisation par exemple sera complètement différent.

Une anamorphose transforme le niveau de gris d'origine (image de départ) en une autre valeur de gris (image de destination). La fonction de transfert aura un effet sur le contraste et la luminosité de l'image. Chaque pixel se voit attribuer une nouvelle valeur $F(\text{valeur entrée})$, où F est une fonction de transfert linéaire ou non, continue ou discontinue définie dans l'intervalle $[0, 255]$.

Pour une image 8 bits, la table d'anamorphose (aussi appelée Lookup) a 256 éléments. Chaque élément de la table représente une valeur d'entrée. Son contenu est la valeur de sortie.

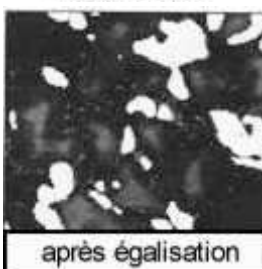
Dans l'image ci-dessous, les pixels compris dans les intervalles $[0, 49]$ et $[191, 255]$ ne contiennent pas d'information significative



image source



Histogramme des niveaux de gris avant égalisation



après égalisation



Histogramme des niveaux de gris après égalisation

Egalisation

Cette transformation permet de générer une table d'anamorphose qui augmente la dynamique de l'image et étend les valeurs des pixels à l'ensemble des niveaux de gris. Cette fonction tend à associer un nombre égal de pixels par intervalle de niveaux de gris et permet ainsi de profiter au maximum de l'intervalle utile de 256 valeurs de gris en récupérant les plages où peu de pixels sont présents.

L'égalisation peut être limitée à un intervalle donné. Dans ce cas la fonction distribuera les pixels appartenant à l'intervalle choisi sur la dynamique [0,255]. Les autres pixels seront mis à 0. L'image résultat rend plus visibles les détails de l'intervalle et efface les pixels hors intervalle.

2 - 2 Filtrage spatial

Le filtrage spatial modifie la valeur d'un pixel proportionnellement aux variations d'intensité lumineuse de ses voisins. Ces filtres peuvent être sensibles à la présence ou à l'absence de telles variations. Ils sont utilisés pour augmenter certains contrastes, détecter des fronts ou des contours, ou au contraire réduire le bruit par lissage.

Le filtrage spatial peut être divisé en deux catégories :

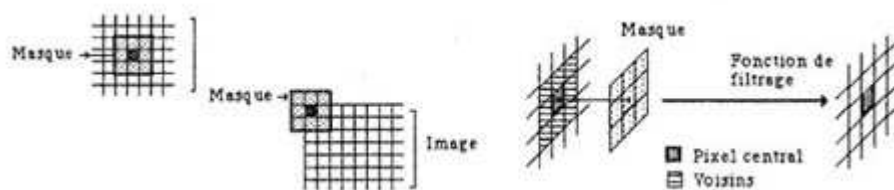
Filtres passe-haut qui mettent en évidence les variations de lumière qui composent traditionnellement les contours des objets ou la texture d'une image.

Filtres passe-bas qui atténuent les variations de lumière. Ils ont pour effet de lisser le contenu de l'image et de limiter les brusques variations d'intensité.

2-2-A - Concepts mathématiques

Les Convolutions sont des transformations qui permettent de remplacer chaque pixel de l'image par une combinaison linéaire des pixels voisins. Ces transformations ont pour but soit de mettre en évidence les variations dans l'image (passe-haut), soit de lisser les détails (passe-bas). Le voisinage d'un point est défini par une matrice ou noyau de convolution (Kernel) centrée sur le pixel. Les coefficients de cette matrice définissent les poids associés à chaque pixel voisin.

Dans le cas d'une matrice 3x3, la valeur du pixel central (en noir sur la figure) dépendra directement de la valeur de ses huit voisins (représentés en pointillés). Une matrice 5x5 d, finit 24 voisins, une matrice 7x7, 48 voisins, etc...



