



**HAL**  
open science

# Etude de la formation de l'image d'un objet microscopique 3D translucide - Application à la microscopie

Nicolas Dey

► **To cite this version:**

Nicolas Dey. Etude de la formation de l'image d'un objet microscopique 3D translucide - Application à la microscopie. Interface homme-machine [cs.HC]. Université du Maine, 2002. Français. NNT : . tel-00003309

**HAL Id: tel-00003309**

**<https://theses.hal.science/tel-00003309>**

Submitted on 7 Sep 2003

**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.

**UNIVERSITE DE NICE - SOPHIA ANTIPOLIS  
SCIENCES POUR L'INGENIEUR**

**THESE**

pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NICE - SOPHIA ANTIPOLIS**

**Discipline : INFORMATIQUE**

Présentée et soutenue publiquement  
par

**Nicolas DEY**

Le 26 novembre 2002

---

**ETUDE DE LA FORMATION DE L'IMAGE D'UN  
OBJET  
MICROSCOPIQUE 3D TRANSLUCIDE  
Application à la microscopie optique.**

---

Composition du jury :

M. Michel BARLAUD	(Professeur)	Président
M. René CAUBET	(Professeur)	Rapporteur
M. Jean-Marc CHASSERY	(D.R.1 CNRS)	Rapporteur
M. Pierre BONTON	(Professeur)	Examineur
M. Jean-Denis SYLVAIN	(Professeur)	Examineur
Mme. Monique THONNAT	(D.R. INRIA)	Directrice de thèse
M. Antoine MANGIN	(Docteur)	Membre Invité

Thèse préparée au sein du projet ORION de l'INRIA Sophia Antipolis



Je dédicace cette thèse à ma famille et à tous mes amis, d'ici et d'ailleurs, que je ne pourrais pas citer tellement ils sont nombreux...

# Remerciements

**J**E remercie Mme Monique Thonnat, Directrice de recherches à l'INRIA Sophia Antipolis, directrice de l'équipe ORION, qui m'a accueilli dans son équipe et qui a encadré mes travaux durant ces trois années de thèse.

Je remercie M. Alain Boucher pour toute l'aide qu'il m'a apportée depuis mon stage de DEA jusqu'à la fin de ma thèse, tant au niveau des discussions qu'aux niveau du développement du code.

Je remercie MM. René Caubet (IRIT), Jean-Marc Chassery (CNRS) pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi que Michel Barlaud (I3S), Pierre Bonton (LASMEA), Antoine Mangin (ACRI S.A.) et Jean-Denis Sylvain (CNRS) qui ont bien voulu participer au jury de cette thèse.

Je remercie tout particulièrement le Semir et les services généraux, car sans la qualité de leurs services, cette Thèse n'aurait pu être réalisée dans de si bonnes conditions.

De nombreux chercheurs que j'ai contactés m'ont aidé très aimablement dans mes travaux, et je pense particulièrement à M. Jean-Denis Sylvain, du Laboratoire de Thermodynamique Expérimentale de Marseille, et à M. Antoine Mangin, de la société ACRI S.A.. MM. Julien Borgnino, François Martin, Claude Aime, Henri Lanteri et Eric Aristidi du Laboratoire d'Astrophysique de l'Université de Nice m'ont aussi été d'un grand secours.

Je remercie Pablo Hidalgo (Université de Cordoue) et Jordina Belmonte (Université Autonome de Barcelone) pour leur aide précieuse sur les pollens.

En France, je tiens tout naturellement à remercier Pierre Bonton et Régis Tomczak du LASMEA, qui m'ont accueilli plusieurs fois dans leur laboratoire, et sans les conseils et le matériel de qui je n'aurait pu réaliser toute ces captures d'images.

Parmi les chercheurs domiciliés plus loin dans le monde, et qui ont bien voulu m'accorder un peu de leur temps pour répondre à mes questions, je tiens à remercier Shree K. Nayar, Keneth R. Castleman, Farhana Kagalwala et Yoav F. Schechner.

Je remercie aussi la plupart des gens de l'INRIA Sophia que j'ai fréquenté un jour ou l'autre, avec en particulier, les anciens et les nouveaux d'ORION, et qui ont contribué à faire de cette thèse une expérience inoubliable : Agnès, Alain, Alberto, Binh, Bob, Cathy, Céline, François, Fred, Nathanaël, Nicolas, Magali, Sabine, Thinh... et à tous ceux que j'oublie!

Et puis bien-sûr, je ne peux pas oublier : Stéphanie, Max & Krobbe, qui m'ont le plus subi... Le Bafien (héhé!), OLR, la Marcotte, Semi, Ludo, P-chu et Guillaume pour le groupe des joyeux bourino-rando-grimpeurs ; Franck, Popo & Karine, Ingrid, Belli, Coco, MC, CarineC, Julia, Hanane, Audrey... pour leur présence et leur bonne humeur, et tous les bons moments passés avec eux. Et en vrac, n'oublions pas la meute des Epidauriens, nombreux et soudés, mais toujours sympathiques! Tiens? Et j'allais oublier Maomi!

**132. Loupes composées et microscopes.**

— Quand on réunit plusieurs lentilles suivant certaines règles, on obtient des grossissements plus forts, allant jusqu'à dix ou douze : ce sont là des *loupes composées*. Enfin, en réunissant les lentilles d'une manière plus compliquée encore, on a des **microscopes** (fig. 37) (de deux mots grecs : *micros*, petit; *scopain*, regarder). On distingue un microscope d'avec une loupe par ceci, que la loupe fait voir les objets *droits*, tandis que le microscope les montre *à l'envers*.

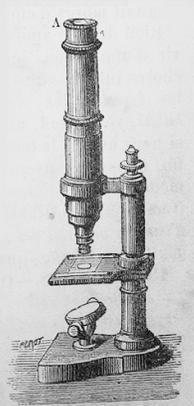


Fig. 37. — Les microscopes grossissent encore plus.

On obtient avec les microscopes des grossissements extraordinaires : 100 fois, 200 fois, 4000 fois, même. Je vois que je ne vous étonne pas, parce qu'à la foire dernière, un charlatan annonçait qu'il montrait les objets un million\* de fois plus gros qu'ils ne sont. Mais c'est la manière de compter qui est tout. Si je vous dis que ma loupe grossit 10 fois, je veux dire qu'un objet de un millimètre de long paraît avoir un centimètre. Les charlatans comptent autrement. Comme l'objet est grossi à la fois en longueur, en largeur et en épaisseur, ils multiplient les trois grossissements; ils diraient par conséquent que ma loupe grandit  $10 \times 10 \times 10 = 1000$  fois. A ce compte, le million de celui de l'autre jour devient tout simplement 100 fois. Mais cela fait moins d'effet sur les ignorants.

Rien de plus amusant et de plus instructif que de se servir d'une loupe. Je ne saurais vous dire la quantité de choses intéressantes que vous pouvez voir en examinant les *insectes*, les *plantes*, tout ce qui vous entoure, vos *habits*, votre *peau*, avec une loupe de quarante sous! Ah! si nous avions le temps de nous arrêter sur tout cela! Enfin, nous en causerons un peu l'année prochaine.

L'enseignement de l'optique, avec en particulier le microscope. Extrait de l'ouvrage scolaire : P. Bert - *La Deuxième année d'enseignement scientifique*. - 1890, pages 159-160. - Paris.



# Table des matières

<b>1</b>	<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
1.1	Introduction générale . . . . .	1
1.2	Ce que l'on veut faire . . . . .	2
1.3	Plan . . . . .	2
<b>2</b>	<b>La théorie de la formation de l'image</b>	<b>5</b>
2.1	La formation de l'image en optique géométrique . . . . .	6
2.1.1	Les bases de l'optique géométrique . . . . .	6
2.1.1.1	Rayons lumineux et réfraction . . . . .	6
2.1.1.2	Lentilles minces et système optique . . . . .	7
2.1.2	Formation de l'image d'un objet 2D . . . . .	8
2.1.3	Formation de l'image d'un objet 3D . . . . .	10
2.1.3.1	Pour un objet opaque . . . . .	10
2.1.3.2	Pour un objet translucide . . . . .	12
2.1.3.3	La formation de l'image sur un capteur est une projection .	13
2.1.4	Espace continu et profondeur de champ . . . . .	14
2.2	Approche ondulatoire de la formation de l'image . . . . .	15
2.2.1	Réponse Impulsionnelle (PSF) et convolution . . . . .	16
2.2.1.1	La convolution . . . . .	16
2.2.1.2	Propriétés . . . . .	16
2.2.1.3	La distribution de Dirac . . . . .	17
2.2.2	Formation de l'image d'un objet 2D . . . . .	17
2.2.3	Formation de l'image d'un objet 3D . . . . .	18
2.3	Généralités sur les ondes en optique . . . . .	19
2.3.1	Principe d'Huygens-Fresnel . . . . .	19
2.3.2	Ondes planes et ondes sphériques . . . . .	19
2.3.3	Eclairage incohérent . . . . .	20
2.4	Optique de Fourier . . . . .	22
2.4.1	Transformation de Fourier . . . . .	22
2.4.1.1	Définition . . . . .	23

2.4.1.2	Propriétés . . . . .	23
2.4.1.3	Fonctions paires/impaires . . . . .	24
2.4.1.4	Energie . . . . .	24
2.4.2	Applications à l'optique . . . . .	24
2.4.2.1	La PSF et l'OTF . . . . .	25
2.4.2.2	Calcul de l'OTF d'une pupille circulaire . . . . .	27
2.4.2.3	Note sur le grossissement . . . . .	28
2.5	Le microscope comme système optique . . . . .	28
2.5.1	La fonction de transfert . . . . .	28
2.5.2	Différents types de microscopie optique . . . . .	29
2.5.2.1	Microscope optique conventionnel . . . . .	29
2.5.2.2	Microscope optique en fluorescence . . . . .	29
2.5.2.3	Microscope confocal . . . . .	30
2.5.2.4	Microscope à contraste interférentiel (Normaski) . . . . .	31
2.5.3	Conclusion . . . . .	32
2.6	Les mesures effectuées sur le microscope . . . . .	33
2.6.1	Le microscope optique . . . . .	33
2.6.2	Valeurs numériques relatives au microscope . . . . .	33
2.6.2.1	Dimensions caractéristiques du microscope . . . . .	33
2.6.2.2	L'objectif . . . . .	34
2.6.2.3	Profondeur de champ . . . . .	35
2.6.3	La source lumineuse . . . . .	35
2.7	Conclusion . . . . .	36
<b>3</b>	<b>Etat de l'Art</b>	<b>37</b>
3.1	La profondeur de champ . . . . .	37
3.1.1	Les bases de la profondeur de champ . . . . .	38
3.1.2	Augmentation de la profondeur de champ . . . . .	39
3.1.2.1	Les systèmes dédiés . . . . .	39
3.1.2.2	Les méthodes de traitements numériques . . . . .	40
3.1.3	Conclusion . . . . .	41
3.2	Modélisation du système optique . . . . .	41
3.2.1	Modélisation du flou . . . . .	41
3.2.1.1	La modélisation la plus simple . . . . .	42
3.2.1.2	Le flou gaussien . . . . .	42
3.2.1.3	Les modèles plus appliqués à l'optique ondulatoire . . . . .	43
3.2.2	OTF d'un microscope . . . . .	43
3.2.2.1	Modélisation originale de l'OTF d'un microscope . . . . .	44
3.2.2.2	Les améliorations à la formulation originale . . . . .	45

3.2.2.3	Pour des objets loin de l'axe optique . . . . .	46
3.2.2.4	En lumière blanche . . . . .	47
3.2.2.5	Conclusion . . . . .	47
3.2.3	Conclusion . . . . .	47
3.3	La formation de l'image . . . . .	48
3.3.1	Approche géométrique . . . . .	48
3.3.1.1	Le lancer de rayon . . . . .	48
3.3.1.2	Le <i>photon mapping</i> . . . . .	50
3.3.2	Approche ondulatoire . . . . .	50
3.3.3	Conclusion . . . . .	51
3.4	Reconnaissance et reconstruction . . . . .	52
3.4.1	Récupérer des informations sur un objet 3D . . . . .	52
3.4.1.1	<i>Shape from Focus / Shape from Shading</i> . . . . .	52
3.4.1.2	<i>Depth from Focus / Defocus</i> . . . . .	53
3.4.1.3	Méthodes actives . . . . .	55
3.4.1.4	Conclusion . . . . .	55
3.4.2	Focalisation automatique de microscopes . . . . .	55
3.4.3	Reconnaissance et Classification . . . . .	57
3.4.3.1	Microscopie en fluorescence . . . . .	57
3.4.3.2	Microscopie en lumière blanche . . . . .	57
3.4.4	La déconvolution . . . . .	59
3.4.4.1	Correction de la focalisation . . . . .	59
3.4.4.2	Reconstruction et restauration d'un objet microscopique 3D . . . . .	60
3.4.5	Conclusion . . . . .	63
3.5	Conclusion . . . . .	64
<b>4</b>	<b>Le modèle proposé</b> . . . . .	<b>65</b>
4.1	Les différents espaces abstraits . . . . .	67
4.1.1	Présentation des espaces abstraits . . . . .	67
4.1.1.1	L'espace objet physique . . . . .	69
4.1.1.2	L'espace objet éclairé . . . . .	69
4.1.1.3	L'espace image . . . . .	70
4.1.1.4	Le terme d'observation . . . . .	70
4.1.2	Les interactions lumière-matière . . . . .	72
4.1.3	Conclusion . . . . .	74
4.2	La modélisation de l'objet . . . . .	74
4.2.1	Représentation théorique d'un objet quelconque . . . . .	76
4.2.2	Discretisation . . . . .	77

4.2.3	Conclusion et perspectives . . . . .	77
4.3	La modélisation de l'espace objet éclairé . . . . .	77
4.3.1	La source de lumière . . . . .	79
4.3.1.1	Lumière monochromatique . . . . .	79
4.3.2	La phase propagative de la lumière . . . . .	80
4.3.2.1	Un nouveau moteur de lancer de rayons . . . . .	80
4.3.2.2	La source lumineuse . . . . .	81
4.3.2.3	Détails sur l'implémentation de la source lumineuse . . . . .	83
4.3.2.4	Les interactions entre lumière et matière . . . . .	87
4.3.3	Simulation de la diffusion . . . . .	90
4.3.4	Conclusion et perspectives . . . . .	90
4.4	Troisième étape : la modélisation du système optique . . . . .	91
4.4.1	Présentation . . . . .	92
4.4.2	Le modèle de flou . . . . .	93
4.4.2.1	Le modèle de Stokseth . . . . .	93
4.4.2.2	Le modèle gaussien . . . . .	94
4.4.3	Le modèle proposé . . . . .	96
4.4.3.1	L'espace image 3D . . . . .	99
4.4.4	Détails sur l'implémentation . . . . .	99
4.4.4.1	Le grossissement . . . . .	99
4.4.4.2	Le calcul des masques de convolution . . . . .	100
4.4.4.3	La convolution . . . . .	100
4.4.4.4	Les imagerie particulières . . . . .	102
4.4.4.5	Effets de bord . . . . .	103
4.4.5	La visualisation et la saturation du capteur . . . . .	104
4.4.6	Conclusion . . . . .	105
4.5	Conclusion . . . . .	105
<b>5</b>	<b>Résultats</b>	<b>107</b>
5.1	Matériel et méthodes . . . . .	107
5.1.1	Préparation des lames microscopiques . . . . .	108
5.1.1.1	Préparation des grains de pollens . . . . .	108
5.1.1.2	Microbilles . . . . .	109
5.1.1.3	Les autres objets microscopiques . . . . .	111
5.1.2	Acquisition image . . . . .	111
5.1.2.1	Le microscope . . . . .	111
5.1.2.2	La caméra CCD . . . . .	112
5.1.2.3	La table à déplacements micrométriques . . . . .	112
5.1.3	Normalisation des distances de l'espace image réel . . . . .	112

5.2	Normalisation de la lumière . . . . .	113
5.2.1	Détermination de l'angle maximal d'éclairage . . . . .	113
5.2.2	Calcul de l'intensité moyenne . . . . .	115
5.3	Etude d'un objet 2D: diaphragme . . . . .	116
5.3.1	Vocabulaire de description des résultats . . . . .	116
5.3.2	Calculs des images . . . . .	116
5.3.3	Commentaires sur les résultats . . . . .	116
5.3.4	Conclusion . . . . .	118
5.4	Etude d'un objet 3D opaque . . . . .	118
5.4.1	Calculs des images . . . . .	118
5.4.2	Commentaires sur les résultats . . . . .	119
5.4.3	Conclusion . . . . .	119
5.5	Etude d'objets 3D: micro-billes de verre . . . . .	122
5.5.1	Air verre - « grosse » bille . . . . .	122
5.5.2	Air Verre - petite bille . . . . .	124
5.5.3	Fuchsine verre . . . . .	127
5.5.4	Conclusion . . . . .	128
5.6	Modélisation d'objets complexes 3D . . . . .	129
5.6.1	Modélisation sans réfraction . . . . .	129
5.6.1.1	Pour une séquence d'images . . . . .	130
5.6.1.2	Sur les vues de côté . . . . .	132
5.6.1.3	Conclusion . . . . .	133
5.6.2	Avec la réfraction . . . . .	133
5.6.2.1	Présentation de l'objet . . . . .	133
5.6.2.2	Pour une séquence d'images . . . . .	134
5.6.2.3	Sur les vues de côté . . . . .	134
5.6.2.4	Conclusion . . . . .	136
5.7	Conclusion . . . . .	136
<b>6</b>	<b>Conclusion générale et perspectives</b>	<b>139</b>
6.1	Conclusion générale . . . . .	139
6.2	Perspectives . . . . .	140
6.2.1	La modélisation d'objets complexes: . . . . .	141
6.2.2	Modéliser d'autres phénomènes physiques . . . . .	141
6.2.2.1	Modélisation de la diffusion . . . . .	141
6.2.2.2	Prise en compte de la diffraction . . . . .	143
6.2.3	Mesure de la PSF . . . . .	143
6.2.4	Le système optique . . . . .	144
6.2.5	Réfraction inverse . . . . .	144

<b>A Les grains de pollen comme application</b>	<b>147</b>
<b>B Fichiers de configuration</b>	<b>153</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>167</b>

# Chapitre 1

## Introduction générale

CE chapitre d'introduction commence par une partie qui va tout d'abord exposer le cadre général de notre travail (partie 1.1) ; ensuite, la partie 1.2 expose plus en détails ce que nous nous proposons de réaliser, en précisant les buts que nous nous sommes fixés et les limitations que nous nous sommes imposées. La partie 1.3 quant à elle présentera la structure adoptée dans cet ouvrage.

