# Modélisation et étude de la formation de l'image d'un objet 3D translucide

*Nicolas DEY, Alain BOUCHER et Monique THONNAT*

I.N.R.I.A., BP 93, 06902 Sophia Antipolis cedex, France
{Nicolas.Dey, Alain.Boucher, Monique.Thonnat}@sophia.inria.fr

## 1. Introduction

Nos travaux s'inscrivent dans le cadre du projet européen ASTHMA qui vise à prévenir les allergies dues aux pollens. Les pollens sont des objets tridimensionnels microscopiques (de tailles variant de 15 à 60 micromètres), et surtout translucides. Lorsque l'on observe un objet 3D translucide de taille supérieure à la profondeur de champ du système optique, un phénomène de flou apparaît. Ce flou est gênant dans le cas d'objets opaques, mais plus encore pour des objets translucides : les zones défocalisées "polluent" l'image. Pour s'affranchir du flou, il est nécessaire de mieux comprendre le processus de formation de l'image d'un objet 3D translucide. C'est le thème de nos travaux : nous modélisons l'objet, le processus de formation de l'image, et surtout la Fonction de Transfert Optique (FTO) du microscope qui décrit le flou. A notre connaissance, les modèles existants traitent difficilement le cas translucide et le flou pour de fortes défocalisations. Pour le flou, nous proposons une modélisation gaussienne de la FTO ajustée au système optique. Cette modélisation est justifiée par rapport aux modèles théoriques existants. Le modèle final, basé sur un modèle gaussien, est uniquement dépendant des paramètres physiques du microscope. Les images données par le modèle global sont comparées aux images réelles.

## 2. Le modèle de formation de l'image

Nous travaillons avec un microscope optique muni d'un objectif 60x et 0.80 d'ouverture numérique. Les objets qui nous intéressent, les grains de pollen, ont des tailles comprises entre 20 et 60 $\mu$m. Ces objets sont éclairés par derrière en lumière blanche et incohérente. Cependant, nous travaillerons ici sous l'approximation d'une lumière monochromatique. Le pollen est plus difficile à représenter, car mise à part sa taille que nous mesurons assez facilement avec le microscope, nous n'avons pas de valeur pour ses indices de réfraction et ses coefficients d'absorption. Nous les estimons pour l'instant, mais nous pensons pouvoir les évaluer plus précisément en utilisant certains artefacts présents sur les séquences d'images. Le modèle présenté ici n'utilise donc que des estimations de ces paramètres. Dans cette section, nous proposons un modèle de formation de l'image. Pour ce faire, nous avons besoin de connaître ou de modéliser la réponse impulsionnelle du système imageur. Nous présentons d'abord le processus linéaire de formation de l'image que nous utilisons avant de proposer une modélisation la Fonction de Transfert Optique (FTO), équivalente à la réponse impulsionnelle à une transformée près.

### 2.1. La formation de l'image

On peut trouver dans [3] le principe général de formation de l'image et il existe des descriptions plus spécifiques pour des objets opaques [7] ou luminescents (fluorescence) [1] [2]. Le principe peut être résumé ainsi : chaque partie de l'objet éclairé est convoluée par un noyau 3-D correspondant à la réponse impulsionnelle du système imageur. A cause de la profondeur de champ finie d'un système optique réel, chaque partie de l'objet non focalisée est floue. On s'intéresse à un objet éclairé en lumière blanche incohérente. Si on fait abstraction de la source lumineuse elle-même, on a une répartition 3-D d'intensité lumineuse (incohérente) dans l'espace de l'objet, avant interaction avec l'instrument d'optique. Pour simuler cet espace objet, nous utilisons des coefficients liés à l'intensité lumineuse. Par exemple, les parties de l'objet qui absorbent le plus la lumière peuvent être représentées comme les parties les moins lumineuses. Nous faisons aussi l'hypothèse que l'absorption est un phénomène plus important que la réfraction.