Si P_{ij} représente l'intensité du pixel P de coordonnées (i,j) , les pixels entourant P_{ij} peuvent être indexés comme suit (cas d'une matrice 3x3)

$P_{i-1,j-1}$	$P_{i,j-1}$	$P_{i+1,j-1}$
$P_{i-1,j}$	$P_{i,j}$	$P_{i+1,j}$
$P_{i-1,j+1}$	$P_{i,j+1}$	$P_{i+1,j+1}$

Un **filtre linéaire** affectera à $P_{i,j}$ une valeur qui est une combinaison linéaire des pixels voisins.

Un **filtre non linéaire** affectera à $P_{i,j}$ une valeur qui n'est pas une combinaison linéaire des pixels voisins.

2-2-B - Les filtres

FILTRES	PASSE-HAUT	PASSE-BAS
LINEAIRES	Gradient, Laplacien	Lissage, Gaussien
NON-LINEAIRES	Gradient, Roberts, Sobel, Prewitt, Différentiation, Sigma	Médian, Ordre n, Passe-bas

a - Les filtres linéaires ou convolutions

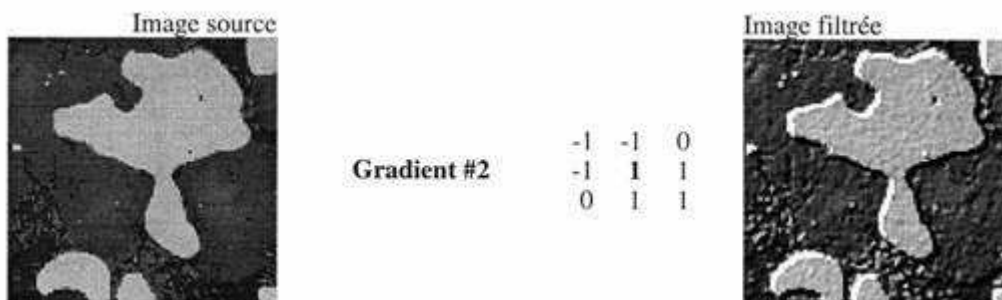
Une convolution est une fonction mathématique qui remplace chaque pixel par une somme pondérée de ses voisins. La matrice définissant la taille du voisinage contient les poids respectifs de chaque pixel voisin. Cette matrice est aussi appelée masque ou noyau de convolution.

Voici quelques exemples de filtres linéaires :

Gradient

Un filtre Gradient permet de mettre en évidence les variations de niveaux de gris suivant un axe variable, ce qui aura pour effet de mettre en évidence les fronts et de révéler les textures. Pour une direction donnée, un filtre Gradient sera utilisé pour augmenter ou bien réduire les fronts sur cette direction. Ce filtre est sensible aux variations d'intensité perpendiculaires à l'axe de symétrie du noyau.

Il sera utilisé en particulier pour mettre en évidence des contours. Plus le noyau de convolution est grand, plus larges sont les contours.



Il peut aussi être utilisé pour donner une impression de bas relief à l'image ou d'image acquise avec un filtre de Normasky (contraste interférentiel)

Exemples:

Gradient 5x5	W/Edge					W/Image				
	0	-1	0	1	0	0	-1	0	1	0
-1	-2	0	2	1	-1	-2	0	2	1	
-1	-2	0	2	1	-1	-2	1	2	1	
-1	-2	0	2	1	-1	-2	0	2	1	
0	-1	0	1	0	0	-1	0	1	0	

Gradient 7x7	W/Edge							W/Image						
	0	-1	-1	0	1	1	0	0	-1	-1	0	1	1	0
-1	-2	-2	0	2	2	1	-1	-2	-2	0	2	2	1	
-1	-2	-3	0	3	2	1	-1	-2	-3	0	3	2	1	
-1	-2	-3	0	3	2	1	-1	-2	-3	1	3	2	1	
-1	-2	-3	0	3	2	1	-1	-2	-3	0	3	2	1	
-1	-2	-3	0	3	2	1	-1	-2	-3	0	3	2	1	
0	-1	-1	0	1	1	0	0	-1	-1	0	1	1	0	

Laplacien

Le Laplacien met aussi en évidence les variations d'intensité autour d'un pixel et peut être utilisé pour mettre en évidence des contours. Contrairement au gradient il n'est pas directionnel. Plus le noyau de convolution est grand, plus larges sont les contours.