### 1.1 Introduction générale

Bien que cette thèse soit comprise dans une thématique de reconnaissance, il nous faut préciser que nous avons travaillé sur la modélisation de phénomènes physiques, et non sur des procédures de reconnaissance d'images.

Les acteurs qui entrent en jeu sont des plus courants : nous avons une scène 3D d'un côté et un système optique de l'autre. Le système optique nous permet d'avoir une représentation de la scène 3D en produisant une image 2D. Et c'est là que les problèmes commencent car il y a une projection de la scène 3D sur une image 2D. En perdant une dimension, des perturbations apparaissent sur l'image à travers le **flou**. Le flou dépend directement de la profondeur de champ<sup>1</sup> de l'instrument.

Lorsque l'on travaille avec des objets microscopiques, cette profondeur de champ se trouve réduite et le flou devient prédominant. La plupart des objets de la scène que l'on observe sont pour la plupart complètement flous (voire invisibles sur l'image), ou seulement en partie flous.

Dans le cas d'un objet translucide<sup>2</sup>, la réfraction intervient. Un objet translucide qui est traversé par de la lumière provoque la réfraction de celle-ci, c'est-à-dire une déviation des rayons lumineux. Cela crée des zones de forte intensité et des zones de plus faible intensité, compliquant un peu plus l'image. De plus, le problème devient plus ardu par

---

1. Voir la section 2.1.4.

2. Un objet translucide est un objet à travers duquel la lumière peut passer. Elle peut être en partie absorbée, mais faiblement. Un bon exemple est une cellule observée au microscope optique.

l'action du flou : les zones floues de l'objet peuvent être vu *à travers* l'objet, et l'image est encore plus dégradée par le flou.

Supposons qu'un opérateur humain essaie maintenant de comprendre une telle image ; il est presque certain qu'avec de l'expérience, il y arrivera. Mais le problème est beaucoup plus compliqué si c'est un programme informatique qui doit analyser l'image et reconnaître le ou les objets de la scène.

Une partie du projet européen A.S.T.H.M.A.<sup>3</sup> était justement destinée à la conception d'un système semi-automatique de reconnaissance de grains de pollen. Le pollen (voir annexe A) est un objet qui répond parfaitement au pire cas que nous avons décrit plus haut : il est microscopique, et observé avec un microscope optique, il est translucide et tridimensionnel. Les images sont donc très difficiles à interpréter par un ordinateur. Nous nous sommes donc intéressés à modéliser le phénomène de formation de l'image d'un objet translucide, dans le but de mieux comprendre ce phénomène. Nous en parlons plus en détails dans la partie 1.2.

## 1.2 Ce que l'on veut faire

A notre connaissance, les travaux les plus proches (voir le chapitre 3) qui existent couvrent les cas d'objets 3D microscopiques opaques [Nayar 94] ou bien fluorescents [Agard 83]. Il n'existe pas de modèle dans le cas compliqué d'un objet translucide.

Nous nous sommes donc intéressés à ce problème. A partir d'une théorie adaptée, et d'hypothèses précises, nous proposons un modèle de formation de l'image qui s'applique à des objets microscopiques translucides, aussi bien qu'à des objets microscopiques opaques (voir le chapitre 5).

Nous avons choisi une modélisation en 3 étapes, comme nous le verrons dans le chapitre 4. La première étape est une étape de modélisation de l'objet translucide. La seconde est une phase de simulation de la propagation de la lumière à travers la scène et l'objet, qui permet de simuler la réfraction. La dernière phase s'occupe de simuler le flou. Avec ce modèle, nous pouvons modéliser des objets, et simuler des séquences d'images pour les comparer à des images réelles.

## 1.3 Plan

Voici comment va se présenter le présent ouvrage, après ce chapitre d'introduction : le chapitre 2 n'aura pas la prétention de présenter d'autre contribution qu'un rappel précis mais simplifié des notions mathématiques et physiques que nous utilisons par la suite. Le

---

3. *Advanced System of Teledetection for Healthcare Management of Asthma* : système avancé de télédétection pour la prévention de l'asthme. Certains grains de pollen sont très allergènes et peuvent conduire les personnes allergiques à des crises d'asthme, crises qui peuvent être mortelles. Les remèdes n'étant efficaces que s'ils sont pris en prévention, une bonne prévision des risques d'allergies est nécessaire.

chapitre 3 sera lui aussi un travail de synthèse, mais bibliographique cette fois puisque nous exposons de la façon la plus exhaustive possible les travaux qui sont thématiquement liés de près ou de loin au sujet abordé ici. Nous explorons différents domaines en faisant ressortir les travaux les plus importants. En effet, nous présentons des travaux issus de plusieurs communautés comme les domaines de la biologie, de la synthèse d'images, de l'optique, et bien sur de la vision par ordinateur et de l'intelligence artificielle. Le chapitre 4 sera un des plus importants puisque nous décrivons en détails le modèle que nous avons développé pendant ces 3 années de thèse. Les résultats issus de ce modèle et appliqués à plusieurs objets translucides sont regroupés dans le chapitre suivant, le chapitre 5. Nous y discutons des qualités et des défauts de la méthode proposée avant de conclure dans le chapitre 6. Ce dernier chapitre, outre la conclusion, propose aussi de nouvelles pistes à explorer pour exploiter ou améliorer le modèle proposé.



## Chapitre 2

# La théorie de la formation de l'image

DANS ce chapitre sont recueillies les méthodes et les notions physiques que nous utilisons dans les chapitres suivants. Le lecteur muni d'un bon bagage physique est en mesure de considérer ce chapitre comme un chapitre de rappels, alors qu'une personne moins formée à l'optique peut s'y intéresser de plus près. En effet, une introduction à l'optique géométrique puis à l'optique ondulatoire sont nécessaires pour la bonne compréhension des chapitres suivants, et nous y ferons référence dès que nécessaire. Nous rappellerons aussi, sans démonstration, quelques définitions et propriétés d'opérateurs mathématiques que nous utiliserons plus tard. La vocation de ce chapitre n'est donc pas de présenter un travail scientifique personnel, mis à part le travail de synthèse qui a été nécessaire pour résumer toutes ces notions en quelques pages.

Nous abordons tout d'abord une partie sur l'optique géométrique, dans laquelle nous expliquons une première approche de la formation de l'image. L'idée principale est que la lumière est composée de rayons lumineux, parfaitement localisables, qui se propagent en lignes droites dans le vide. La partie 2.2 traite d'une approche ondulatoire et propose une seconde approche de la formation de l'image : un système optique peut être vu comme un filtre de convolution. Nous définissons dans la partie suivante (2.3) plusieurs termes et notions que nous emploierons relativement souvent par la suite (cohérence entre deux ondes, propagation de la lumière de proche en proche, *etc.*). La partie 2.4 traite de l'optique de Fourier, qui va nous être très utile pour caractériser un système optique et aborder d'un autre point de vue la formation de l'image proposée dans la partie 2.2. A cette occasion nous introduisons de façon mathématique la Transformation de Fourier et ses propriétés. Ensuite, nous présentons succinctement le principe de fonctionnement de plusieurs microscopes (partie 2.5) dont nous parlons dans cet ouvrage, avant d'aborder la dernière partie de ce chapitre (partie 2.6) qui concerne plus précisément l'étude d'un microscope optique, avec les grandeurs que nous utiliserons : ouverture numérique, tube optique, *etc.*

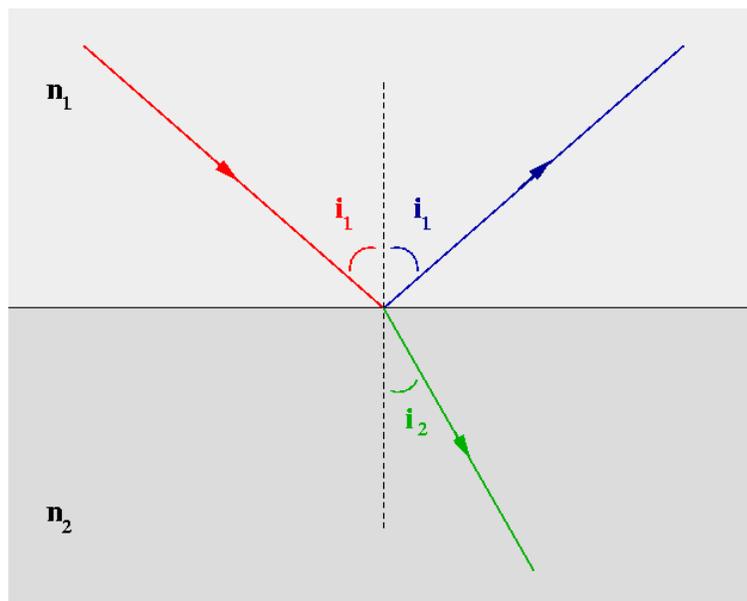


FIG. 2.1 – Illustration de la loi de Snell-Descartes avec 2 milieux d'indices  $n_1$  et  $n_2$ . Le rayon dirigé vers le bas est **réfracté** tandis que celui dirigé vers le haut est **réfléchi**. S'il n'y a pas réflexion totale, ces deux rayons existent toujours.

## 2.1 La formation de l'image en optique géométrique

L'optique géométrique est une théorie qui repose sur la physique classique, c'est-à-dire qu'elle permet d'expliquer bon nombre de phénomènes que l'on observe avec une très bonne approximation. Si l'on veut faire de la physique un peu plus « fine » (échelle inférieure ou de l'ordre de la longueur d'onde), il faudra se tourner vers l'optique ondulatoire. C'est une optique peut-être moins intuitive, mais qui explique de nombreux phénomènes comme la diffraction, les interférences, ... Nous en reparlerons à partir de la partie 2.2.

### 2.1.1 Les bases de l'optique géométrique

Nous allons présenter dans cette partie quelques notions qui nous seront utiles pour la compréhension de phénomènes optiques d'un point de vue de l'optique géométrique. Nous introduisons d'abord la notion de rayons lumineux et définissons ce qu'est la réfraction de tels rayons. Comme application de la réfraction, nous parlons ensuite de lentilles minces et de système optique.

#### 2.1.1.1 Rayons lumineux et réfraction

En optique géométrique, la lumière est vue sous sa forme corpusculaire uniquement : un photon (particule énergétique élémentaire de la lumière) se déplace en ligne droite dans le vide et dans un milieu homogène. Sa trajectoire crée un **rayon lumineux**. A tout instant,

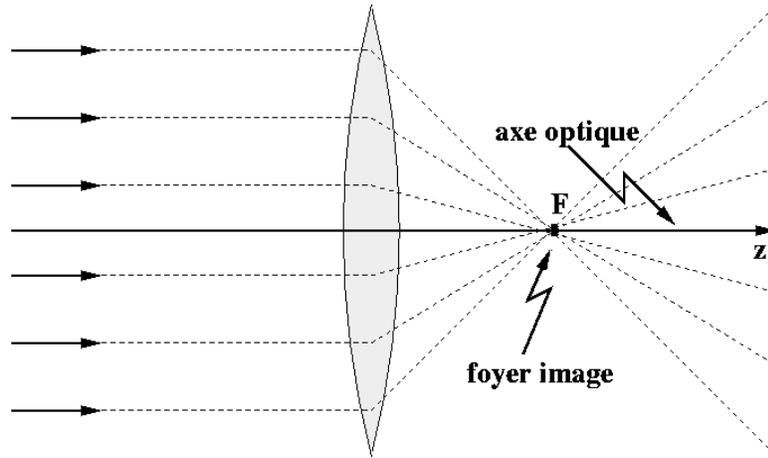


FIG. 2.2 – Nous avons représenté schématiquement une lentille mince, son axe optique et quelques rayons lumineux incidents qui se croisent au foyer image. Ce schéma va nous servir à fixer des conventions : la lumière est à gauche, l'image se forme à droite, et l'axe optique (axe  $z$ ) est horizontal orienté de gauche à droite. Sur les schémas suivants, nous adopterons les mêmes conventions sans nécessairement les réexpliquer.

sa position est parfaitement connue, et un tel rayon est donc infiniment fin et parfaitement localisé.

Un milieu translucide qui permet le passage de la lumière possède un **indice de réfraction** que l'on note généralement  $n$ . Cet indice dépend des propriétés intrinsèques du matériau. Lorsque qu'un rayon rencontre un milieu d'un indice différent du sien, il est soumis aux lois de la **réfraction**. Cette réfraction est décrite par les lois de Snell-Descartes qui sont les suivantes [Born 99] [Perez 95] (Eq. 2.1) :

$$\begin{aligned} n_1 \sin i_1 &= n_2 \sin i_2 & \text{si } |\sin i_1| \leq \frac{n_2}{n_1} \\ i_1 &= i_2 & \text{sinon} \end{aligned} \quad (2.1)$$

On a représenté sur la Fig. 2.1 ce que sont les rayons réfracté et réfléchi. L'Eq. 2.1 signifie que si l'on dépasse un angle d'incidence limite (qui dépend du rapport d'indice entre les 2 milieux), le rayon n'est plus transmis : il y a réflexion totale. Par contre, en-deçà de cet angle limite, la plus grande partie de l'énergie du rayon est réfractée (donc transmise). Un cas de figure intéressant apparaît lorsque  $n_2 > n_1$  : d'après l'Eq. 2.1, l'angle limite  $i_l$  répond à la définition  $|\sin i_l| = \frac{n_2}{n_1}$ . Puisque  $\frac{n_2}{n_1} > 1$ , alors il faut  $|\sin i_l| > 1$  ce qui est impossible. En d'autres termes, il ne peut y avoir réflexion totale lorsque  $n_2 > n_1$ , tous les rayons sont alors transmis.

### 2.1.1.2 Lentilles minces et système optique

En optique géométrique, il faut se placer dans des conditions d'observation particulières pour pouvoir faire un certain nombre d'approximations. Ces conditions s'appellent les

**conditions de Gauss**, ou aussi approximation de l'optique paraxiale ; il s'agit pour un objet de ne pas être trop éloigné de l'axe optique, l'axe principal de la lentille. Plaçons-nous dans le cas où nous avons une seule lentille (Fig. 2.2). Nous appellerons **système optique** un système capable de produire une image de la réalité. Une lentille est un des systèmes optiques les plus simples que l'on puisse réaliser. Elle possède la caractéristique de dévier un faisceau de rayons lumineux parallèles incidents de façon à ce qu'ils se recoupent tous en un point contenu dans le **plan focal image**. Dans le cas d'une lentille convergente, ce plan se trouve sur la face opposée à la lumière incidente (à droite avec les conventions proposées sur la Fig. 2.2).

Si à gauche de la lentille on a un objet vertical  $\overrightarrow{AB}$  (Fig. 2.3), on détermine la position de son image  $\overrightarrow{A'B'}$  avec l'Eq. 2.2 :

$$\frac{1}{OA} + \frac{1}{OA'} = \frac{1}{OF} = \frac{1}{f} \quad (2.2)$$

avec  $O$  le centre de la lentille et  $f$  la focale de la lentille. La Fig. 2.3 met en évidence toutes les notations précédentes. On peut noter que cette image est inversée et de taille différente par rapport à l'objet initial, mais nous ne nous intéresserons pas à ces effets. En effet, avoir une image inversée ne pose pas trop de problème car c'est un effet qui ne dépend pas de la position de l'objet. La dilatation dépend de la position de l'objet  $\overrightarrow{AB}$ , mais nous n'en tiendrons pas compte par la suite. Le grossissement se définit par le rapport de la taille de l'image sur la taille de l'objet (Eq. 2.3) :

$$\frac{A'B'}{AB} = \frac{OA'}{OA} = \frac{OA' - f}{f} = \frac{f}{OA - f} \quad (2.3)$$

Il semble évident que le grossissement varie en fonction de la position de l'objet et de son image. Quantitativement, à l'échelle microscopique  $f \approx 1$  mm (voir la partie 2.6.2.2) et les variations de  $OA$  sont de l'ordre de la profondeur de champ, soit au maximum une dizaine de micromètres. Dans ce cas,  $f \gg \Delta OA$  et on peut considérer le grossissement comme constant par rapport à la défocalisation.

Par contre, pour des systèmes optiques plus avec une plus grande profondeur de champ et travaillant à des échelles macroscopiques, les effets de dilatation en fonction de la défocalisation sont palpables. Les travaux de Deschêne *et al.* [Deschênes 00] [Deschênes 02] tiennent compte de cet effet pour une caméra ou un appareil photographique ; nous en parlerons dans le chapitre 3.

### 2.1.2 Formation de l'image d'un objet 2D

Dans cette partie, nous nous intéressons à un objet 2D comme sur la Fig. 2.3. Cet objet peut être vu comme une répartition 2D d'intensité : par exemple, ce peut être un cache éclairé par derrière, ou bien un objet fin quelconque éclairé par-dessus. L'objet est contenu dans un plan perpendiculaire à l'axe optique que nous appelons **plan objet** et le **plan du**

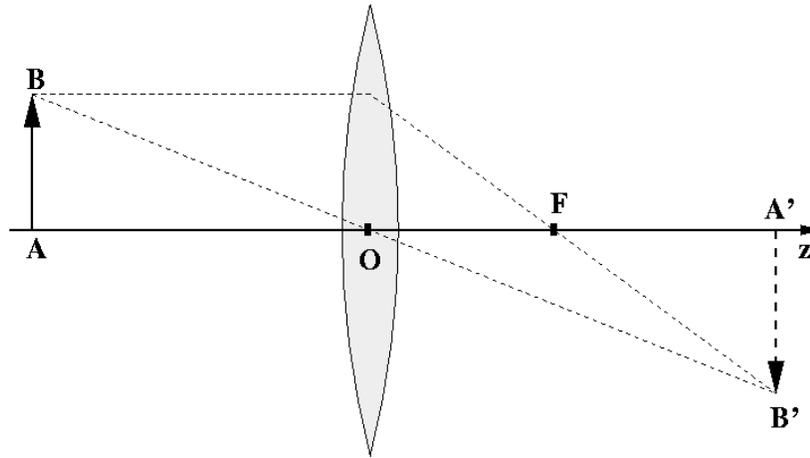


FIG. 2.3 – Un objet  $\overrightarrow{AB}$  éclairé placé à gauche d'une lentille convergente va donner un image réelle  $A'B'$  à droite de la lentille. On peut noter que cette image est inversée et de taille différente par rapport à l'objet initial, mais nous ne nous intéresserons pas à ces effets.

**capteur** est le plan sur lequel nous enregistrons la répartition d'intensité lumineuse. Ce peut être un capteur CCD, ou bien la rétine, ou bien tout capteur capable d'enregistrer une intensité lumineuse. Nous supposons que le plan image est fixe car il est solidaire du système optique. La position de cet objet par rapport au système optique va beaucoup influencer sur son image, comme nous allons le voir.