Nous modélisons un objet ainsi : on le représente comme une suite de plans 2-D (Fig. 1 (a)), où chaque plan est une répartition d'intensité lumineuse. Nous plaçons une boîte virtuelle autour de l'objet de façon à traiter un cas d'énergie finie (Fig. 1 (b)). Si on suppose qu'il y a une énergie $E$ à l'intérieur de la boîte vide (pas d'objet à l'intérieur), on définit un pas d'échantillonnage pour chaque direction : le même pas $p_{xy}$ selon

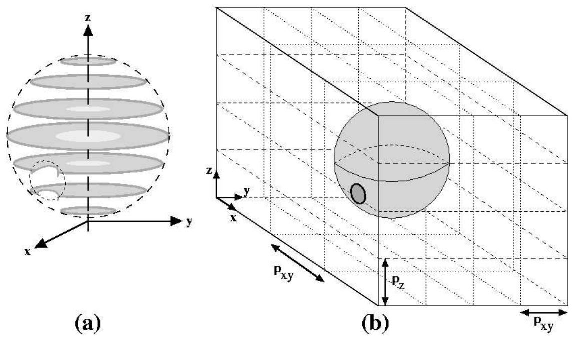


**Figure 1** (a) L'objet est modélisé comme une série discrète de plans 2-D lumineux. L'axe optique est l'axe **z**. (b) Volume 3-D discret contenant l'objet.

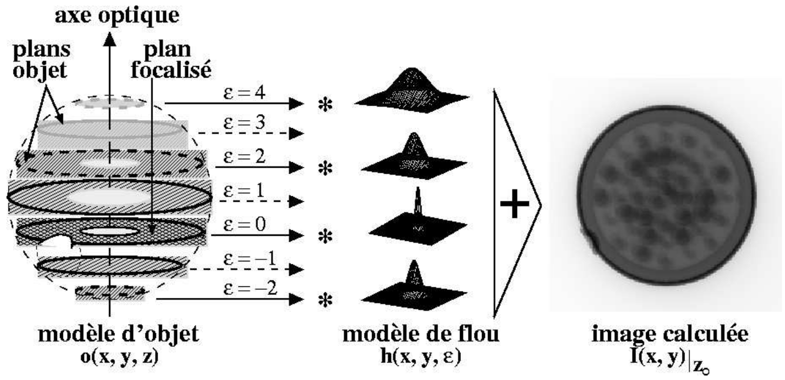


**Figure 2**: Pour calculer une image, nous appliquons notre modèle de flou 3-D à chaque plan-objet : le focus définit ε = 0, et alors chaque plan est convolué avec sa propre fonction de flou pour donner une imagette. L'étalement du modèle de flou est fonction de la défocalisation ε. L'addition de toutes ces imagettes nous donne l'image calculée.

les axes *x* et *y* (pixels carrés) et $p_z$ selon l'axe *z*. Cela conduit à un volume de *N* voxels (éléments de volume dans l'espace discret). Une énergie $E \cdot t / N$ est associée à chaque voxel, où le coefficient t varie entre 0 (pas de lumière émise) et 1 (pas d'absorption). On appelle $o(x, y, z)$ un point quelconque de cet espace-objet. En prenant l'axe optique selon l'axe *z*, nous avons les notations suivantes (voir Fig. 2) : un **plan-objet** est le plan $o(x, y, z_n)$ avec $z_n$ constant; si $z_0$ est le plan-objet focalisé, on appellera **focus** le plan $z_0$ ; n'importe quel autre plan $z_n$ est défocalisé de $\varepsilon = z_n - z_0$ ; une **imagette** $i_n(x, y)$ est l'image floue d'un plan-objet; finalement, l'**image calculée** est la somme de toutes les imagettes à un focus $z_0$.