Contour24					+ Image x1				
-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
-1	-1	24	-1	-1	-1	-1	25	-1	-1
-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Lissage

Un filtre de lissage atténue les variations de lumière dans le voisinage d'un pixel. Exemples de lissages 3x3

0	1	0	0	1	0	0	2	0	0	4	0
1	0	1	1	1	1	2	1	2	4	1	4
0	1	0	0	1	0	0	2	0	0	4	0
1	1	1	1	1	1	2	2	2	4	4	4
1	0	1	1	1	1	2	1	2	4	1	4
1	1	1	1	1	1	2	2	2	4	4	4

Gaussien

Même effet que le lissage mais moins marqué. Exemples de gaussiens 3x3

0	1	0	0	1	0	1	1	1
1	2	1	1	4	1	1	2	1
0	1	0	0	1	0	1	1	1
1	1	1	1	2	1	1	4	1
1	4	1	2	4	2	4	16	4
1	1	1	1	2	1	1	4	1

b - Les filtres non-linéaires

Contrairement au filtrage par convolution linéaire, le filtrage non linéaire fait intervenir les pixels voisins suivant une loi non linéaire. Le filtre médian est un exemple classique de ces filtres. Comme les filtres de convolution, les filtres non-linéaires opèrent sur un voisinage donné.

Prewitt non-linéaire

Le Prewitt non-linéaire est un filtre passe-haut permettant d'extraire le contour des objets. Il met en évidence les variations d'intensité le long de l'axe vertical et horizontal. Chaque pixel se voit affecter une valeur égale à la valeur maximum des deux gradients verticaux et horizontaux de la convolution de Prewitt classique

Sobel non-linéaire

Le filtre de Sobel non-linéaire est un passe-haut destiné à extraire le contour extérieur des objets. Il met également en évidence les variations d'intensité le long de l'axe vertical et horizontal. Chaque pixel se voit affecter une valeur égale à la valeur maximum des deux gradients verticaux et horizontaux de la convolution de Prewitt classique

Contrairement au Prewitt, le filtre de Sobel assigne une valeur plus importante aux voisins horizontaux et verticaux du pixel central

Les deux filtres extraient les contours des objets. En raison des différences sur les noyaux utilisés, le Prewitt NL a tendance à extraire des contours incurvés lorsque le Sobel NL extrait des contours plus carrés. Ceci est notable sur les petits objets isolés.



Roberts

Le filtre de Roberts met en évidence les pixels dont l'intensité varie sur un axe diagonal.

Gradient non-linéaire

Le gradient non- linéaire extrait des contours non orientés horizontalement. Il met en

évidence les variations de l'axe vertical

Median

Le Median est un filtre passe-bas. Il affecte à chaque pixel la valeur médiane de ses voisins de façon à éliminer les points isolés. Contrairement aux lissages, ce filtre n'introduit pas de flou sur les contours des particules.

L'ensemble de ces filtres et bien d'autres se trouvent sur les principaux logiciels d'analyse d'images du commerce. On en trouve aussi dans Adobe Photoshop et vous avez la possibilité d'y créer vos propres filtres.

3 - MESURES SUR L'IMAGE

Les mesures sur l'image peuvent être de 2 types : des mesures morphologiques (distances, surfaces, nombre...) ou des mesures d'intensité de lumière. Si les premières peuvent avoir un caractère quantitatif absolu (après calibration), il n'en est pas de même pour les secondes.

Dans les 2 cas on est souvent amené à mettre en évidence les objets que l'on veut mesurer. Cette mise en évidence peut être facilitée par l'utilisation de filtres décrits ci-dessus mais se fait la plus part du temps par une opération de seuillage. C'est à dire que l'on va fixer un seuil au-dessus duquel les objets garderont leur valeur et en dessous duquel tous les pixels seront mis à 0.