**2.1.2.0.1 Focalisation** Dans le cas où le plan image coïncide avec le plan du capteur, on dit que le plan objet est focalisé. L'image apparaît **nette**. La Fig. 2.4 représente un objet 2D focalisé. Quand un plan objet est focalisé, chacun de ses points va donner un point dans le plan du capteur qui correspond au plan image. En posant  $\overline{OA} = d_i$  et  $\overline{OA'} = d_f$ , l'Eq. 2.2 s'écrit

$$\frac{1}{d_i} + \frac{1}{d_f} = \frac{1}{f} \quad (2.4)$$

**2.1.2.0.2 Défocalisation** Si par contre le plan image ne coïncide pas avec le plan du capteur, on dit que le plan objet est défocalisé : l'image apparaît **floue**. Chacun de ses points donne toujours un point dans le plan image, mais celui-ci ne correspond plus au plan du capteur : à un point correspond une **tache** dans le plan du capteur. Ce phénomène génère ce que l'on appelle le **flou**. Sur la Fig. 2.5, on peut voir que si le plan objet est défocalisé à droite ou à gauche, le plan image ne correspond pas au plan du capteur. De plus, on peut s'apercevoir que la défocalisation n'est pas symétrique par rapport au plan net du capteur. Si on note  $\varepsilon$  la défocalisation dans l'espace objet, on a l'Eq. 2.5 :

$$\frac{1}{d_i + \varepsilon} + \frac{1}{d_f + \Delta z(\varepsilon)} = \frac{1}{f} \quad (2.5)$$

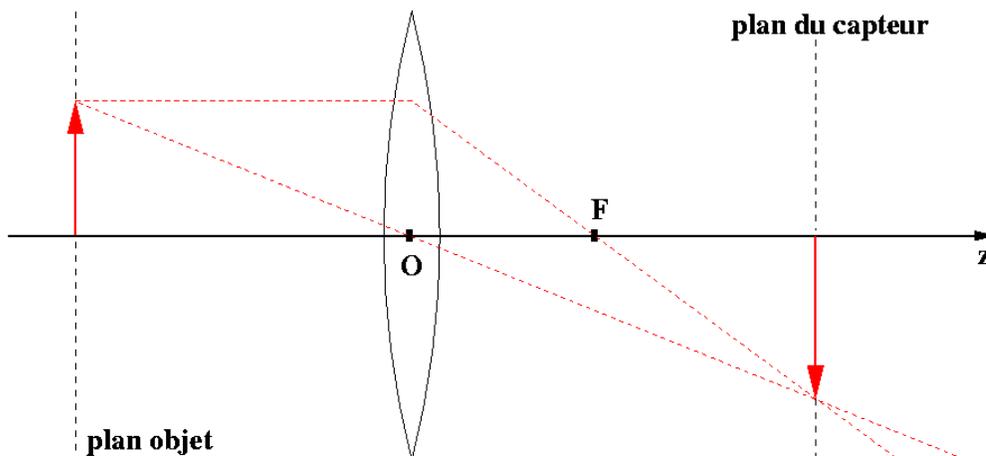


FIG. 2.4 – Un objet focalisé est un objet dont l'image se forme dans le plan-image de la lentille. Ici, on a fixé le plan-image et on a fait se déplacer le système optique jusqu'à ce que le plan-objet soit focalisé. L'origine des déplacements du plan-objet est la position focalisée.

où la fonction  $\Delta z(\varepsilon)$  traduit le déplacement du plan image par rapport à sa position focalisée. On peut écrire (Eq. 2.6) :

$$\Delta z(\varepsilon) = \frac{f (d_i + \varepsilon)}{d_i + \varepsilon - f} - d_f \quad (2.6)$$

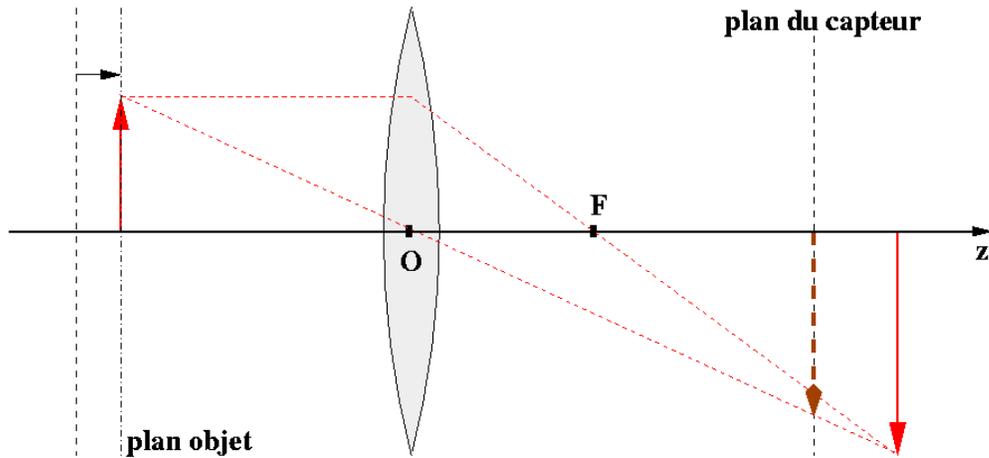
C'est une fonction qui est asymétrique en  $\varepsilon$  : pour une même valeur absolue (voir Fig. 2.5),  $\Delta z(\varepsilon)$  présente de plus grandes variations (en valeur absolue) pour un  $\varepsilon$  positif que pour un  $\varepsilon$  négatif.

### 2.1.3 Formation de l'image d'un objet 3D

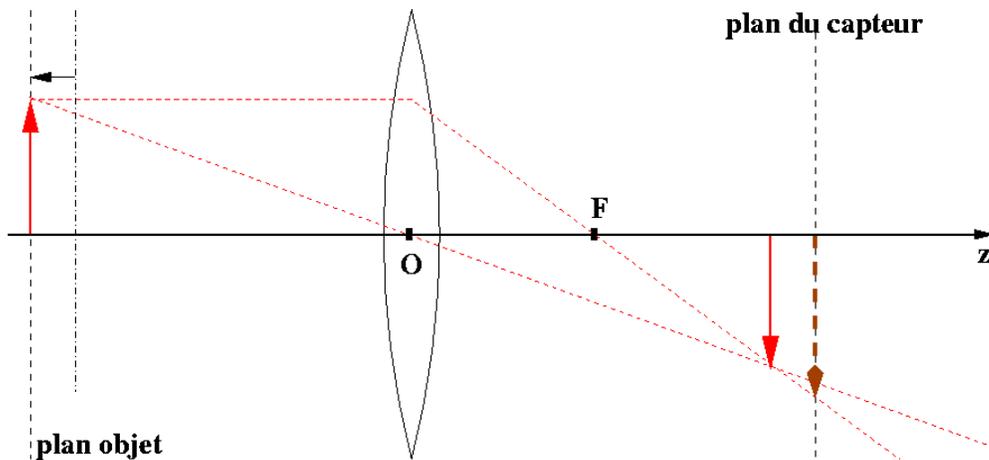
Jusqu'à présent, nous avons uniquement considéré un objet 2D infiniment fin. Nous allons nous intéresser au cas d'un objet 3D. Ce dernier peut être vu comme un empilement de plans 2D infiniment fins [Hiraoka 90]. Nous allons étudier le cas d'un objet opaque, puis celui d'un objet translucide, et nous allons essayer de souligner que le cas de l'objet 3D translucide est le plus difficile.

#### 2.1.3.1 Pour un objet opaque

Considérons le montage suivant : un objet épais opaque est éclairé par une source lumineuse. Il est éclairé par devant de manière à l'observer en éclairage diffus. Il est situé sur l'axe optique d'une lentille convergente, comme sur la Fig. 2.6. Nous avons placé un capteur dans un plan image fixe, qui est situé à droite de la lentille. Quel que soit la position en  $z$  de l'objet, à chaque instant, un plan objet et un seul sera focalisé, tous les autres seront nécessairement défocalisés.



(a)



(b)

FIG. 2.5 – Si le plan dans lequel l'image se forme ne correspond pas au plan-image (fixé), on dit que le plan-objet est défocalisé. Par rapport à l'origine des déplacements du plan-objet (position focalisée, matérialisé sur les 2 figures), on note  $\varepsilon$  la distance de défocalisation. Sur les 2 figures, on voit facilement que la défocalisation n'est pas symétrique en fonction du signe de  $\varepsilon$ . (a) représente un déplacement positif (vers la droite) du plan-objet, tandis que (b) représente un déplacement négatif (vers la gauche).

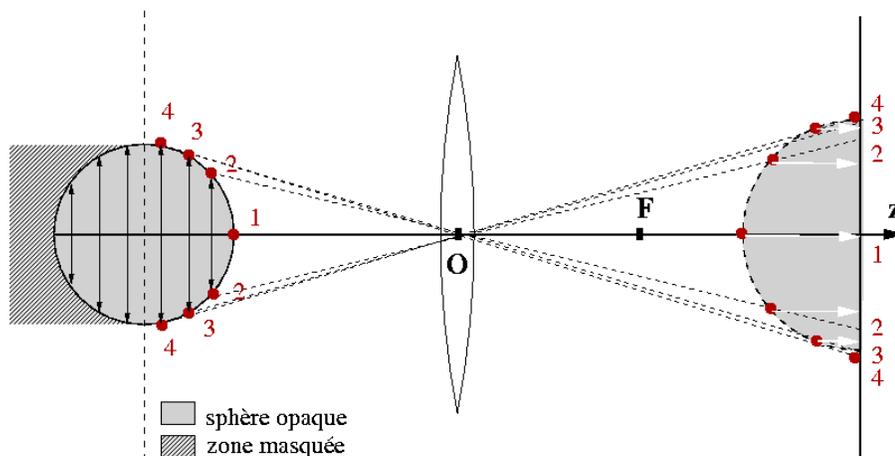


FIG. 2.6 – Formation de l'image d'un objet 3D opaque (sphère à gauche) : les plans objets sont représentés en traits pleins, tandis que leurs images sont en pointillés. Son image 3D est représentée à droite. L'objet étant opaque, on ne voit que sa surface (point noirs). Les zones hachurées représentent les parties de l'espace qui sont masquées. On peut remarquer que les images de chaque « plan » objet (les points images) se recouvrent faiblement sur le plan image (projection par les flèches blanches).

L'objet étant **opaque**, chaque plan objet masque ceux qui sont derrière lui. Cela revient à dire que si l'on regarde directement un objet opaque, qui se situe dans la pièce, on ne peut voir que sa surface. Dans [Nayar 94], Nayar *et al.* abordent le cas de la formation de l'image d'un objet 3D opaque d'un point de vue plus quantitatif. Les auteurs s'intéressent entre autre à la surface de l'objet, mais nous y reviendrons dans le chapitre 3.

A chaque plan objet correspond une image dans le plan du capteur que nous allons appeler **imagerie** afin de garder le terme « image » pour désigner l'image globale. Remarquons que sur la Fig. 2.6, les imageries ne sont en général pas représentées par les flèches en traits pointillés (à droite de la lentille) mais la répartition d'intensité lumineuse qui leur correspond dans le plan image. Avec le terme « imagerie » doit exister une notion de **projection** sur le capteur. A un plan objet défocalisé correspond une imagerie plus ou moins floue, tandis que le plan objet focalisé donne une imagerie nette.

On a vu que dans le cas présent, chaque élément de surface visible apporte sa contribution (nette ou non) à l'image qui se forme sur le capteur. Chaque contribution se fait par le biais d'une imagerie. Derrière la formation d'une image semble exister une notion d'additivité des imageries. Cette notion apparaît encore plus dans le cas d'un objet translucide.

### 2.1.3.2 Pour un objet translucide

Remplaçons l'objet opaque précédant par le même objet 3D, mais translucide maintenant (Fig. 2.7). Il est alors possible de voir non seulement sa surface, mais aussi ce qu'il y

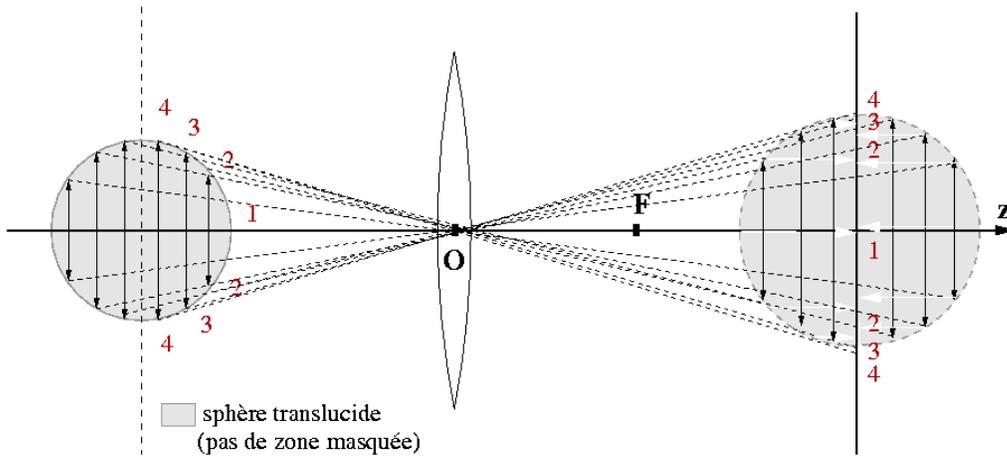


FIG. 2.7 – Formation de l'image pour un objet translucide (sphère de gauche) : les plans objet sont représentés en traits pleins à gauche et leur image correspondante en pointillés à droite. La sphère de droite avec un contour en pointillés représente son image 3D. Dans le cas d'un objet translucide, aucun plan objet n'en masque un autre : on voit l'intérieur et l'extérieur de l'objet. L'image qui se forme dans le plan du capteur est la superposition de chaque image individuelle. Il y a un large recouvrement de ces images.

a à l'intérieur de cet objet. Supposons de plus que nous l'éclairons par derrière.

Contrairement au cas précédent, aucun des plans objet ne masque les autres, et de fait, tous les plans objets dans leur intégralité contribuent à l'image finale : chaque imagerie apporte de l'information, défocalisée ou non. Il y a de nouveau une notion sous-jacente d'additivité des imageries, mais nous avons aussi un apport d'information beaucoup plus conséquent.

Supposons que comme dans [Nayar 94], nous nous intéressions à un problème de reconstruction de surface. Dans le cas d'un objet opaque, on a vu que l'information véhiculée par le biais des imageries correspondait uniquement à la surface. C'est déjà une aide considérable : sur une image, on est donc facilement capable de localiser spatialement les zones nettes. Au contraire, avec un objet 3D translucide, l'information transportée par une imagerie n'est pas aussi facilement délimitée : nous avons de l'information de surface, mais aussi de l'information provenant de l'intérieur de l'objet. On ne peut donc pas facilement localiser les zones nettes de l'objet, car l'imagerie nette est infiniment plus diluée dans l'image. De plus, il n'est pas évident que les zones nettes de l'image soient toutes identifiables.

### 2.1.3.3 La formation de l'image sur un capteur est une projection

Sur la Fig. 2.8, nous pouvons voir sur la droite l'image 3D « fantôme » d'un objet continu. Cette image est dite « fantôme », car à moins de posséder un capteur 3D, un capteur 2D donnera une image dégradée de cet objet : tout se passe comme si chaque partie

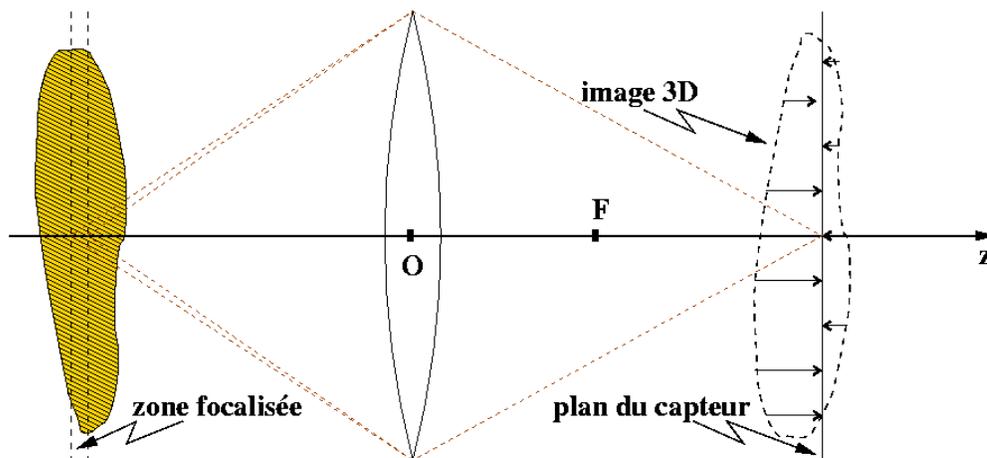


FIG. 2.8 – Nous représentons ici sous forme continue de la formation de l'image d'un objet 3D translucide. L'objet (à gauche) est en partie focalisé; il se forme une image 3D « fantôme » de l'objet (à droite, en pointillés) mais ce n'est pas ce que l'on peut observer : ce n'est qu'une répartition en intensité, et c'est justement la phase d'observation qui va permettre de transformer cette intensité lumineuse en une grandeur observable, une image au sens large. Il y a une notion sous-jacente de projection d'un espace 3D (image en pointillés) sur un espace 2D. On comprend alors qu'une perte d'information se produise à cause de la défocalisation.

de l'image 3D était **projetée** sur le plan du capteur, mais en étant rendue plus floue en fonction de l'éloignement. Non seulement le flou dû à la défocalisation va faire perdre de l'information, mais en plus cette projection d'un espace 3D vers un espace 2D va modifier l'information.

Nous commençons à mieux cerner la difficulté supplémentaire qu'apporte un objet 3D translucide à travers le flou. Ce flou apparaît sur l'image à cause des zones défocalisées. Nous en discuterons plus en détails à l'aide d'exemples concrets dans la partie 2.6.

#### 2.1.4 Espace continu et profondeur de champ

Nous nous sommes intéressés jusqu'à présent à des objets relativement discrets : on considère un objet infiniment fin comme étant un plan objet dans la partie 2.1.2, et un objet opaque comme étant une superposition de plans 2D infiniment fins dans la partie 2.1.3. Nous avons bien sûr besoin d'avoir des objets discrets pour faire des calculs numériques.