Tout système optique introduit des effets de flou de par son ouverture finie qui implique une profondeur de champ finie (voir [8] [9] [11]). Pour un unique plan-objet défocalisé de ε, l'imagette correspondante est le résultat de sa convolution par la fonction de flou *h* : $i(x, y) = o(x, y, z_n) * h(x, y, \varepsilon)$. Si on généralise [2] à un objet lumineux épais sous les hypothèses qu'il est translucide et éclairé en lumière incohérente, chaque partie de cet objet va contribuer à la formation de l'image. L'image finale $I(x, y)$ est donc l'addition des imagettes, dues à chaque plan-objet de l'objet. Nous avons :

$$\textbf{Equation 1: } I(x, y)\Big|_{z_0} = \sum_{z_n \in bjet} o(x, y, z_n) * h(x, y, \varepsilon)$$

La fonction de flou *h* est une fonction 3-D qui dépend de la défocalisation ε. Plus ε est grand et plus le flou est important. Nous proposons donc l'algorithme représenté sur la Fig. 2 pour calculer une image. D'abord choisir un focus à l'intérieur de l'objet pour fixer la valeur ε = 0. Ensuite, convoluer les plans-objet défocalisés avec leur fonction de flou respective pour avoir toutes les imagettes. Enfin, additionner toute ces imagettes pour obtenir une image finale. Pour étudier un objet épais, une série d'images peut être calculée (voir section 3). Dans la prochaine section, nous présentons notre modèle de flou.

## 2.2. Le modèle de Fonction de Transfert Optique

La fonction *h* décrite dans la section précédante peut aussi être étudiée dans le domaine des fréquences spatiales. Dans ce cas, nous représentons la formation d'une image par la multiplication de la transformée

de Fourier de la réponse impulsionnelle $h$ avec la transformée de Fourier du plan-objet. Cette fonction est la fonction de transfert optique (FTO) du système, et c'est par elle que le flou est introduit.
Nous nous proposons de modéliser la FTO du microscope. Nous travaillons avec un objet translucide, donc nous avons besoin d'une bonne approximation de la fonction 3-D totale. Hopkins [5] donne l'expression analytique exacte de la FTO d'un système optique avec une ouverture circulaire. Cette expression est simplifiée par Stokseth [10], qui propose une bonne approximation de la FTO, qui reste valable pour de fortes défocalisations. De plus, il montre que la FTO est asymétrique avec le sens de la défocalisation. Dans [4] et [6], les auteurs appliquent cette expression à un microscope optique avec une longueur de tube finie. L'expression de Stokseth est donnée par Eq. 2 :

**Equation 2 :** $$H(q,\varepsilon)=\left(1-1.38\left(\frac{q}{q_0}\right)+0.0304\left(\frac{q}{q_0}\right)^2+0.344\left(\frac{q}{q_0}\right)^3\right)J_{inc}\left(4kw(\varepsilon)\left(1-\frac{q}{f_c}\right)\frac{q}{f_c}\right)$$

où $q=\sqrt{x^2+y^2}$ , $J_{inc}=2\frac{J_1(x)}{x}$ avec $J_1$ le premier ordre de la fonction de Bessel, $f_c=\frac{2A}{\lambda d_f}$ est la fréquence de coupure et $k=2\pi/\lambda$. Avec $\alpha=\arctan(A/d_i)$ et $\Delta z(\varepsilon)=d_i-\frac{f(d_f+\varepsilon)}{d_f+\varepsilon-f}$ pour un microscope [4], Stokseth note $w(\varepsilon)=-d_i+\Delta z(\varepsilon)(1-\cos\alpha)+\sqrt{d_i^{\,2}+\Delta z(\varepsilon)(\cos^2\alpha-1)}$ la différence de marche due à la défocalisation.
Les avantages d'une telle formulation sont que nous avons juste besoin de 5 paramètres physiques du système : l'ouverture numérique (**ON**), le grossissement (**G**), la longueur d'onde de la lumière utilisée ($\lambda$), la longueur du tube optique ($\mathbf{d_i}$) et l'indice de réfraction du milieu entre le spécimen et le microscope (**n**). De plus, cette expression reste toujours valable pour de fortes défocalisations [1].
En vision par ordinateur, les gaussiennes sont souvent utilisées pour simuler la FTO ou la réponse impulsionnelle d'un microscope optique [7]. Pour cette raison, nous avons choisi de comparer les deux modèles. Nous proposons un modèle gaussien de FTO dérivé cette formulation (Eq. 2). L'expression générale du développement en séries de Taylor en 0 de la fonction de Bessel $J_n(x)$ d'ordre n est donnée par $J_n(x)=\sum_{m=0}^{\infty}\frac{(-1)^m(x/2)^{n+2m}}{m!(m+n)!}$. Pour un $J_{inc}=2\frac{J_1(x)}{x}$, cela donne $J_{inc}=1-\frac{x^2}{8}+\frac{x^4}{192}-\frac{x^6}{9216}+\ldots$.
L'expression générale du développement en séries de Taylor pour une gaussienne $G(x)=e^{-\alpha^2x^2}$ est $G(x)=\sum_{m=0}^{\infty}\frac{(-1)^m(\alpha x)^{2m}}{m!}$ ce qui donne $G(x)=1-\frac{x^2}{8}+\frac{x^4}{64}-\frac{x^6}{512}+\ldots$ si $\alpha^2=\frac{1}{8}$. Ces développements sont similaires en ce qui concerne l'alternance du signe et les puissances des termes, mais les dénominateurs dans la décomposition de Bessel augmentent plus vite que dans le cas de la gaussienne. $J_{inc}(x)$ a des valeurs négatives alors que la gaussienne est définie positive. On approche $J_{inc}(x)$ par $\exp(-x^2/8)$.