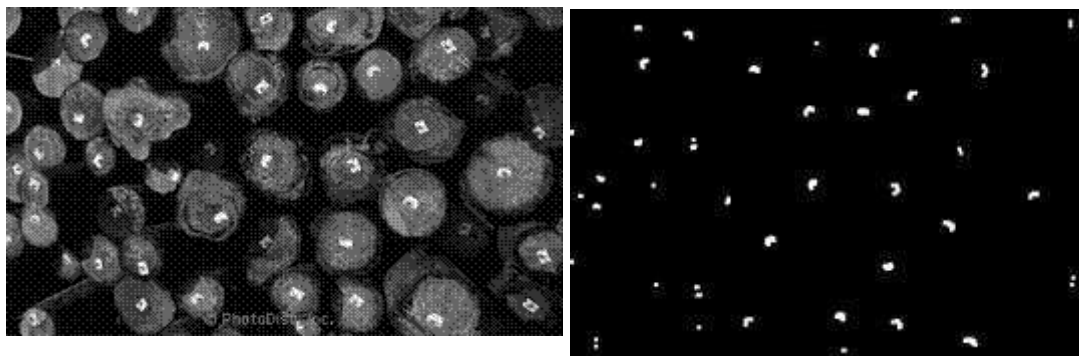
3 - 1 - Morphologie

On peut distinguer la morphologie en niveaux de gris (en général sur des images 8 bits) et la morphologie binaire sur des images préalablement seuillées.

3 - 1 - 1 Seuillage

Le seuillage consiste à séparer l'image en 2 groupes de pixels. Ceux qui ont une valeur supérieure au seuil et ceux qui ont une valeur inférieure. Ceci va permettre de mettre en évidence des objets, par exemples des zones cellulaires fluorescentes, qui ont une valeur supérieure au fond.

Image avant seuillage _____ Image après seuillage



3 - 1 - 2 Morphologie binaire

Elle permet de travailler sur des images préalablement seuillées. Les fonctions principales sont l'érosion et la dilation et leurs fonctions dérivées.

Erosion : élimine les pixels isolés sur le fond et érode le contour des objets

Dilatation : c'est l'inverse de l'érosion, la dilatation des objets correspond à une érosion du fond, élimine les trous isolés dans les objets et dilate les contours des objets.

On a aussi les fonctions dérivées :

Ouverture = érosion suivie d'une dilatation (supprime les petits objets et lisse les contours)

Fermeture = dilatation suivie d'une érosion (supprime les petits trous et lisse les contours)

Squelette = succession d'érosions jusqu'à ce que l'épaisseur de l'objet soit de 1 pixel.

Skiz (squelette influence zone) = succession d'érosions du fond qui produit les lignes médianes équidistantes des objets.

3 - 1 - 3 Morphologie en niveaux de gris

La morphologie en niveaux de gris s'applique à des images 8 bits. Les différentes fonctions permettent de jouer sur la forme des objets en dilatant les régions claires au détriment des zones sombres ou vice-versa. Elles permettent le lissage des contours ainsi que l'augmentation du contraste local des objets.

Ces fonctions sont basées sur des combinaisons d'Erosions et de Dilatations en niveaux de gris qui utilisent l'élément structurant.

Erosion

Une Erosion en niveaux de gris réduit l'intensité des pixels qui sont entourés de voisins de moindre intensité.

Dilatation

Une Dilatation en niveaux de gris a le même effet qu'une Erosion Si on considère que dilater les régions claires a le même effet que d'éroder les régions sombres. Cette fonction accroît la luminosité d'un pixel entouré de voisins plus lumineux.

3 - 2 - Densitométrie

On va mesurer l'intensité du signal pour chaque pixel, c'est à dire sa valeur dans la gamme des 256 niveaux de gris pour une image 8 bits.

Remarque :

Il n'est pas possible de faire de vraies mesures quantitatives (valeurs absolues) en fluorescence, même avec des étalons internes car il y a trop de facteurs variables non contrôlables (variations de température, variations de pH, vieillissement des préparations, oxydation, bleaching, etc...) Les mesures en densité de fluorescence sont essentiellement des mesures relatives au niveau d'une même série de préparations et encore faut-il s'entourer d'un minimum de précaution pour que toutes les acquisitions d'images se fassent dans les mêmes conditions.

Il est utile de faire un assez grand nombre de mesures pour avoir un résultat statistiquement représentatif.

La première étape est généralement un seuillage pour définir les limites des objets à mesurer. Le logiciel d'analyse compte ensuite ces objets et indique un certain nombre de paramètres pour ces objets et leur statistique. A partir de ces mesures on peut avoir une vision objective des différences entre les objets.