En réalité, les objets sont plutôt des objets continus. Or, si tous ces objets sont 3D, ils sont plus ou moins épais ; un objet est **fin** (comprendre presque 2D) s'il est peu épais devant la **profondeur de champ**. Jusqu'à présent, nous avons supposé qu'un seul plan 2D était focalisé à la fois. Mais si on étudie un objet épais et continu, on s'aperçoit que ce n'est pas un plan mais une **zone** de l'objet qui est focalisée, et qui apparaît donc nette. La profondeur de champ est une notion subjective qui possède plusieurs définitions qui sont

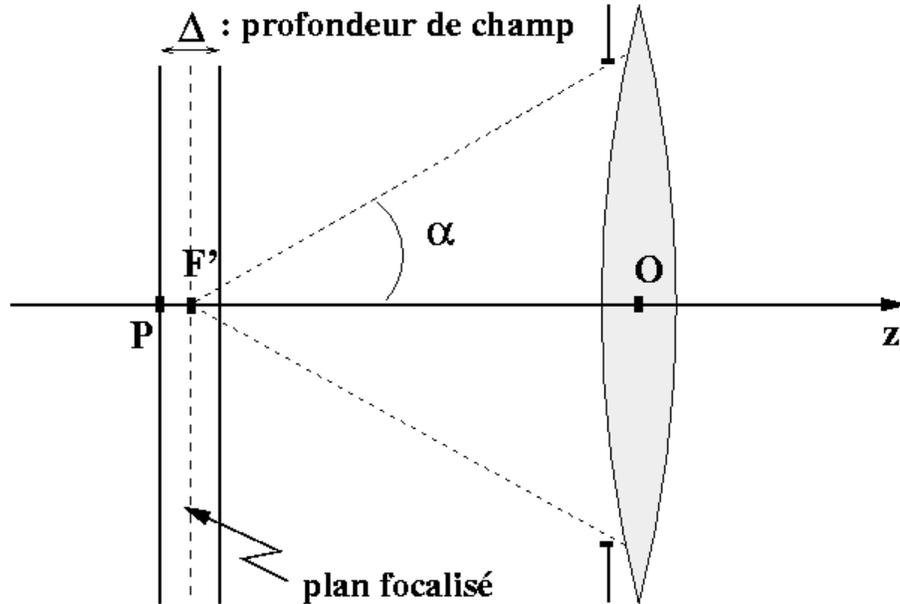


FIG. 2.9 – Illustration de la profondeur de champ : pour une focalisation donnée, ce n'est pas un plan infiniment fin qui apparaît net, mais tout une zone de l'espace, situé de part et d'autre de ce « plan » focalisé. La profondeur de champ est notée  $\Delta$  sur le schéma. D'après [Perez 95], on comprend la subjectivité de cette grandeur : c'est « [...] la distance maximale de deux points de l'axe tels que leurs images soient toutes deux **acceptables**. »

bien résumées dans [Sheppard 88] et [Young 93]. Nous en reparlerons dans le chapitre 3.

Supposons que l'on observe une scène 3D avec un système optique. Cette scène est décrite dans un espace  $(x, y, z)$  continu. L'axe optique est choisi selon la direction  $z$ . La profondeur de champ (*depth-of-field* dans la littérature en anglais) du système peut être définie comme la zone selon l'axe optique, à l'intérieur de laquelle la scène apparaît nette (*sharp* ou *in-focus*). Au contraire, à l'extérieur de cette zone, la scène apparaît floue (*blurred* ou *out-of-focus*). La Fig. 2.9 schématise ce qu'est la profondeur de champ et insiste sur sa subjectivité : puisque la limite entre flou et netteté est très subjective (deux personnes différentes ne la définissent pas de la même manière), il est nécessaire de la définir à l'aide d'un **critère** mathématique. Nous en reparlerons plus précisément dans le cas d'un microscope optique dans la partie 2.6.2.3.

Nous allons maintenant passer à une approche ondulatoire de la formation de l'image dans la partie 2.2.

## 2.2 Approche ondulatoire de la formation de l'image

Dans cette partie, nous n'allons plus considérer la lumière comme étant composée de rayons lumineux (rayons transportant de l'énergie se déplaçant en ligne droite dans le vide

et parfaitement localisés). La lumière est une **onde** qui se déplace de proche en proche.

### 2.2.1 Réponse Impulsionnelle (PSF) et convolution

Dans le cas où le système optique peut être assimilé à un S.L.I.T.<sup>1</sup>, nous pouvons lui associer une fonction caractéristique que nous appelons « réponse impulsionnelle » (PSF<sup>2</sup> en anglais). C'est la réponse caractéristique du système, s'il est soumis à une impulsion. C'est un domaine très vaste qui regroupe, entre autres, tout le traitement numérique du signal et des images. Nous allons nous limiter à définir la convolution.

#### 2.2.1.1 La convolution

Soient  $f(x, y)$  et  $g(x, y)$  2 fonctions prenant leurs valeurs de  $\mathbb{R}^2$  sur  $\mathbb{R}$ . On définit le produit de convolution à 2 dimensions de la manière suivante :

$$f(x, y) * g(x, y) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} f(x', y').g(x - x', y - y').dx'.dy' \quad (2.7)$$

#### 2.2.1.2 Propriétés

Les propriétés du produit de convolution qui nous intéresseront sont les suivantes :

- il est commutatif:  $f * g = g * f$  ;
- il est distributif:  $f * (g + g') = f * g + f * g'$  ;
- si  $f(x, y) = C^{ste} \forall (x, y)$ , on dit que  $f$  est **uniforme**. Si on effectue le produit  $f * g$  avec  $g$  une fonction continue à support borné, alors on peut montrer que le résultat est uniforme aussi.

**preuve :** D'après l'Eq. 2.7, on peut écrire

$$f(x, y) * g(x, y) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} C^{ste}.g(x - x', y - y').dx'.dy' \quad (2.8)$$

car  $f$  est uniforme. En faisant sortir la constante de la double intégrale et en faisant le changement de variables  $X = x - x' dX = -dx' Y = y - y' dY = -dy'$ , l'Eq. 2.8 devient

$$\begin{aligned} f(x, y) * g(x, y) &= C^{ste}. \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} g(X, Y).dX.dY \\ &= C^{ste} \end{aligned} \quad (2.9)$$

L'Eq. 2.9 donne un résultat uniforme: la partie intégrale sur  $g$  donne la norme de  $g$ , *i.e.* une valeur numérique.

1. S.L.I.T. : Système Linéaire Invariant par Translation. C'est un système optique (dans notre cas) qui transforme un point lumineux sur l'axe optique de la même façon qu'un point lumineux situé à la même profondeur, mais loin de l'axe.

2. *Point Spread Function* : Fonction d'étalement d'un point vu par un système optique (*to spread* : étaler).

### 2.2.1.3 La distribution de Dirac

Une distribution particulière est étroitement liée à la convolution : c'est la distribution « impulsion », ou distribution « de Dirac ». Cette distribution est notée  $\delta(x, y)$  lorsque l'on s'intéresse à un espace à 2 dimensions ; elle possède les caractéristiques suivantes (Eq. 2.10) :

$$\begin{aligned}\delta(x, y) &= 0 && \text{si } (x, y) \neq (0, 0) \\ &= +\infty && \text{si } (x, y) = (0, 0)\end{aligned}\quad (2.10)$$

Une distribution de Dirac (ou « un Dirac ») répond à la définition suivante (l'Eq. 2.11) :

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \delta(x, y) = 1 \quad (2.11)$$

Cette équation est définie au sens de la théorie des distributions [Schwartz 97]. Un Dirac est donc vu comme la limite d'une gaussienne (normalisée) possédant un écart-type tendant vers 0. Toutes ces caractéristiques donnent une propriété importante ; pour une fonction  $f$  quelconque, on a la relation (Eq. 2.12) :

$$f(x, y) * \delta(x, y) = f(x, y) \quad (2.12)$$

Nous verrons l'utilité importante du Dirac ainsi que d'autres propriétés dans la partie 2.4. Nous allons maintenant voir l'application de la convolution et de la PSF à un système optique, dans le cas d'un objet 2D puis 3D.

## 2.2.2 Formation de l'image d'un objet 2D

En optique ondulatoire, on peut représenter par leur réponse impulsionnelle  $h(x, y)$ , toute lentille ou tout système optique dans la mesure où ils sont assimilables à des S.L.I.T.. La fonction  $h(x, y)$  s'appelle la « réponse impulsionnelle » car c'est le résultat que donnerait le système s'il était soumis à l'éclairage d'un point source parfait ; un point source, une « impulsion lumineuse », est représenté par un Dirac en intensité  $\delta(x, y)$ . Soit un plan présentant une répartition 2D en intensité notée  $o(x, y)$  ; le résultat  $i(x, y)$  de l'observation de ce plan par le système optique (l'« image » de ce plan) est donné par la convolution de ce plan par la réponse impulsionnelle (Eq. 2.13) :

$$i(x, y) = o(x, y) * h(x, y) \quad (2.13)$$

L'Eq. 2.13 suppose que le plan  $o(x, y)$  est parfaitement **focalisé**, c'est-à-dire que, comme en optique géométrique, un point de l'objet  $o(x, y)$  va donner un point dans l'espace image. Si nous supposons que  $o(x, y)$  est positionné en  $z_0$  dans l'espace, nous allons pouvoir lui ajouter cette coordonnée et l'Eq. 2.13 devient :

$$i(x, y)|_{z_0} = o(x, y, z_0) * h(x, y) \quad (2.14)$$

pour un objet toujours focalisé. Supposons maintenant que l'on déplace ce plan objet selon l'axe optique uniquement. D'après ce que nous avons vu en 2.1.4, la profondeur de champ a une taille finie ; si l'objet est défocalisé d'une trop grande quantité (2 ou 3 fois la taille de l'objet), alors la réponse impulsionnelle sera elle-aussi modifiée. La réponse impulsionnelle est 3D et dépend de la position d'un plan objet par rapport au plan focal objet. Pour un plan objet positionné en un point  $z$  quelconque  $o(x, y, z)$ , l'Eq. 2.14 devient :

$$i(x, y)|_{z_0} = o(x, y, z) * h(x, y, z - z_0) \quad (2.15)$$

avec  $h(x, y, 0) = h(x, y)$ . Voici donc une fonction  $h$  qui est 3D et qui dépend de la défocalisation de l'objet. Pour tout  $z \neq z_0$ , on dira que le plan objet est défocalisé<sup>3</sup> d'une valeur  $\varepsilon = z - z_0$ . Cette défocalisation entraîne une perte de séparation des détails : c'est l'apparition du flou. Le fait que la PSF d'un système optique soit dépendante de la défocalisation va avoir un impact considérable sur la formation de l'image d'un objet 3D.

### 2.2.3 Formation de l'image d'un objet 3D

On peut trouver dans [Castleman 96] la théorie de la formation de l'image pour un objet microscopique et fluorescent. Nous reviendrons plus en détail sur la bibliographie dans le chapitre 3.

Supposons que l'on a un « objet en intensité » (*i.e.* un objet 3D défini comme une répartition 3D d'intensité). Nous allons utiliser une notation discrète de l'objet, selon l'axe  $z$ , indicé par l'indice  $n$ . Supposons que cet objet  $o(x, y, z_n)$  soit équivalent à une suite de plans 2D accolés les uns aux autres (comme dans la partie 2.1.3). Dans le cas d'un objet en intensité émettant de façon incohérente<sup>4</sup>, chaque plan objet est convolué par la réponse impulsionnelle défocalisée qui lui est propre. Cela se résume par l'Eq. 2.16 :

$$i(x, y)|_{z_0} = \sum_{n=-\infty}^{+\infty} (o(x, y, z_n) * h(x, y, z_n - z_0)) \quad (2.16)$$

Avec cette notation, il apparaît nettement que pour une focalisation donnée, un plan et un seul est focalisé à chaque instant ; tous les autres sont défocalisés. Le passage à un espace continu selon  $z$  est donné par l'Eq. 2.17 :

$$i(x, y)|_{z_0} = \int_{-\infty}^{+\infty} (o(x, y, z) * h(x, y, z - z_0)) . dz \quad (2.17)$$

$o(x, y, z)$  est maintenant un empilement continu de plans objet 2D selon  $(x, y)$ .

---

3. Il semble que nous soyons revenus à une profondeur de champ infiniment fine en décrétant qu'il n'y a qu'un seul plan objet défocalisé. Il faut faire attention qu'un objet peut être défocalisé (*i.e.* différent du plan focalisé) sans pour autant que l'on voit apparaître du flou. Ce sont, par exemple, les plans objet mitoyens au plan objet focalisé, qui se trouvent dans la profondeur de champ. Un plan objet peut donc être défocalisé sans pour autant nous apparaître flou (subjectivité de la profondeur de champ).

4. Voir la section 2.3.3 pour une définition plus précise.

## 2.3 Généralités sur les ondes en optique

Cette partie va introduire de nombreuses notions qui vont nous être utiles. En optique ondulatoire, il est commode de définir une onde par son **amplitude** complexe (Eq. 2.18) :

$$\Psi(\vec{r}, t) = A(\vec{r}) \cdot e^{-i\omega t} e^{i\vec{k} \cdot \vec{r}} \quad (2.18)$$

avec les notations complexes usuelles ( $e^{i\frac{\pi}{2}} = i$ ). Son amplitude complexe dépend de la position  $\vec{r}$ , du vecteur d'onde  $\vec{k}$  et du temps  $t$ . Cette onde se déplace selon la direction de  $\vec{k}$ . Nous la supposons monochromatique de longueur d'onde  $\lambda$ , si bien que  $k = \|\vec{k}\| = \frac{2\pi}{\lambda}$ .

Une grandeur qui nous intéresse beaucoup ici est l'**intensité** de cette onde, qui se définit par le module au carré de l'amplitude. On la note  $I$  dans l'Eq. 2.19 :

$$I(\vec{r}) = |\Psi(\vec{r}, t)|^2 = |A(\vec{r})|^2 \quad (2.19)$$

L'intensité en un point de l'espace correspond à l'énergie que l'on trouve en ce point.

Très souvent, il est commode de faire l'approximation que l'onde est **stationnaire**, c'est-à-dire qu'elle ne dépend plus du paramètre temps  $t$ . Dire que l'onde est stationnaire revient à dire que l'amplitude de l'onde en un point de l'espace ne dépend plus du temps. Nous allons nous-aussi faire cette hypothèse ; cela revient à poser  $t = 0$  s dans l'Eq. 2.18. Physiquement, cela revient à dire que la source lumineuse éclaire l'espace toujours de la même façon ; elle a atteint un régime stationnaire.

Nous allons maintenant voir plusieurs notions que nous utiliserons tout au long de ce manuscrit sans les redéfinir à chaque fois. Il s'agit par exemple de la propagation de l'onde selon le principe d'Huygens, ce qu'est une onde sphérique, un éclairage incohérent. Nous expliquerons le point de vue ondulatoire de la réfraction avant de récapituler toutes les hypothèses que nous posons.

### 2.3.1 Principe d'Huygens-Fresnel

On peut trouver dans tous les livres d'optique [Born 99] [Perez 95] la définition du principe d'Huygens-Fresnel qui décrit la propagation<sup>5</sup> de la lumière. Le principe dans son ensemble mentionne que la lumière se propage de **proche en proche** dans l'espace. Chaque zone de l'espace atteinte par l'onde lumineuse va se comporter à son tour comme une **source lumineuse secondaire**. L'amplitude complexe en un point sera de plus la **somme** de toutes les amplitudes complexes atteignant ce point. On dit que ces amplitudes complexes **interfèrent**.

---

5. Voir le site du département de physique : <http://www.unice.fr/DeptPhys/optique/diff/index.html>

### 2.3.2 Ondes planes et ondes sphériques

Il existe deux types d'ondes qui vont nous intéresser : les ondes sphériques et les ondes planes. Une onde sphérique est une onde qui va se propager dans toutes les directions à partir d'un point source. Elle est dite sphérique car ses fronts d'ondes sont des sphères. Loin du point source, le rayon des sphères devient de plus en plus grand et, si on ne s'intéresse qu'à une petite partie de l'espace, les fronts d'onde ressemblent alors à des plans : on approche d'une onde plane. On a ainsi défini un axe optique, arbitrairement  $z$ , suivant lequel l'onde n'a plus de dépendance spatiale. Nous écrivons l'amplitude d'une onde sphérique

$$\vec{A}(\vec{r}, t) = \frac{\vec{A}_0(\vec{r}, t)}{\|\vec{r}\|} e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)} \quad (2.20)$$

et pour une onde plane

$$\vec{A}(\vec{r}, t) = \vec{A}_0(x, y, t) e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)} \quad (2.21)$$

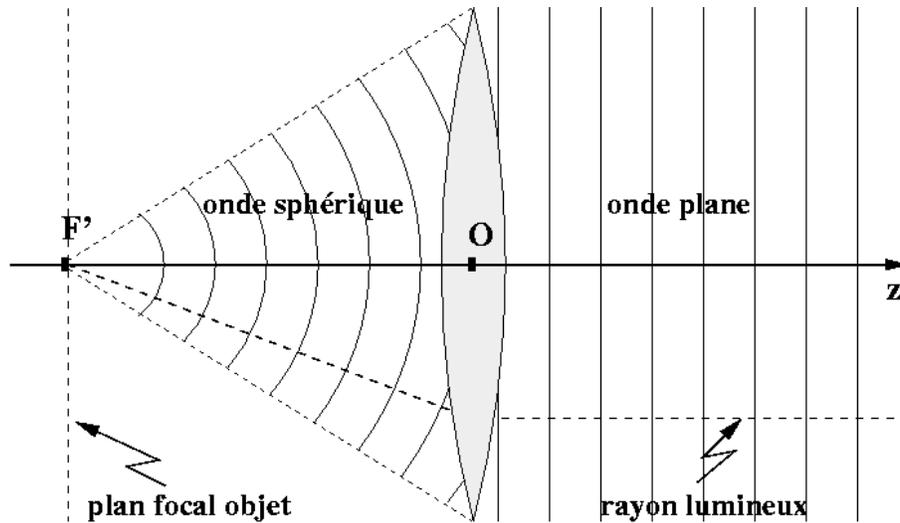
Sur la Fig. 2.10, nous avons représenté la relation entre rayons lumineux et front d'onde : le front d'onde est la surface perpendiculaire en tous points aux rayons lumineux d'un faisceau optique qui proviennent d'un point source. Un point source émet une onde sphérique ; si celui-ci est positionné dans le plan focal objet d'un instrument d'optique, l'onde sphérique est transformée en onde plane après passage dans l'instrument. De même, une onde plane incidente est transformée en onde sphérique après passage dans l'instrument.

Dans le chapitre 4 nous modélisons la source lumineuse d'un système optique. Comme cette source n'est pas supposée plane, nous modélisons chaque point de la source comme une source ponctuelle d'onde sphérique. Nous ne choisissons pas la description ondulatoire, mais plutôt la description géométrique, sous forme de rayons lumineux. Une autre propriété de la source que nous modélisons dans le chapitre 4 est le fait qu'elle soit modélisée incohérente. La partie 2.3.3 va expliquer brièvement ce qu'est l'incohérence d'une source lumineuse.