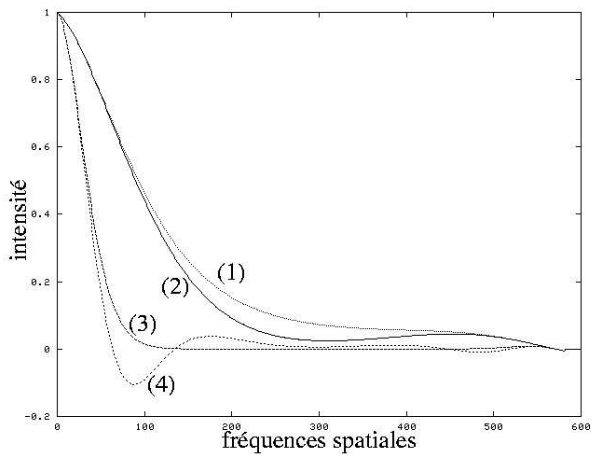


**Figure 3:** La FTO de Stokseth pour des défocalisations de 1 µm (2) et de 3 µm (4), ainsi que notre FTO, approximée par une gaussienne, pour 1 µm (1) et 3 µm (3) de défocalisation. Remarquez que l'on ne peut pas modéliser les parties négatives de la vraie FTO avec une gaussienne.

Sur la Fig. 3, on a représenté la FTO de Stokseth et notre approximation pour 2 valeurs de défocalisation. Nous avons fait tous ces développements pour $x << 1$, mais sachant que ces fonctions décroissent toutes les deux vers 0, l'erreur pour les grandes valeurs de x n'est pas divergente.

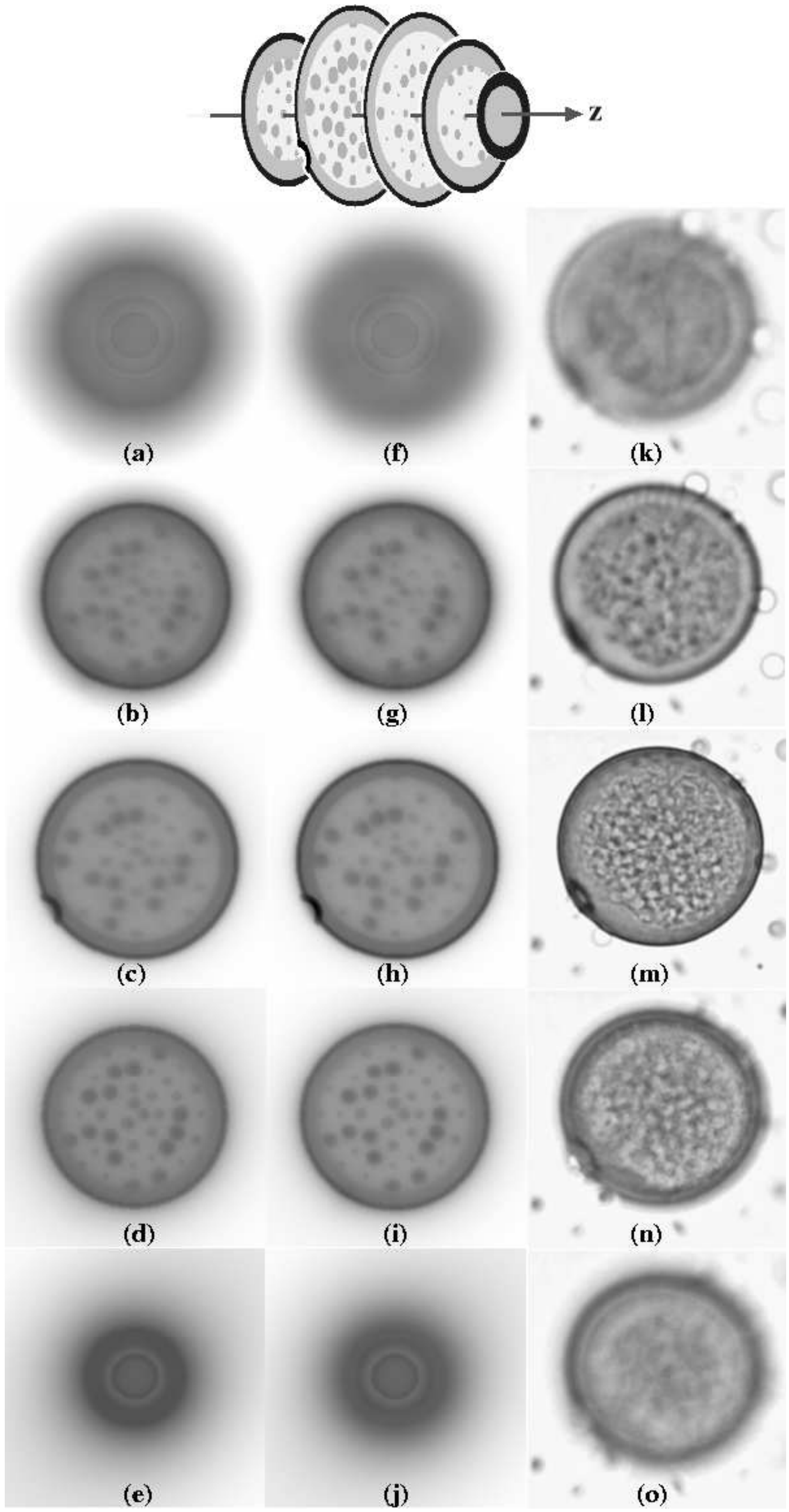


**Figure 4 :** On a représenté en haut de la figure, cinq plans-objet du pollen modélisé. Ce sont des plans-objet nets, avant qu'on ne leur applique notre modèle de formation de l'image. Dans la colonne de gauche, les 5 images (a)-(e) sont calculées à l'aide de la FTO de Stokseth, tandis que dans la colonne centrale, les images (f)-(j) sont obtenues avec l'approximation gaussienne de la FTO de Stokseth. (k)-(o) représentent une série d'un grain de pollen réel : un *Poaceae*. Dans les 3 colonnes, toutes les images correspondent à des focus à l'intérieur du grain de pollen.

# 3. Résultats et discussion

Nous présentons les résultats pour des focus correspondants à plusieurs plans (x, y) à l'intérieur de l'objet. Les plans-objet du grain de pollen qui ont été modélisés sont représentés dans la première colonne de la Fig. 4. Cet objet est une sphère proche de l'objet représenté sur la Fig. 1, avec un rayon de 20 µm et quelques structures internes visibles (points sombres). Un pore (une sorte de cratère naturel à la surface du grain) peut être vu sur la surface. Nous modélisons l'exine (la carapace du pollen), le cytoplasme (l'intérieur du grain). Cet objet est utilisé comme donnée initiale pour le modèle de formation de l'image présenté en section 2. Les données en sortie (images calculées) sont représentées sur la seconde colonne de la Fig. 4. Elles sont à comparer avec la troisième colonne, qui représente les images floues réelles d'un grain de pollen réel.