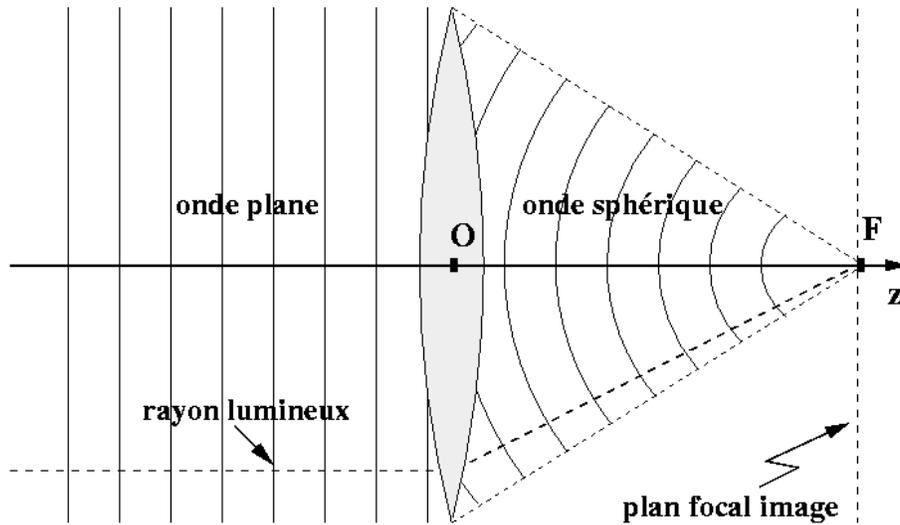
### 2.3.3 Eclairage incohérent

Il y a deux types de cohérences : la cohérence temporelle, qui nous dira si l'onde est plus ou moins monochromatique, et la cohérence spatiale qui donnera la corrélation de deux ondes. Nous nous intéresserons uniquement à la cohérence spatiale, que nous désignerons par abus de langage par « cohérence ».

On a besoin de parler de cohérence spatiale dès que l'on a une source lumineuse étendue. Une source lumineuse est dite cohérente si tous ses points sources émettent de manière ordonnée. Supposons que nous avons une source lumineuse étendue. Toute source lumineuse émet dans une bande de fréquences étroite, mais finie. Chaque point source peut être vu comme un oscillateur harmonique dont les fréquences d'oscillations sont dans cette bande. Une onde émise par le point source indicé  $p$  est composée des vecteurs champ électrique  $\vec{E}_p$



(a)



(b)

FIG. 2.10 – Représentation des fronts d'onde correspondants à une onde plane ou une onde sphérique. La lumière se déplace de la gauche vers la droite. Sur chaque schéma, nous avons fait figurer un rayon lumineux pour illustrer sa définition : il est perpendiculaire aux fronts d'onde. (a) Le point source est positionné au foyer objet de la lentille convergente. Il génère une onde sphérique qui, après passage de la lentille, va devenir une onde plane. (b) La source est située à l'infini ou bien est une source d'onde plane (un laser par exemple). C'est donc une onde plane avant le passage de la lentille convergente, et une onde sphérique ensuite, qui converge vers le foyer image.

et magnétique  $\vec{H}_p$ . S'il n'y a qu'un seul point source, l'intensité  $I_p$  de l'onde en un point  $M$  s'écrit [Born 99] [Perez 95] (Eq. 2.22) :

$$I_p(M) = \frac{c}{4\pi} \left| \left\langle \vec{E}_p \wedge \vec{H}_p \right\rangle \right| \quad (2.22)$$

où  $\wedge$  dénote le produit vectoriel et  $\langle \dots \rangle$  la moyenne temporelle. On note  $c$  la vitesse de la lumière dans le vide.

Si on considère une source étendue, il faut maintenant tenir compte des champs électrique et magnétique globaux. L'expression de ces champs et l'intensité totale en un point  $M$  s'écrivent (Eq. 2.23) :

$$\begin{aligned} \vec{E} &= \sum_p \vec{E}_p \\ \vec{H} &= \sum_p \vec{H}_p \\ I(M) &= \frac{c}{4\pi} \left\langle \vec{E} \wedge \vec{H} \right\rangle \end{aligned} \quad (2.23)$$

Si on développe le produit vectoriel on a l'Eq. 2.24:

$$I(M) = \frac{c}{4\pi} \left| \sum_{p,q} \left\langle \vec{E}_p \wedge \vec{H}_q \right\rangle \right| \quad (2.24)$$

Lorsque  $p \neq q$ , on appelle cette somme partielle termes de cohérences mutuelles. En séparant les termes de cohérence des termes d'intensité, cela donne (Eq. 2.25) :

$$I(M) = \frac{c}{4\pi} \left| \sum_p \left\langle \vec{E}_p \wedge \vec{H}_p \right\rangle + \sum_{p \neq q} \left\langle \vec{E}_p \wedge \vec{H}_q \right\rangle \right| \quad (2.25)$$

En regardant la forme du terme de cohérence, on peut voir que c'est un vecteur. Si les différents points sources émettent de façon « corrélée », ce vecteur aura alors une résultante globale qui affectera l'intensité en  $M$ . On dit que la lumière est cohérente. Par contre, si les points sources émettent de manière totalement indépendante, ce terme d'interférence va, en moyenne, donner un vecteur à résultante nulle. La lumière est alors dite **incohérente**. C'est cette approximation que nous allons utiliser par la suite.

## 2.4 Optique de Fourier

Nous allons maintenant introduire quelques notions et notations qui nous seront utiles d'un point de vue théorique et calculatoire pour les chapitres 3 et 4. L'optique de Fourier est très bien décrite dans plusieurs ouvrages de références comme [Born 99] [Castleman 96] [Goodman 68] [Perez 95]. Nous avons l'habitude de travailler dans un espace direct que l'on note souvent  $(x, y, z)$ . Nous appellerons le plan direct le plan  $(x, y)$ . A ce plan direct est associé un espace dual que l'on appelle le plan des fréquences spatiales. Cet espace est noté  $(u, v, z)$  et on appellera  $(u, v)$  le plan des fréquences. La transformation (bijective) qui permet de passer d'un espace à l'autre est appelée la Transformation de Fourier. Nous allons commencer par la définir mathématiquement dans la partie suivante.

### 2.4.1 Transformation de Fourier

Mathématiquement, pour que la Transformation de Fourier soit définie, il faut que les fonctions utilisées soient normalisables (*i.e.* la somme de leur module au carré sur tout l'espace doit être finie). Nous supposons toujours que cette hypothèse est vérifiée puisque nous travaillons avec des images (fonctions 2D à support borné et à énergie finie). Voyons plus en détail la Transformation de Fourier.

#### 2.4.1.1 Définition

On définit la Transformation de Fourier de la façon suivante : soit  $o(x, y)$  une répartition bidimensionnelle de l'espace direct et soit  $\hat{o}(u, v)$  sa Transformée de Fourier (notée TF). Il existe de nombreuses relations entre ces deux espaces, toutes équivalentes. En optique, la relation la plus commode est donnée par l'Eq. 2.26 :

$$\hat{o}(u, v) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} o(x, y) \cdot e^{-2i\pi(u \cdot x + v \cdot y)} \cdot dx \cdot dy \quad (2.26)$$

En effet, il existe une certaine symétrie avec la Transformée inverse (notée  $\text{TF}^{-1}$ ) donnée par l'Eq. 2.27 :

$$o(x, y) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \hat{o}(u, v) \cdot e^{2i\pi(u \cdot x + v \cdot y)} \cdot du \cdot dv \quad (2.27)$$

Il est facile de vérifier que  $\text{TF} [\text{TF}^{-1}] (o(x, y)) = o(-x, -y)$  (identité à une symétrie près), si on se reporte à la définition du Dirac (partie 2.2.1.3) et que l'on introduit la propriété suivante (Eq. 2.28) :

$$2\pi \delta(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} e^{2i\pi ux} du \quad (2.28)$$

et de même en 2D (Eq. 2.29) :

$$2\pi \delta(x, y) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{2i\pi(ux+vy)} du \cdot dv \quad (2.29)$$

Nous allons voir quelles sont les propriétés de la TF.

#### 2.4.1.2 Propriétés

Nous allons donner quelques propriétés de la TF. Nous les utiliserons plus tard dans le chapitre 4, et elles faciliteront la compréhension de nombreuses explications dans le chapitre 3 :

- la TF de  $f(cx, c' \cdot y)$  est  $\frac{1}{c \cdot c'} \hat{f} \left( \frac{u}{c}, \frac{v}{c'} \right)$  ;
- la TF d'une gaussienne  $g_\sigma(x, y)$  d'écart-type  $\sigma$  est aussi une gaussienne  $\hat{g}_\sigma(u, v) = G_{\sigma'}(u, v)$  d'écart-type  $\sigma' = \frac{1}{\sqrt{4\pi}\sigma}$  ;

- la TF d'un Dirac<sup>6</sup>  $\delta(x, y)$  est une constante qui vaut  $\frac{1}{2\pi}$  pour tout couple  $(u, v)$  ;
- la TF de la distribution 1D définie par

$$\Pi(x) = \begin{cases} 1 & \text{si } x \in \left[-\frac{1}{2}; \frac{1}{2}\right] \\ 0 & \text{sinon} \end{cases} \quad (2.30)$$

est la fonction **sinus cardinal** définie par  $\frac{\sin \pi u}{\pi u} \equiv \text{sinc } \pi u$  ;

- en 2 dimensions, la TF de  $\Pi\left(\frac{\rho}{d}\right) = \begin{cases} 1 & \text{si } \rho \in \left[-\frac{d}{2}; \frac{d}{2}\right] \\ 0 & \text{sinon} \end{cases}$  n'est pas un sinus cardinal en 2D, mais une fonction qui lui ressemble : une fonction d'Airy.

### 2.4.1.3 Fonctions paires/impaires

On vérifie facilement que la transformée de Fourier d'une fonction paire (symétrique) est purement réelle, alors que celle d'une fonction impaire est purement imaginaire. De même la transformée de Fourier d'une fonction purement réelle sera paire. A 2 dimensions, cela s'interprète de la façon suivante : une image présentant un centre de symétrie a une TF purement réelle.

### 2.4.1.4 Energie

La Transformation de Fourier, par définition, doit conserver l'énergie ; en effet, c'est une transformation bijective, donc l'énergie doit être la même dans le plan des fréquences comme dans le plan direct. C'est le théorème de Parseval qui le formalise (Eq. 2.31) :

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} |o(x, y)|^2 dx.dy = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} |\widehat{o}(u, v)|^2 du.dv \quad (2.31)$$

Il faudra en tenir compte lorsque nous utiliserons une TF discrète dans le chapitre 4.

## 2.4.2 Applications à l'optique

Les définitions que nous avons introduites précédemment sont fort utiles quand elles sont appliquées à l'optique ondulatoire : nous faisons alors de l'optique de Fourier. Nous allons pouvoir caractériser un instrument d'optique grâce à deux fonctions particulières équivalentes entre elles à une TF près. Elles lui sont propres, car elles ne dépendent que de certains paramètres physiques (taille de l'ouverture, focale, *etc.*) ou des conditions d'observation (longueur d'onde, *etc.*). Ces fonctions sont la Fonction de Transfert Optique (*Optical Transfert Function* ou *OTF* en anglais) et la Réponse Impulsionnelle (*Point Spread Function* ou *PSF*). Sur la Fig. 2.11, nous représentons le système optique par une lentille convergente ; nous avons fait figurer le diaphragme (ou « pupille ») qui va être à l'origine de la PSF et de l'OTF. Nous allons maintenant voir la définition de chacune de ces fonctions.

6. Pour d'autres propriétés du Dirac, voir la section 2.2.1.

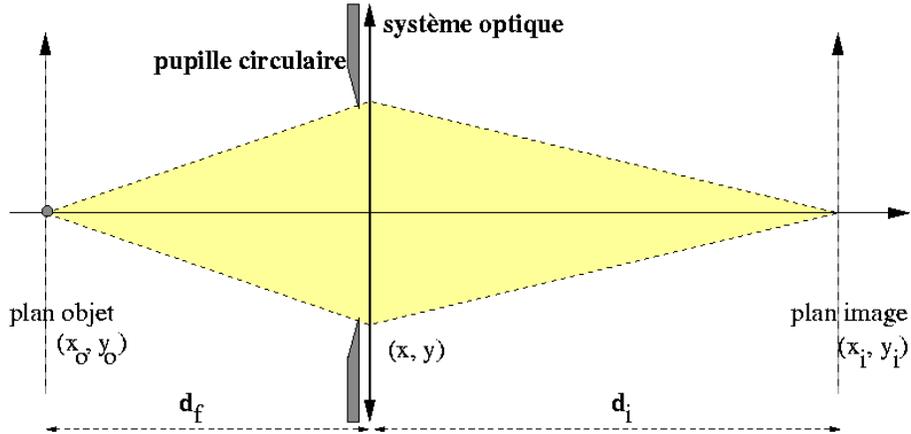


FIG. 2.11 – Un point source placé sur l'axe optique et dans le plan objet éclaire un système optique. Celui-ci est composé (pour simplifier) d'une lentille convergente et d'une pupille d'entrée circulaire. La distance entre le plan objet et le plan central défini par le système optique est  $d_f$  et la distance entre ce dernier plan et le plan image est  $d_i$ .

#### 2.4.2.1 La PSF et l'OTF

Nous allons utiliser les notations anglaises pour caractériser la fonction de transfert et la réponse impulsionnelle car ce sont celles que l'on retrouve le plus dans la littérature. Nous allons uniquement traiter des PSF et OTF en lumière incohérente car ce sont nos hypothèses de travail. Avant d'introduire ces fonctions, nous devons introduire la fonction pupille d'un instrument d'optique.

**2.4.2.1.1 La fonction pupille** La pupille d'entrée d'un instrument d'optique est le diaphragme qui limite le plus l'entrée de la lumière. Elle définit le faisceau conique le plus étroit issu d'un point source. A partir de la forme de ce diaphragme, on définit [Perez 95] la fonction pupille  $\varphi(x, y)$  de l'instrument. Elle caractérise le diaphragme en exprimant la surface qui laisse passer la lumière et celle qui ne la laisse pas passer. C'est une fonction qui donne des valeurs entre 0 (rien ne passe) et 1 (tout passe). Par exemple, pour une pupille circulaire de rayon  $r$ , la fonction pupille est donnée par l'Eq. 2.32 :

$$\varphi(x, y) = \begin{cases} 1 & \text{si } (x^2 + y^2) \leq r^2 \\ 0 & \text{si } (x^2 + y^2) > r^2 \end{cases} \quad (2.32)$$

Si on généralise en 2D la notation à 1D de l'Eq. 2.30, on a (Eq. 2.33) :

$$\varphi(x, y) = \prod \left( \frac{\sqrt{x^2 + y^2}}{r} \right) \quad (2.33)$$

On peut voir sur la Fig. 2.12 (a) ce que donne une telle fonction en deux dimensions.

#### 2.4.2.1.2 La PSF en lumière incohérente

D'après [Perez 95],

« On appelle PSF [...] la répartition de l'intensité dans le plan image lorsque l'objet est un point lumineux placé sur l'axe optique. »

On définit la PSF d'un système grâce à sa fonction pupille. En lumière monochromatique ( $\lambda$ ) incohérente, cela donne l'Eq. 2.34 :

$$h_i(x, y) = C^{ste} \cdot |\widehat{\varphi}(u, v)|^2 \quad (2.34)$$

où  $\widehat{\varphi}(u, v)$  représente la TF de  $\varphi(x, y)$ . Si  $z$  est un nombre complexe, sa norme au carré est représentée par  $|z|^2 = z \cdot \bar{z}$ ,  $\bar{z}$  le complexe conjugué de  $z$ .

Dans le cas où la fonction pupille est donnée par l'Eq. 2.33, la PSF  $h_i$  donne une fonction d'Airy (Eq. 2.35) :

$$h_i(x, y) = C^{ste} \left( \frac{\pi D^2}{4} J_{inc} \left( \pi \sqrt{x^2 + y^2} D \right) \right) \quad (2.35)$$

que l'on peut voir sur la Fig. 2.12 (b). On écrit la fonction  $J_{inc}(x) = 2 \frac{J_1(x)}{x}$  est la fonction «  $J_1$  cardinale » où  $J_1$  est la fonction de Bessel du premier ordre. Le premier zéro de la fonction de Bessel d'ordre 1 a lieu pour  $r = \sqrt{x^2 + y^2} = \frac{0.61 \lambda}{n_0 \sin(\alpha)}$  où  $n_0$  est l'indice de réfraction du milieu entre la lentille et l'échantillon, et  $\lambda$  la longueur d'onde du rayonnement utilisé. Les fonctions de Bessel sont généralement tabulées et leur expression analytique générale<sup>7</sup> est donné pour l'ordre  $n$  (Eq. 2.36) :

$$J_n(x) = \left( \frac{x}{2} \right)^n \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(-1)^k}{k! (n+k+1)!} \left( \frac{x}{2} \right)^{2k} \quad (2.36)$$

#### 2.4.2.1.3 L'OTF en lumière incohérente

La fonction qui caractérise l'instrument d'optique dans le plan des fréquences spatiales est la fonction de transfert incohérente (ITF). Elle correspond à la PSF à une TF près (Eq. 2.37) :

$$\underline{H}_i(u, v) = \text{TF} [h_i(x, y)] \quad (2.37)$$

Puisque  $h_i(x, y) = C^{ste} \cdot |\widehat{\varphi}(u, v)|^2$ , par définition de la norme au carré, on a (Eq. 2.38) :

$$\underline{H}_i(u, v) = C^{ste} (\varphi(x, y) * \bar{\varphi}(x, y)) \quad (2.38)$$

où  $\bar{\varphi}$  représente le complexe conjugué de  $\varphi$ . Si on normalise l'ITF, on obtient alors la fonction de transfert optique (OTF)  $H_i$  qui dépend elle-aussi de la fonction pupille de l'instrument :

$$H_i(u, v) = \frac{\int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \varphi(x, y) \cdot \bar{\varphi}(x - \lambda d_o u, y - \lambda d_o v) dx dy}{\int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \varphi(x, y) \cdot \bar{\varphi}(x, y) dx dy} \quad (2.39)$$

où  $d_o$  est la distance du point source à la pupille d'entrée de l'instrument (voir Fig. 2.11). C'est donc l'OTF qui nous intéressera le plus dans les chapitres 3 et 4. Un cas particulier important pour nous est le calcul de l'OTF d'un instrument à pupille circulaire.