## 3.1. Pour une séquence d'images

Etudions d'abord la séquence réelle de la Fig. 4 (colonne de droite) : on remarque que les images extrêmes (k) et (o) sont les plus floues, et que le flou décroît lorsqu'on focalise vers le centre du grain. Comme dit en section 2.2, l'image centrale (m) est celle qui a ses contours les moins flous.
Les séquences calculées avec la FTO de Stokseth (colonne de droite) et son approximation gaussiennne (colonne du milieu) sont très semblables entre elles. Elles ont chacune une image centrale ((c) et (h)) qui a ses contours les moins flous par rapports aux autres images de chaque séquence, et des images extrêmes ((a) et (e) pour la première et (f) et (j) pour la seconde) qui sont les plus floues de la séquence. Le modèle est satisfaisant, bien que l'on remarque une disparition trop rapide du pore sur la séquence calculée. On peut aussi remarquer que tout comme sur la séquence réelle, le flou dans les séquences d'images calculées est asymétrique. La taille du pollen de la séquence réelle est presque constante en fonction de la défocalisation ; il en est de même sur les séquences calculées, même s'il y a une sous-estimation du flou sur les coupes extrêmes (e) et (j) sur les 2 premières séquences. L'approximation gaussienne qui a été faite à partir de la FTO de Stokseth est satisfaisante.

## 3.2. Sur les vues de côté

Maintenant, nous présentons les résultats de notre modèle de formation de l'image pour des vues latérales aussi appelées plans (x, z). On a une série de 100 images d'un grain de pollen, prises avec un pas croissant le long de l'axe z. Chaque image a une définition de 200x200 en (x, y). Si on les empile numériquement, on obtient un volume 200x200x100. Maintenant, si on coupe ce volume perpendiculairement à l'axe y, on obtient une série d'images 200x100 dans le plan (x, z). Nous avons comparé les résultats d'une seule de ces images latérales (celle correspondant au milieu du grain de pollen). La Fig. 5 (a) montre l'image réelle, (b) l'image calculée avec le modèle de Stokseth et (c) avec le modèle de la gaussienne. Sur l'image réelle, le grain de pollen est très difficile à localiser si on ne le repère pas minutieusement. L'image apparaît être légèrement asymétrique et très proche d'un cylindre.

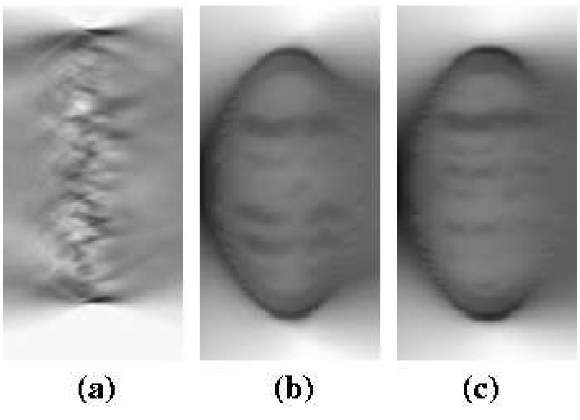


**Figure 5 :** Images latérales (dans le plan (x, z)) de dimensions 200x100 µm. (a) Image réelle d'un grain de pollen de Poaceae. (b) Images calculées en utilisant le modèle de Stokseth et (c) le modèle gaussien. Il faut bien remarquer que ces images ne correspondent pas à la réalité physique, ce ne sont que des représentations numériques.

On remarque aussi qu'il y a des zones plus sombres au sommet et à la base du grain de pollen. Sur les images calculées, deux cônes de flous asymétriques apparaissent à l'extérieur du grain. Le grain de pollen semble être un ellipsoïde, mais ses contours sont assez flous du côté droit (images (b) et (c)). Comme sur le grain réel, il y a les mêmes zones sombres en haut et en bas des grains de pollen calculés. Celles-ci sont simplement plus courbées qu'en réalité. On voit aussi les contributions du matériel interne du grain de pollen : il apparaît plus sur l'image réelle que sur les images calculées. Sur toutes les images, on voit l'asymétrie du flou : le côté gauche des Fig. 5 (b) et (c) sont plus sombres que le côté droit. Quand on regarde les coupes XZ, les deux modélisations sont équivalentes entre elles, et l'asymétrie présente dans chaque modèle de flou semble surestimée.

# 4. Conclusion

Nous avons développé un modèle de flou pour les objets translucides 3-D observés avec un microscope optique. Ce modèle est facile à adapter à un microscope optique car il ne dépend que de 5 paramètres physiques, faciles à obtenir (comme le grossissement du microscope par exemple). Nous l'avons validé à l'aide de grains de pollen (voir la section 3), mais il reste général pour un objet microscopique translucide 3-D quelconque. Ce modèle donne de bons résultats, mais nous projetons de l'améliorer en prenant en compte la réfraction. De plus, le modèle de formation de l'image utilisé avec l'approximation gaussienne, donne des résultats très proches de ceux obtenus à l'aide du modèle de Stokseth.

Le modèle d'objet doit être amélioré pour produire des images le plus proche possible de la réalité. Pour le moment, les formes du pollen et du pore sont des sphères alors qu'elles devraient être une sorte d'ellipsoïde. Nous avons aussi besoin d'améliorer le modèle de structures à l'intérieur du grain de pollen (cytoplasme). Une fois que le modèle d'objet sera amélioré, nous aurons probablement aussi à améliorer notre modèle de formation de l'image. Pour le moment nous avons traité l'absorption dans un objet translucide comme étant linéaire en première approximation. Nous sommes donc en mesure d'utiliser la théorie des systèmes linéaires. Cette approximation donne de bons résultats bien qu'en réalité, l'absorption d'un objet soit non linéaire. Les points blancs à l'intérieur du pollen sur les images réelles de la Fig. 4 sont probablement dues à des phénomènes de réfraction. Notre première approximation donne donc de bons résultats mais nécessiterait de nombreuses améliorations pour être encore plus proche de la réalité.

## Bibliographie


**1.** D.A. Agard. Optical sectionning microscopy. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 13:191-219, 1984.

**2.** D.A. Agard, Y. Hiraoka, P. Shaw, and J.W. Sedat. Fluorescence microscopy in three dimensions. *Methods Cell Biol.*, 30:353-377, 1989.

**3.** M. Born and E. Wolf. *Principles of Optics*. Pergamon Press, 1965.

**4.** K.R. Castleman. *Digital Image Processing*. Prentice Hall, 1996.

**5.** H.H. Hopkins. The frequency response of a defocused optical system. *Proc. of the Royal Society of London Ser. A*, pages 91-103, February 1955.

**6.** J.W. Sedat J.R. Swedlow and D.A. Agard. Deconvolution in optical microscopy. In *Deconvolution of Images and Spectra, 2nd edition*, pages 284-309. P.A. Janson, ed., 1997.

**7.** S.K. Nayar and Y. Nakagawa. Shape from focus. *IEEE Trans. Patt. Anal. Mach. Int.*, 16(8):824-831, August 1994.

**8.** A.P. Pentland. A new sense for depth of field. *IEEE Trans. Patt. Anal. Mach. Int.*, 9(4):523-531, July 1987.

**9.** C.J.R. Sheppard. Depth of field in optical microscopy. *Journal of Microscopy*, 149:73-75, January 1988. Short Technical Note.

**10.** P.A. Stokseth. Proprerties of a defocused optical system. *Journal of Optic Society of America*, 59(10):1314-1321, October 1969.

**11.** L.T. Young, R. Zagers, L.J. van Vliet, J.Mullikin, F. Boddeke, and H. Netten. Depth-of-focus in microscopy. In *Scandinavian Conference on Image Analysis*, volume 1, pages 493-498, 1993.