7. <http://www.efunda.com/math/bessel/bessel.cfm>

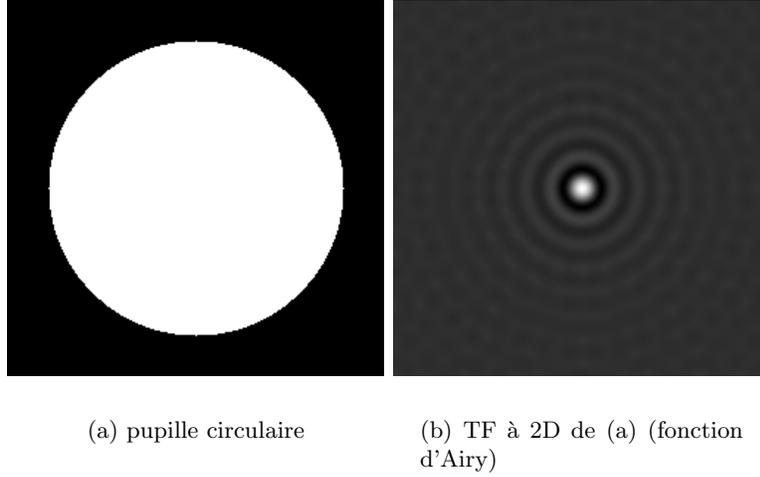


FIG. 2.12 – Illustration des résultats sur la pupille circulaire en 2D avec deux images calculées; (a) représente la pupille circulaire (noir: rien ne passe, blanc: tout passe) et (b) la fonction d'Airy correspondante. La fonction d'Airy a été grossie 5 fois pour que l'on distingue la figure de diffraction.

#### 2.4.2.2 Calcul de l'OTF d'une pupille circulaire

On peut trouver le calcul de l'OTF d'un instrument à pupille circulaire dans la plupart des livres qui traitent d'optique [Born 99] [Castleman 96] [Goodman 68] [Perez 95]. Nous n'allons pas le détailler à nouveau ici. Il faut noter que ce calcul est fait dans le cas où le plan objet n'est pas défocalisé. Pour une pupille circulaire de rayon  $r$ , on a [Goodman 68]:

$$H_i(\rho) = \frac{2}{\pi} \left[ \arccos\left(\frac{\rho}{2\rho_0}\right) - \frac{\rho}{2\rho_0} \sqrt{1 - \left(\frac{\rho}{2\rho_0}\right)^2} \right] \quad (2.40)$$

si et seulement si  $\rho \leq 2\rho_0$ .  $\rho = \sqrt{u^2 + v^2}$  et la quantité  $\rho_0 = \frac{r}{\lambda d_i}$  est la fréquence de coupure (voir la partie 2.6.3 pour la définition).

Si maintenant on a une **aberration**, comme une défocalisation  $\varepsilon$ , l'Eq. 2.4 devient (Eq. 2.41):

$$\frac{1}{d_i} + \frac{1}{d_o} - \frac{1}{f} = \varepsilon \quad (2.41)$$

La fonction d'aberration  $W(x,y)$  devient  $W(x,y) = \frac{\varepsilon \cdot (x^2 + y^2)}{2}$ . Cette fonction d'aberration intervient dans la définition de la fonction pupille de la manière suivante (Eq. 2.42):

$$\tilde{\wp}(x,y) = \wp(x,y) \cdot e^{-iW(x,y)} \quad (2.42)$$

où la fonction pupille est donnée par l'Eq. 2.33. Ce cas, beaucoup plus délicat à traiter dans le cas d'une pupille circulaire, peut faire apparaître [Born 99] des **inversions de**

**contraste** en fonction de  $W(x, y)$  : c'est une zone de l'OTF qui devient négative. Nous ne détaillerons pas le calcul ici, mais nous renvoyons le lecteur intéressé au chapitre 3 qui propose des références intéressantes à ce sujet.

Si on considère le flou comme une aberration, FitzGerrell *et al.* [FitzGerrel 97] écrivent (Eq. 2.43) :

$$W_{20} = \frac{\alpha^2}{2} \delta z = \frac{1}{2} \left( \frac{D}{2d_i} \right)^2 \delta z \quad (2.43)$$

$D$  est le diamètre de la pupille,  $d_i$  la distance du diaphragme au plan image,  $\delta z$  la défocalisation et  $\alpha$  l'angle maximal sous lequel est vu le diaphragme, depuis le point focal (se reporter à la Fig. 3.3). En posant  $u = \frac{2x}{D}$ , la nouvelle fonction pupille s'écrit (Eq. 2.44) :

$$Q(u) = \wp(u) e^{\frac{2i\pi}{\lambda} W_{20} u^2} \quad (2.44)$$

Le calcul qui en découle conduit à l'OTF d'une pupille circulaire.

### 2.4.2.3 Note sur le grossissement

Dans tout ce qui suit, le grandissement transversal  $G_t$  ne sera pas pris en compte, car un simple changement d'échelle permet de s'en affranchir. Ce n'est pas pour cela qu'il n'existe pas en réalité! Dans le plan image avec grandissement  $(X_i, Y_i)$ , ce changement d'échelle vers  $(x_i, y_i)$  se fait en posant les notations suivantes :  $x_i \equiv \frac{X_i}{G_t}$  et  $y_i \equiv \frac{Y_i}{G_t}$ . Nous reparlons du grossissement dans le chapitre 4.

## 2.5 Le microscope comme système optique

Dans cette première partie, nous commençons par introduire différents types de microscopes. En effet, bien que nous travaillons avec un microscope optique conventionnel, nous allons aussi par la suite présenter des travaux proches, mais qui n'utilisent pas nécessairement le même type de microscopie. Une majorité utilisera des microscopes optiques en lumière blanche (partie 2.5.2.1) ou en fluorescence (partie 2.5.2.2), mais nous verrons aussi des cas où des microscopes plus élaborés sont utilisés : c'est le cas par exemple du microscope à contraste de phase (partie 2.5.2.4) ou du microscope confocal (partie 2.5.2.3).

### 2.5.1 La fonction de transfert

On en a parlé au chapitre 2 plus en détails. C'est la fonction caractéristique du microscope, qui dépend de toute son optique, et des conditions d'expérience. Elle dépend entre autres, de la défocalisation et de la longueur d'onde. Nous allons parler des travaux effectués pour la détermination plus ou moins précise, ou la modélisation de cette fonction de transfert. Nous l'appelons OTF<sup>8</sup> (voir le chapitre 2) et nous détaillerons ces travaux dans la partie 3.2.

---

8. *Optical Transfer Function*

## 2.5.2 Différents types de microscopie optique

Il va de soi que la plupart des articles que nous allons présenter ici ne traitent pas rigoureusement du même sujet, c'est-à-dire la formation de l'image en utilisant un microscope optique. Très souvent, entre autres, les travaux présentés se servent d'autres types de microscopes. Nous allons les énumérer de façon non exhaustive en énonçant leur principales caractéristiques.

### 2.5.2.1 Microscope optique conventionnel

Le microscope optique conventionnel est un appareil optique avec un éclairage en lumière blanche, soit en transmission pour les spécimens translucides, soit en réflexion pour les spécimens opaques. Dans son principe, c'est le plus simple des microscopes et c'est celui qui nous intéresse le plus. Nous l'avons déjà présenté en détails dans le chapitre précédent (chapitre 2).

La lumière de l'éclairage est incohérente à pseudo-cohérente, polychromatique (lumière blanche). Elle est réfractée ou réfléchi, mais on ne s'intéresse pas aux rayonnements réémis comme pour le microscope optique en fluorescence (partie 2.5.2.2). La réfraction est très présente, et la profondeur de champ est faible, spécialement pour de forts grossissements (fortes ouvertures numériques). Les plans défocalisés apparaissent flous dans l'image et viennent la perturber.

Si on remplace la source de lumière blanche par un rayonnement qui n'a pas une longueur d'onde visible, on fait de la microscopie optique en fluorescence. C'est ce que nous allons voir dans la partie suivante.

### 2.5.2.2 Microscope optique en fluorescence

Le principe de la fluorescence nécessite une notion de mécanique quantique. Plaçons-nous à l'échelle atomique : chaque atome ou molécule possède un certain nombre de niveaux d'énergie d'excitation (discrétisation). Pour être excitée, la molécule doit recevoir une certaine énergie (voir Fig. 2.13). Cette énergie correspond à un photon de longueur d'onde  $\lambda$  selon  $E = \frac{h \cdot c}{\lambda}$ ,  $h$  étant la constante de Planck et  $c$  la célérité de la lumière dans le vide. Après un court instant, elle va se désexciter. La désexcitation va rendre la totalité de l'énergie reçue, mais pas nécessairement en une seule transition. Pour avoir  $E$ , on pourra avoir 2 photons de longueur d'onde  $\lambda_1$  et  $\lambda_2 \neq \lambda_1$ . L'intérêt est le suivant : on peut éclairer le spécimen dans une longueur d'onde  $\lambda$  invisible pour le capteur, et observer la lumière réémise par le spécimen à une longueur d'onde  $\lambda_1$  maintenant visible par le capteur. D'où une localisation spatiale très réduite du spécimen.

Le spécimen observé devient spontanément fluorescent, ou bien est marqué par un produit qui devient fluorescent à une certaine longueur d'onde. La lumière d'excitation

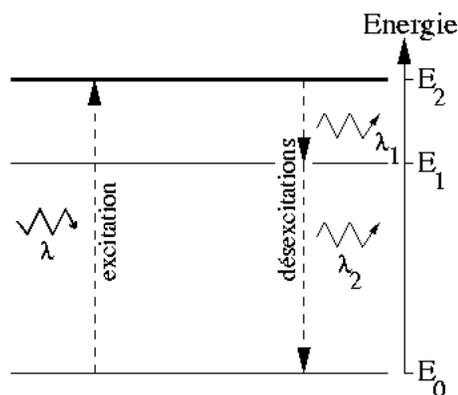


FIG. 2.13 – Schéma explicatif de la fluorescence : le rayonnement incident ( $\lambda$ ) est invisible pour le capteur. La molécule capte ce rayonnement et passe à un niveau excité (à gauche). Lors de la dés-excitation (à droite), il peut y avoir émission de 2 rayonnements ( $\lambda_1$  et  $\lambda_2$ ) au lieu d'un seul ( $\lambda$ ). L'un de ces 2 rayonnements (ou même les 2) peut alors être visible.

correspond généralement à cette longueur d'onde (qui n'appartient pas au visible). La lumière d'éclairage (monochromatique  $\lambda$ ) peut être cohérente (laser) ou incohérente (lampe) ; la lumière réémise est incohérente et monochromatique ( $\lambda' \neq \lambda$ ).

Chaque point du spécimen qui est fluorescent devient une petite source lumineuse visible incohérente, et de très faible intensité. Ce qui fait que la profondeur de champ efficace du microscope est assez réduite. La réfraction dans le spécimen est presque inexistante (dans une bonne approximation). Les phénomènes de flou dus à la défocalisation sont majoritaires : bien évidemment, le flou est bien moins important que dans le cas d'un microscope en lumière blanche en transmission. Les points source sont parfaitement localisés mais apparaissent flous. En lumière blanche en transmission, il n'y a pas une aussi bonne localisation de chaque partie du spécimen.

### 2.5.2.3 Microscope confocal

Le plus gros désavantage du microscope optique est qu'il a une faible profondeur de champ, spécialement à faible résolution [Draaijer 93, Ch. 12]. Le microscope confocal<sup>9</sup> utilise aussi la fluorescence. Le principe de la formation de l'image avec un tel microscope est étudié en détails dans [Sheppard 90]. Comme pour le microscope optique en fluorescence (partie 2.5.2.2), le spécimen est excité par un rayonnement qui le rend fluorescent. La différence fondamentale provient du système optique, très différent (voir 2.14). Afin de s'affranchir des zones du spécimen défocalisées, qui apparaîtraient floues, un système de miroir et un diaphragme très fin (*pinhole*) élimine les zones défocalisées. On montre

9. Voir <http://members.aol.com/Gfagot/MicroLaser/confocal1.html> pour une très bonne introduction en français.

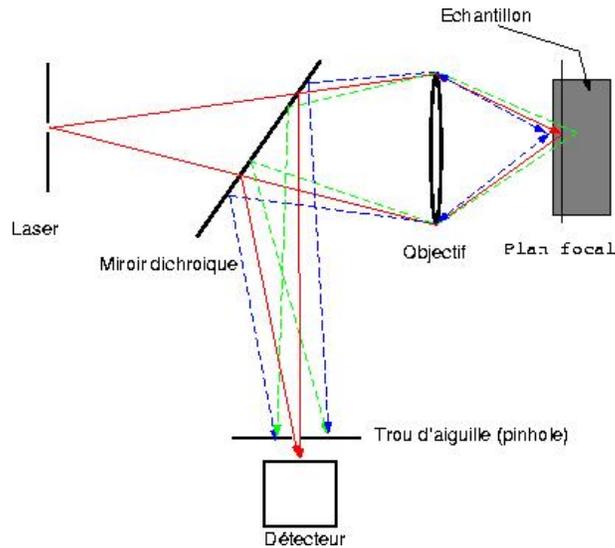


FIG. 2.14 – Principe du microscope confocal: les zones défocalisées ne sont pas prises en compte grâce à l'ouverture très faible (pinhole). Un miroir dichroïque est un miroir semi-transparent, qui laisse passer une certaine proportion de lumière et réfléchit le reste. (schéma d'après <http://www.inra.fr>)

[Carlson 90] [Brakenhoff 93] que la PSF est très proche d'un Dirac pour les zones focalisées, et que rien ne passe pour les zones défocalisées. Pour chaque image, le scanner du microscope balaye tout le spécimen et en extrait les zones nettes selon ce principe. Remarquons que l'image finale est une composition numérique, qui est représentée en fausses couleurs.

La lumière d'éclairage est cohérente (laser), et monochromatique. La lumière réémise est incohérente et monochromatique (pas nécessairement la même longueur d'onde et pas nécessairement visible). Comme pour le microscope à fluorescence, chaque point source est si faible en intensité qu'il n'est visible que dans un espace très réduit. De fait, la réfraction est très peu présente. Le flou est quasi-inexistant, comme nous l'avons vu ci-dessus.

#### 2.5.2.4 Microscope à contraste interférentiel (Normaski)

Le microscope à contraste interférentiel<sup>10</sup>, ou microscope de Normaski, est avant tout un microscope optique traditionnel, équipé en plus d'une paire polariseur-analyseur et de deux prismes (voir la Fig. 2.15). Le polariseur polarise la lumière (*i.e.* ne laisse passer que des radiations lumineuses ayant une propriété intrinsèque - « polarisation ») et le prisme de Wollaston a la particularité d'être biréfringent (*i.e.* d'avoir 2 indices de réfraction - voir [Feynman 98, Ch. 33]): un faisceau lumineux est alors séparé en 2 faisceaux lumineux,

<sup>10</sup>. Dans la littérature anglaise, cela correspond au « *Differential Interference Contrast (D.I.C.) microscope* ».

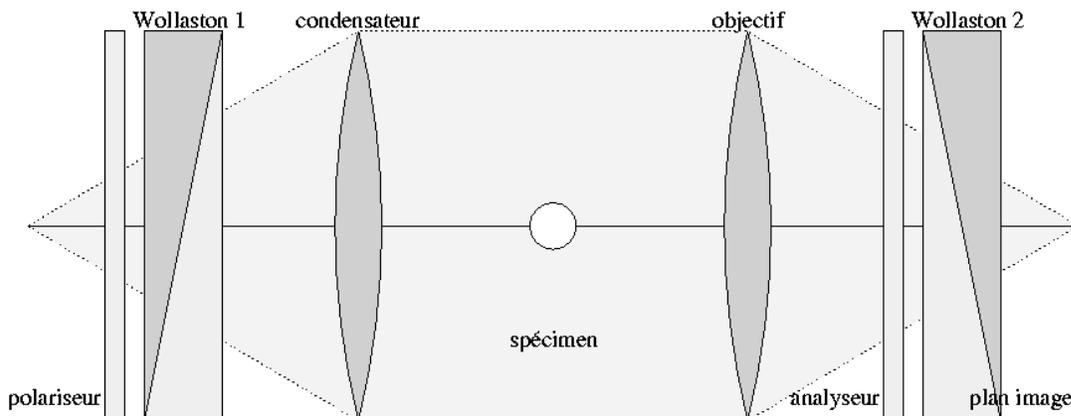


FIG. 2.15 – Schéma de principe du microscope à contraste interférentiel (schéma tiré de [Kagalwala 00b]) : la lumière est polarisée, puis passe à travers un prisme de Wollaston (il disperse la lumière selon des directions différentes, en fonction la polarisation de la lumière - voir [Perez 95] pour le principe). Elle est alors concentrée sur le spécimen observé, et traverse ensuite un autre polariseur (appelé analyseur cette fois) et un second prisme, avant d'atteindre le plan image.

cohérents entre eux.

Après avoir traversé le spécimen, la lumière traverse l'analyseur, un second polariseur, en fait, qui est réglé pour ne laisser passer que les faisceaux de lumière qui ont effectivement rencontré de la matière. L'image finale est une figure d'interférence.

C'est une technique de microscopie adaptée pour les spécimens translucides (bien que les travaux de Kagalwala *et al.* [Kagalwala 98] [Kagalwala 99b] [Kagalwala 00b] ne traitent que de spécimens transparents, sans absorption). L'éclairage est incohérent et polychromatique (lumière blanche). L'image obtenue donne une information sur la phase et l'amplitude de la lumière, pas seulement sur son intensité. Mais les informations défocalisées sont encore à prendre en compte.

### 2.5.3 Conclusion

Il y a bien sûr d'autres types de microscopes, comme les microscopes électroniques à balayage (MEB) ou à transmission (MET). Ils ne sont pas présents ici car relativement éloignés des longueurs d'onde qui nous intéressent. Par contre, ils sont capables (MEB) de fournir des images 3D (en fausses couleurs) d'étonnante qualité. Ce qu'il faut aussi retenir, c'est que ce genre de microscopie est très lourde et nécessite une métallisation des spécimens avant observation. Les coûts sont aussi très élevés. Il y a aussi le microscope 2-photons : bien que son fonctionnement soit très différent de celui du confocal (interférence de 2 photons issus de 2 sources), le résultat est quasiment le même : une PSF proche du Dirac.

Nous avons choisi de faire une étude bibliographique sur les microscopes D.I.C., fluorescents et conventionnels car les travaux présentés contiennent des thèmes très proches de notre sujet. Nous travaillons avec un microscope optique en lumière blanche, et nous observons des spécimens translucides. Nous sommes alors sujets à la réfraction et au flou. Le microscope optique en fluorescence (partie 2.5.2.2) est très simple et intéressant, car non seulement il fonctionne en lumière monochromatique, mais en plus il permet d'étudier le flou en s'affranchissant de la réfraction. Le microscope confocal est aussi très intéressant, car il est aussi utilisé en lumière monochromatique, et permet lui de s'affranchir du flou en plus de la réfraction.

## 2.6 Les mesures effectuées sur le microscope

Nous allons présenter le microscope optique que nous utilisons, et surtout les grandeurs physiques (grossissement, ouverture numérique, *etc.*) que nous pouvons mesurer. Ces grandeurs mesurées vont nous permettre de déterminer des caractéristiques plus importantes comme la profondeur de champ du microscope, son OTF, *etc.* Nous verrons aussi les caractéristiques de la source lumineuse qui permettent d'obtenir d'autres paramètres importants.

### 2.6.1 Le microscope optique

Nous allons étudier le microscope optique<sup>11</sup> que nous avons utilisé. Nous allons aussi donner les formules les plus usuelles qui se rapportent à ce système optique. Le schéma de la Fig. 2.16 montre le microscope avec ses grandeurs caractéristiques.

### 2.6.2 Valeurs numériques relatives au microscope

Nous terminerons en donnant les caractéristiques de l'objectif et du microscope que nous avons utilisé.

#### 2.6.2.1 Dimensions caractéristiques du microscope

Reprenons la Fig. 2.11. Pour un microscope, la relation entre  $d_f$  et  $d_i$  est la suivante  $d_i = G.d_f$  où  $G$  est le grossissement de l'objectif. Toujours pour un microscope,  $d_i$  est la *longueur mécanique* du tube (distance physique): elle vaut souvent 160 mm. Cela nous donne une *longueur optique* comprise entre 190 et 210 mm qui dépend du fabricant. Des objectifs pour des microscopes actuels présentent parfois la valeur  $\infty$  à la place de 160 mm, mais c'est hors de propos ici.

---

11. Nous recommandons vivement la visite du site Web suivant, qui est très complet en matière de microscopie : <http://www.microscopyu.com>

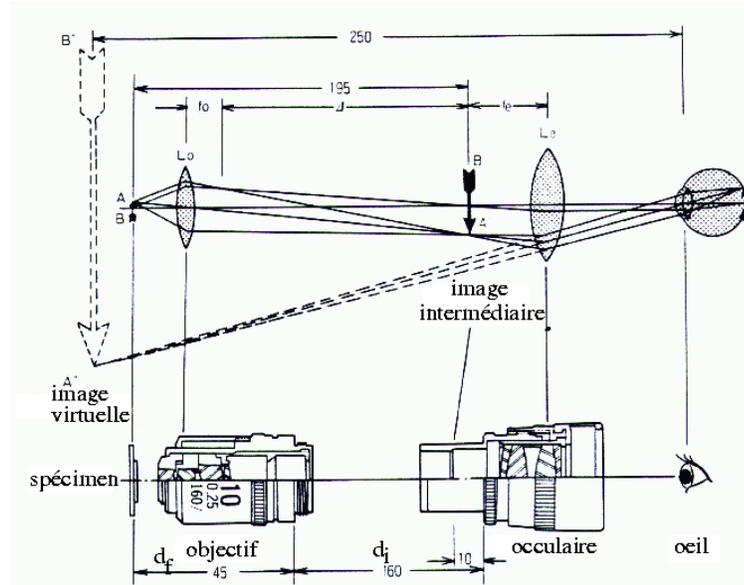


FIG. 2.16 – Schéma d'un microscope optique. Nous pouvons remarquer l'objectif, l'oculaire, les grandeurs  $d_i$  et  $d_f$  ainsi que le système optique équivalent. (source <http://www.nikon.com>)

### 2.6.2.2 L'objectif

L'objectif d'un microscope est en lui-même un système optique complexe : il présente plusieurs données intéressantes qui sont entre autres :

- la correction qui est appliquée est spécifiée sur l'objectif. En général, les objectifs sont au moins corrigés contre les aberrations chromatiques (Achromat est le plus répandu car le moins cher) ;
- l'immersion de l'objectif n'est pas obligatoire : seul les objectifs possédant de forts grossissements sont à immersion. Cela revient à placer une goutte d'huile d'un indice particulier  $n_0$  entre la première lentille de l'objectif et le spécimen étudié. Si l'objectif n'est pas à immersion (air), alors  $n_0 = 1.0$  (eau  $n = 1.33$  ou huile  $n = 1.515 - 1.6$ ) ;
- le grossissement  $G$  est la taille apparente en  $XY$  de l'image par rapport à la taille de l'objet ; un grossissement de  $40X$  correspond à une image 40 fois plus grosse que l'objet observé. Il faut faire attention au fait que ce grossissement est couplé au grossissement de l'oculaire, qui vaut  $10X$  en général, soit un grossissement total de  $400X$  ;
- l'ouverture numérique est définie par

$$ON = n_0 \cdot \sin \alpha \quad (2.45)$$

où  $\alpha$  est le demi angle du cône de lumière qui tombe sur l'instrument (voir la Fig. 3.3 (a)).

Avec seulement ces données, nous pouvons remonter à plusieurs grandeurs intéressantes. Généralement, on ne donne ni la focale  $f$  ni le diamètre  $a$  de la pupille, mais avec le grossissement  $G$  et l'ouverture numérique  $ON$  ( $d_i$  et  $d_f$  sont rappelés plus haut). On a l'équation 2.46 :

$$f = \frac{d_i}{G + 1} = d_f \frac{G}{G + 1} \quad (2.46)$$

Pour le diamètre  $a$  de la pupille on trouve, grâce à  $ON = n \sin(\alpha) \approx n \frac{a}{2d_f} \approx n \frac{a}{2f}$  où  $\alpha = \arctan(a/2d_f)$ . On trouve alors  $a = 2d_f \frac{NA}{n}$ .

Les valeurs numériques des microscopes utilisés dans notre cas sont les suivantes (Eq. 2.47) :

$$\begin{aligned} G = 60x \quad G = 40x \quad G = 20x \\ ON = 0.8 \quad ON = 0.65 \quad ON = 0.4 \\ n = 1.0 \\ d_i = 160 \text{ mm} \\ \lambda = 0.6 \mu\text{m} \end{aligned} \quad (2.47)$$

Nous les utiliserons pour donner des valeurs numériques. Avec les valeurs numériques de l'Eq. 2.47, on calcule  $a = 4,267 \text{ mm}$ ,  $f = 2,623 \text{ mm}$  pour un objectif 60x/0.8.

### 2.6.2.3 Profondeur de champ

Nous avons déjà introduit cette notion dans la partie 2.1.4, et nous allons la définir mathématiquement dans le cas d'un microscope. On suppose que l'on connaît son ouverture numérique  $ON$ , le demi angle du cône de lumière qui tombe sur l'instrument  $\alpha$  (voir Fig. 2.9) et la longueur d'onde  $\lambda$ .

La limite de diffraction d'un instrument d'optique est la taille limite (imposée par la diffraction) des détails qui peuvent être véhiculés par un instrument optique. D'après [Perez 95], cette taille limite s'écrit (Eq. 2.48) :

$$d_{min} = \frac{\lambda}{2ON} \quad (2.48)$$

Remarquons que la profondeur de champ dépend de la longueur d'onde. Si on choisit une longueur d'onde moyenne de  $0.6 \mu\text{m}$ , l'ordre de grandeur de la profondeur de champ est de  $d_{min} \approx 0.375 \mu\text{m}$ . Une autre remarque importante est que la profondeur de champ est inversement proportionnelle à l'ouverture numérique : elle diminue très fortement avec l'augmentation de l'ouverture numérique. Il faut donc préférentiellement travailler avec  $ON$  inférieur ou de l'ordre de 1. Nous verrons dans la partie 3.1.2 qu'il est possible d'utiliser des méthodes de traitement d'image pour augmenter la profondeur de champ.

### 2.6.3 La source lumineuse

Nous faisons donc l'hypothèse que les grandeurs relatives à l'objectif sont connues. Nous allons maintenant nous intéresser à la source lumineuse. La source lumineuse n'est pas à

proprement parler monochromatique, bien au contraire : un microscope optique traditionnel est éclairé au moyen d'une source halogène de forte intensité, qui contient toutes les longueurs d'onde du visible (illumination de Köhler). Mais dans une bonne approximation, on peut choisir un  $\lambda$  moyen : en effet, la plupart des microscopes ont une optique corrigée contre la dispersion de la lumière, et donc les aberrations chromatiques.

La plupart des fonctions mathématiques décrivant le microscope dépendent de la longueur d'onde, en particulier l'OTF. De plus, cela simplifie raisonnablement les calculs. La longueur d'onde  $\lambda$  que nous avons choisie est une longueur d'onde moyenne. Sous ces conditions, la fréquence de coupure incohérente [Castleman 96] est  $f_c = \frac{M a}{\lambda d_i} = \frac{a}{\lambda d_f} \approx 2 \frac{\text{ON}}{\lambda}$ .

## 2.7 Conclusion

Ce chapitre a été consacré à l'introduction à de nombreuses connaissances en physique et plus particulièrement en optique. L'optique de Fourier aura des applications conséquentes par la suite, et nous nous servirons de résultats présentés ici sans les redémontrer. Bien que nous utilisions l'optique ondulatoire, nous utilisons aussi l'optique géométrique dans le système à base de lancer de rayon présenté dans le chapitre 4. Il est aussi nécessaire d'avoir compris les notions relatives à la réfraction et à la défocalisation, car nous les utiliserons dès le chapitre 3 qui fait un état de l'art sur des méthodes qui les utilisent.

## Chapitre 3

# Etat de l'Art

TOUT au long de ce chapitre nous allons présenter des travaux intéressant notre sujet. Certains sont directement en rapport car ils traitent de formation d'image avec des systèmes optiques, et d'autres sembleront plus lointains, comme les sujets traitant de déconvolution. Mais tous ont eu de l'importance pour l'aboutissement du modèle qui sera présenté dans le prochain chapitre. Une partie étoffée sur la déconvolution d'objets microscopiques 3D nous permet d'étudier les modèles proposés pour la formation de l'image. En effet, avant de déconvoluer un objet, il faut comprendre le phénomène. Nous rappelons que cette thèse ne présente pas d'essais de déconvolution. Le présent chapitre est le plus complet possible mais demeure non exhaustif. Comme tout Etat de l'Art, il a été réalisé pour une époque précise (été 2002) et sera rapidement dépassé. Dans le chapitre 6, nous parlerons d'autres articles plus récents, et qui ouvrent des perspectives intéressantes sur la suite de nos travaux.

Nous commençons ce chapitre par une partie (partie 3.1) qui traite d'une caractéristique essentielle des microscopes optiques : la profondeur de champ. Nous présentons alors plusieurs modélisations de systèmes optiques (partie 3.2) avant de nous intéresser aux travaux qui traitent plutôt de formation de l'image (partie 3.3), en synthèse d'image, en vision par ordinateur ou dans d'autres domaines. La partie 3.4 montre comment ces modèles de formation de l'image sont utilisés en reconnaissance des formes, ou bien en reconstruction de volume. Ce sera la dernière partie avant la partie 3.5 qui conclue ce chapitre.

### 3.1 La profondeur de champ

Dans le chapitre 2, la profondeur de champ<sup>1</sup> est présentée en détails. C'est une grandeur qui donne une mesure très subjective de la zone de l'espace observé qui nous apparaît nette. Nous verrons que de nombreux travaux se sont intéressés à augmenter la profondeur de

---

1. Pour une introduction de la profondeur de champ en français et à une échelle macroscopique (photographie), le lecteur intéressé est renvoyé sur le site : <http://www.fundp.ac.be/~facphoto/technique/profond.html>.

champ, de manière optique, ou alors de manière numérique.

Dans cette partie, nous allons parler de profondeur de champ et des effets de flou qui se produisent lorsqu'on s'en éloigne. Nous allons tout d'abord voir les fondements de la profondeur de champ, et les différentes formules mathématiques qui sont proposées. Ensuite nous aborderons le lien entre le flou et la profondeur de champ, et nous verrons plusieurs techniques qui proposent de produire une profondeur de champ infinie, sans utiliser de microscope confocal. La profondeur de champ est très importante en vision par ordinateur et en microscopie, car dans une même image, on peut trouver des zones nettes (contenues dans la profondeur de champ) et des zones floues (en-dehors de la profondeur de champ). Ce qui nous intéresse en général, c'est de remonter à l'information 3D de la scène ou de l'objet, pour pouvoir mieux l'appréhender, le reconstruire, le positionner, *etc.* On trouve dans [Perez 95] la formulation la plus simple pour la profondeur de champ, donnée par l'Eq. 2.48.

### 3.1.1 Les bases de la profondeur de champ

Sheppard expose dans [Sheppard 88] ce qu'est la profondeur de champ en microscopie optique; comme nous l'avons dit dans le 2.1.4 et 2.6.2.3, la profondeur de champ est une grandeur très subjective. Il propose d'ailleurs plusieurs formulations de la profondeur de champ pour des microscopes. Pour de faibles ouvertures numériques  $ON$ , il présente ce qu'il appelle la « profondeur de champ simplifiée » (Eq. 3.1) :

$$\Delta z = C^{ste} \frac{\lambda}{ON^2} \quad (3.1)$$

avec  $\lambda$  la longueur d'onde. En considérant que la profondeur de champ diminue lorsque l'ouverture numérique s'approche de 1, on obtient une expression un peu plus précise (Eq. 3.2):

$$\Delta z = C^{ste} \frac{\lambda \sqrt{1 - ON^2}}{ON^2} \quad (3.2)$$

Ce ne sont encore que des expressions qui sont dérivées de l'optique géométrique. Si on se base sur la théorie de la diffraction, on obtient l'expression « exacte » la plus proche de la réalité (Eq. 3.3) :

$$\Delta z = 1.77 \frac{\lambda}{4 \sin^2\left(\frac{\alpha}{2}\right)} \approx 1.77 \frac{\lambda}{\alpha^2} \quad (3.3)$$

en utilisant l'approximation paraxiale et  $ON = n_0 \sin(\alpha)$  d'après l'Eq. 2.45.

Dans [Young 93], Young *et al.* introduisent une nouvelle formulation de la profondeur de champ dérivée de l'optique géométrique. Les auteurs montrent que les formulations habituelles de la profondeur de champ sont faussées si l'on travaille avec un système optique avec une forte ouverture numérique. Elle est presque équivalente à l'expression de l'Eq.

3.3 au facteur 1.77 près (Eq. 3.4) :

$$\Delta z = \frac{\lambda}{4n \cdot \left(1 - \sqrt{1 - \left(\frac{ON}{n}\right)^2}\right)} \quad (3.4)$$

avec les notations habituelles. Pour un microscope qui n'est pas à immersion d'objectif, avec une ouverture numérique de 0.80 et une longueur d'onde moyenne de  $0.6 \mu\text{m}$ , on obtient  $\Delta z = 0.375 \mu\text{m}$ .

### 3.1.2 Augmentation de la profondeur de champ

Comme le dit Sheppard [Sheppard 83, pp. 171] :

*«One of the major limitation of the optical microscope is the severely restricted depth of field, particularly with high magnifications and therefore with large numerical apertures.»<sup>2</sup>*

En effet, comme nous l'avons vu dans la partie 2.6.2.3, plus l'ouverture numérique est grande et plus la profondeur de champ est petite [Draaijer 93, Ch. 12]. De nombreux travaux ([Häusler 72] [Sheppard 83] [Pieper 83] [Sugimoto 85] [Poon 87] [Itoh 89]) s'intéressent à augmenter la profondeur de champ. L'idée est la suivante : sur chaque image d'une séquence, il existe une zone nette qui correspond à la profondeur de champ  $\Delta z$ . Dans ce cas, augmenter la profondeur de champ se réalise en récupérant des informations sur les autres images de la séquence, pour avoir de plus grandes zones nettes lors de l'observation.

#### 3.1.2.1 Les systèmes dédiés

Poon *et al.* proposent dans [Poon 87] une méthode pour augmenter la netteté d'un texte sévèrement défocalisé. Les auteurs utilisent une lentille annulaire (*i.e.* une lentille avec un cache circulaire dans son centre) mais pas de microscope. L'utilisation d'une lentille annulaire faisait partie des méthodes initiales pour augmenter la profondeur de champ.

Dans [Häusler 72], Häusler propose un post-traitement des images pour augmenter la profondeur de champ d'un microscope optique. Elle consiste en 2 étapes : la première consiste à produire une image « modifiée » de l'objet 3D, en éclairage incohérent ; sur une même plaque photographique, l'auteur prend une séquence d'images en faisant varier le focus du microscope. Il y a bien sûr une taille maximale d'intégration à respecter, pour éviter la surexposition. La seconde étape se résume à un filtrage cohérent, à l'aide d'un filtre numérique. La profondeur de champ est augmentée de  $0.23 \mu\text{m}$  à  $8 \mu\text{m}$  avec une

<sup>2</sup>« Une des plus grandes limitations du microscope optique est la profondeur de champ sévèrement restreinte, particulièrement avec de forts grossissements et donc une grande ouverture numérique. »

ouverture numérique de 1.32, ce qui est remarquable. Les objets observés sont des objets opaques.

Toujours en microscopie optique et avec des objets opaques, Sheppard *et al.* [Sheppard 83] proposent une méthode pour augmenter fortement la profondeur de champ. Les images obtenues sont de très bonne qualité et de très bonne résolution, très proches de celles que l'on pourrait obtenir avec un microscope électronique à balayage [Sheppard 83, pp. 185]. Le microscope optique utilisé est un microscope particulier qui permet de scanner les points de l'objet. Cette méthode est reliée aux propriétés d'un microscope confocal [Kimura 89] [Sheppard 90], si bien que le schéma de principe de ce microscope est identique à celui de la Fig. 2.14.

Nous avons vu quelques méthodes actives, consistant à modifier un microscope à la tâche d'augmentation de la profondeur de champ. Nous allons maintenant voir les méthodes uniquement numériques qui consistent à réaliser cette opération à partir d'une série d'images.

### 3.1.2.2 Les méthodes de traitements numériques

Dans [Pieper 83], Pieper *et al.* proposent une méthode pour générer des images composites nettes à partir d'images présentant des zones floues et des zones nettes. Les auteurs s'intéressent à des objets opaques. Chaque position du focus par rapport à l'objet donne une image qui est une répartition en intensité. Un algorithme de détection des zones nettes locales est alors déclenché sur cette image, et il ne retient que ces zones en question. En faisant varier le focus du système optique à travers l'objet, on arrive à avoir nette toutes ses zones visibles. Après cela, il suffit de les rassembler pour obtenir une image nette de l'objet, qui correspond à une profondeur de champ accrue.

Sugimoto *et al.* [Sugimoto 85] restent eux aussi dans ce thème en proposant 2 autres méthodes de traitement d'images pour augmenter la profondeur de champ. Les auteurs travaillent avec un microscope optique et observent des objets opaques. La première méthode utilise des pseudo-couleurs, sur des images initialement en niveaux de gris. En faisant varier le focus du microscope, on fait l'acquisition d'une séquence d'images d'un objet, qui présente des détails fins et un fort contraste (ils traitent une tête d'insecte). Chaque image de la série se voit affecter une pseudo-couleur, et toutes les zones nettes des images sont simultanément affichées sur un moniteur couleur avec un léger décalage qui permet la 3D. Cela conduit à construire une fausse 3D. Les détails (hautes fréquences) apparaissent de manière prépondérante sur les zones floues (basses fréquences). Cette opération permet d'augmenter grandement la compréhension de la 3D pour un opérateur humain. Cette méthode est à rapprocher de celle proposée par [Häusler 72].

La deuxième méthode proposée par Sugimoto *et al.* est une méthode qui considère la variance locale de chacune des images de la série pour en tirer les zones nettes. En effet, la

variance locale d'un pixel devient maximale lorsque les pixels voisins sont nets, et diminue lorsqu'ils sont flous. En se servant de ce critère pour extraire les zones nettes de chaque image de la série, et en les assemblant numériquement comme dans [Pieper 83], on obtient une image avec une grande profondeur de champ. A nouveau avec un microscope optique équipé d'une caméra CCD et couplé à un système numérique, Itoh *et al.* [Itoh 89] se servent eux-aussi de la variance locale des niveaux de gris pour réussir à recréer un objet composite 3D net, à partir d'une séquence d'images d'un objet opaque 3D.

### 3.1.3 Conclusion

Nous avons vu plusieurs définitions de la profondeur de champ qui montrent que c'est une grandeur qui est très subjective. Nous avons présentée des méthodes d'acquisition et des traitements numériques qui visent toutes la même chose : augmenter la profondeur de champ d'un système optique. C'est très souvent un microscope en lumière blanche. Ces méthodes sont intéressantes car elles sont en fait très proches des méthodes plus récentes, comme [Nayar 94], qui appartiennent à la lignée « *Shape from Focus/Defocus* » ou « *Depth from Focus/Defocus* » dont nous parlons dans la partie 3.4.1. Toutes ces méthodes donnent de bons résultats sur des objets opaques, mais si l'on s'intéresse à des objets translucides, il devient très compliqué d'isoler les zones nettes des zones floues [Tomczak 99a].

## 3.2 Modélisation du système optique

Un système optique est un appareillage qui va nous transmettre des images de la réalité. Ces images sont de plus ou moins bonne qualité, plus ou moins grossières, *etc.* tout cela étant en relation directe avec le système optique (qualité, grossissement, *etc.*). Un système optique est composé de diaphragmes et de lentilles, et l'exemple le plus évident est l'œil. Très souvent, ce système optique est couplé à une caméra CCD qui va se charger de numériser les images pour qu'elles soient exploitables directement sur un ordinateur.

Nous allons montrer comment le flou est utilisé pour modéliser les systèmes optiques (partie 3.2.1), et nous étudions plus particulièrement le cas des microscopes, en insistant sur les plus importants : les microscopes optiques en lumière blanche ou en lumière fluorescente (partie 3.2.2). Nous parlons aussi du microscope confocal (dans la partie 3.2.3) dans un but de comparaison, car il reste assez éloigné de notre sujet.

### 3.2.1 Modélisation du flou

La modélisation de la défocalisation se fait très souvent par une modélisation du flou : on suppose que le système est linéaire et on approxime sa réponse impulsionnelle par une fonction de flou. Différentes fonctions de flou sont utilisées dans des cas bien précis [Jähne 99, Vol.1, Ch. 4, pp. 98], en fonction de la précision souhaitée. Le modèle de flou le plus simple

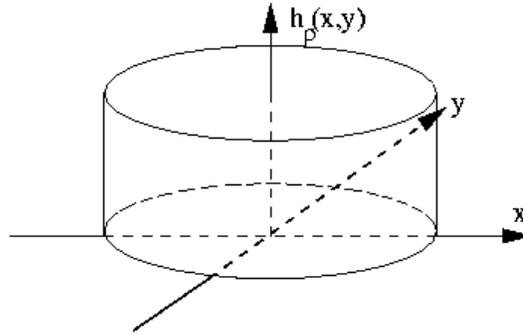


FIG. 3.1 – La PSF la plus simple pour modéliser le flou : une pillbox.

est le flou modélisé comme une fonction porte à 2 dimensions (*pillbox*) (partie 3.2.1.1). Un modèle un peu plus compliqué est celui de la gaussienne (partie 3.2.1.2) et pour des systèmes optiques dominés par des phénomènes ondulatoires, on a des fonctions de Bessel (partie 3.2.1.3).

### 3.2.1.1 La modélisation la plus simple

Si on défocalise une image, un point de l'objet ne donne pas un point dans le plan image, mais une tache circulaire (voir Fig.2.5). En effet le point de convergence de la lumière se situe un peu en avant ou un peu en retrait du plan image, qui coupe le cône lumineux qui en émane en un cercle. On peut donc modéliser la PSF comme une fonction *pillbox* comme l'explique Horn dans [Horn 86] et [Horn 89]. La définition de cette fonction (fonction porte) est donnée par l'expression de la pupille circulaire (Eq. 2.33).

L'Eq. 2.33 s'applique à ce système optique (une lentille convergente) et s'écrit (Eq. 3.5) :

$$h_p(x, y) = \begin{cases} \frac{1}{\pi R^2} & \text{si } (x^2 + y^2) \leq R^2 \\ 0 & \text{si } (x^2 + y^2) > R^2 \end{cases} \quad (3.5)$$

où  $R = \frac{1}{2} \frac{d}{f'} e$  est le rayon de la tache de flou dans le plan image. On note  $d$  le diamètre de la pupille (qui se comporte comme un diaphragme,  $f'$  la distance de la lentille au point de convergence de la lumière et  $e$  le déplacement du plan image. Les travaux de Pentland [Pentland 87] sur la largeur géométrique de la tache de flou en fonction de la défocalisation (voir la partie 3.4.1.2) sont souvent associés à cette formulation.

Horn [Horn 86] donne aussi l'OTF correspondant à un tel système (Eq. 3.6) :

$$H_p(\rho) = 2 \frac{J_1(R\rho)}{R\rho} \quad (3.6)$$

avec  $J_1$  la fonction de Bessel du premier ordre et  $\rho^2 = u^2 + v^2$ . C'est un modèle simple mais assez récurrent en Vision par ordinateur ([Horii 92] [Ens 93] [Noguchi 94] [Nayar 95]).

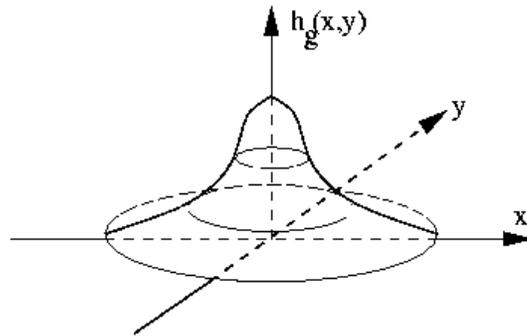


FIG. 3.2 – La PSF d'un système optique représentée comme une gaussienne.

### 3.2.1.2 Le flou gaussien

Un modèle de flou assez répandu en Vision par ordinateur [Nayar 94] [Rajagopalan 97b] [Rajagopalan 97a] [Tomczak 99a] est le modèle de flou gaussien. Il est un peu plus complexe que le modèle de *pillbox* développé en partie 3.2.1.1, et se présente sous la forme donnée par l'Eq. 3.7 :

$$h_g(x, y) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\frac{x^2+y^2}{\sigma^2}} \quad (3.7)$$

avec  $\sigma$  l'écart-type. En reprenant les mêmes notations que pour l'Eq. 3.6, on obtient l'OTF correspondante (Eq. 3.8) :

$$H_g(\rho) = e^{-\frac{1}{2}\rho^2\sigma^2} \quad (3.8)$$

Les calculs sont développés dans [Horn 86] et la courbe représentative de cette fonction est donnée sur la Fig. 3.2.

### 3.2.1.3 Les modèles plus appliqués à l'optique ondulatoire

Si l'on cherche des modèles d'OTF précis, les modèles géométriques peuvent présenter des limitations [Lee 90] : les courbes représentatives des fonctions obtenues de façon géométrique ou bien ondulatoire ont approximativement la même forme, mais les maxima locaux ne correspondent pas toujours. Quand les phénomènes ondulatoires dominent, il faut prendre une fonction plus précise [Jähne 99, Vol. 1, Ch. 4], comme celle présentée dans la partie 2.4.2. La réponse impulsionnelle est alors modélisée par une fonction d'Airy. Nous allons étudier ce modèle dans la partie 3.2.2.

## 3.2.2 OTF d'un microscope

Nous allons étudier plus en détails les modèles de flou utilisés lorsque les phénomènes ondulatoires dominent, en prenant le cas d'un microscope optique. De nombreux travaux traitent de la modélisation de la PSF ou de l'OTF de microscopes ([Hopkins 55] [Stokseth 69] [Gibson 89]) car c'est un des systèmes optiques les plus utilisés. Nous verrons

successivement la modélisation originale (partie 3.2.2.1), puis les améliorations proposées (partie 3.2.2.2) dans le cas général, pour des objets loin de l'axe optique (partie 3.2.2.3) et pour un éclairage en lumière blanche (partie 3.2.2.4).

### 3.2.2.1 Modélisation originale de l'OTF d'un microscope

En 1955, Hopkins [Hopkins 55] propose une méthode analytique qui conduit à l'expression de l'OTF correspondant à un instrument d'optique possédant une pupille circulaire. Son modèle tient compte de la défocalisation d'un tel système, et il l'applique à un microscope optique.

En partant des définitions de l'OTF rappelée dans la partie 2.4.2.2, et en posant toujours  $\rho^2 = u^2 + v^2$ , il propose l'expression de l'OTF non défocalisée d'un instrument d'optique éclairé en lumière incohérente (Eq. 3.9) :

$$H_h(\rho, 0) = \frac{1}{\pi} [2\beta(\rho) - \sin(2\beta(\rho))] \quad (3.9)$$

avec  $\beta(\rho) = \arccos \frac{\rho}{2f_c}$ ,  $f_c = 2\frac{NA}{\lambda}$  étant la fréquence de coupure incohérente (voir la partie 2.6.3). Ensuite, en partant de l'Eq. 2.42, il obtient l'expression analytique exacte de l'OTF d'un instrument à pupille circulaire défocalisée, donnée par l'Eq. 3.10 :

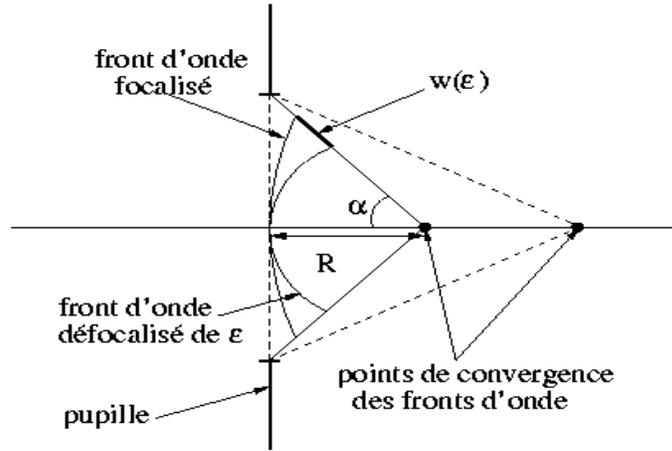
$$H_h(\rho, \varepsilon) = \frac{4}{\pi \bar{w}(\varepsilon)} \times \left[ \cos\left(\bar{w}(\varepsilon) \cdot \frac{\rho}{f_c}\right) \cdot \left\{ \beta(\rho) \cdot J_1(\bar{w}(\varepsilon)) + \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^{n+1} \frac{\sin(2n\beta(\rho))}{2n} [J_{2n-1}(\bar{w}(\varepsilon)) - J_{2n+1}(\bar{w}(\varepsilon))] \right\} \right. \\ \left. \dots - \frac{4}{\pi \bar{w}(\varepsilon)} \sin\left(\bar{w}(\varepsilon) \cdot \frac{2\rho}{f_c}\right) \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \frac{\sin((2n+1)\beta(\rho))}{2n+1} [J_{2n}(\bar{w}(\varepsilon)) - J_{2n+2}(\bar{w}(\varepsilon))] \right] \quad (3.10)$$

avec  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ , la norme du vecteur d'onde. Lorsque  $\varepsilon \rightarrow 0$ , on montre simplement (à l'aide du développement limité des fonctions de Bessel de l'Eq. 2.36) que l'Eq. 3.10 tend vers l'Eq. 3.9.

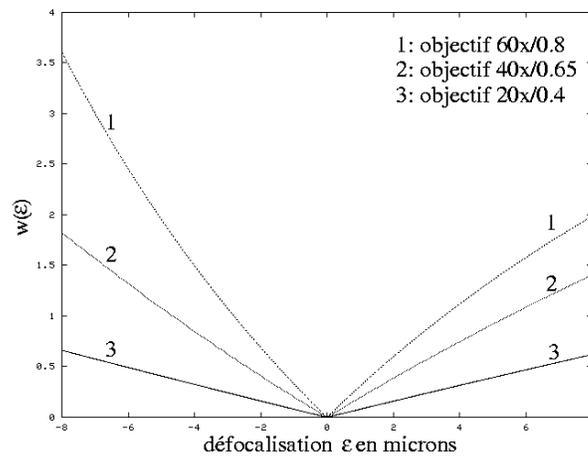
Hopkins note (Eq. 3.11) :

$$w(\varepsilon) = -d_f - \varepsilon \cos(\alpha) + \sqrt{d_f^2 + 2d_f\varepsilon + \varepsilon^2 \cos^2(\alpha)} \quad (3.11)$$

l'expression  $\cos(\alpha) = \sqrt{1 - \frac{ON^2}{n_0}}$  étant tirée de la définition de l'ouverture numérique (Eq. 2.45). En dimensions réduites,  $w(\varepsilon)$  devient  $\bar{w}(\varepsilon) = 2k w(\varepsilon)$ . Evidemment,  $n_0$  est l'indice du milieu entre la lame microscopique et l'objectif du microscope (voir la partie 2.6.2.2),  $ON$  l'ouverture numérique du microscope et  $\lambda$  la longueur d'onde du rayonnement utilisé. Cette formule est très complète mais n'est pas simple à utiliser car elle comporte des séries (infinies) de fonctions de Bessel. Les fonctions de Bessel sont les fonctions notées  $J_n$  où  $n$  est l'ordre de la fonction. L'expression générale d'une fonction de Bessel d'ordre  $n$  est donnée par l'Eq. 2.36.



(a) différence de fronts d'ondes



(b) valeurs numériques

FIG. 3.3 – La distance maximale entre un front d'onde focalisé et un front d'onde défocalisé de  $\epsilon$  se mesure grâce à la fonction  $w(\epsilon)$ . (a) représente l'approche théorique et (b) les valeurs numériques pour différents objectifs de microscope.

La fonction  $w(\epsilon)$  est particulière : elle mesure la distance maximale entre un front d'onde focalisé et un front d'onde défocalisé de  $\epsilon$ . Nous avons représenté cette grandeur d'après le schéma de [Young 93, pp. 498] sur la Fig. 3.3 (a). Cette figure permet aussi de représenter l'angle  $\alpha$  que l'on trouve dans l'Eq. 3.11 par exemple. Nous avons représenté sur la Fig. 3.3 (b) les courbes représentatives de la fonction  $w(\epsilon)$  pour différents objectifs : pour des défocalisations de quelques microns, l'asymétrie est plus prononcée pour des objectifs plus puissants (60x) et presque inexistante pour des objectifs moins puissants (20x).

### 3.2.2.2 Les améliorations à la formulation originale

En 1969, Stokseth [Stokseth 69] améliore le modèle d'OTF de Hopkins, en montrant que celui-ci n'est pas symétrique selon la défocalisation, contrairement à ce qu'Hopkins avait avancé. La fonction analytique est symétrique en  $z$ , mais si l'on remplace ce  $z$  par la défocalisation  $\varepsilon$  qui elle, n'est pas une fonction symétrique, il en découle tout naturellement une OTF qui n'est pas symétrique en  $\varepsilon$ . De plus, il en déduit une approximation avec des coefficients empiriques, beaucoup plus simple à utiliser, et aussi très précise quelle que soit la défocalisation ; elle a l'expression suivante (Eq. 3.12) :

$$H_s(\rho, \varepsilon) = (1 - 0.69 s + 0.0076 s^2 + 0.43 s^3) \times Jinc \left[ 4k w(\varepsilon) \left(1 - \frac{s}{2}\right) \frac{s}{2} \right] \quad (3.12)$$

où  $Jinc(x) = 2\frac{J_1(x)}{x}$  et  $s$  est une fréquence spatiale réduite (voir [Stokseth 69] pour plus de détails).

Les coefficients du troisième ordre du polynôme de l'équation 3.12 ont été choisis de manière à rendre cette approximation précise pour  $w(\varepsilon) \geq 5\lambda$ . La valeur pour  $w(\varepsilon) = 0$  de cette fonction diffère un peu de la réalité (Eq.3.9).

Castleman [Castleman 96] a établi l'approximation suivante, plus précise que l'Eq. 3.12 pour les petites défocalisations :

$$H_c(\rho, \varepsilon) = \frac{1}{\pi} [2\beta(\rho) - \sin(2\beta(\rho))] \times Jinc \left[ \frac{8\pi w(\varepsilon)}{\lambda} \left(1 - \frac{q}{f_c}\right) \frac{q}{f_c} \right] \quad (3.13)$$

Lorsque l'on travaille en faible profondeur de champ, on n'a à faire qu'à de petites défocalisations. De plus, nous avons vu dans la partie 2.5.2.2, que le microscope optique utilisé en fluorescence permet d'observer des objets très localisés, et qui émettent faiblement de la lumière : ils n'ont donc pas une grande portée, et on peut alors considérer que la défocalisation maximale n'est pas très forte. Dans la limite où la défocalisation tend vers 0, on retrouve bien l'expression de l'OTF non défocalisée de l'Eq. 3.9. C'est l'approximation de Castleman qui a intéressé Agard dans ses travaux [Agard 84a] [Agard 89] [Koshy 90], car il travaille en fluorescence, et donc seules les zones proches du focus sont à prendre en compte.

### 3.2.2.3 Pour des objets loin de l'axe optique

La formulation initiale de Hopkins [Hopkins 55] et celles qui en ont découlé directement [Stokseth 69] [Castleman 96] sont très précises pour des points situés près de l'axe optique. Or, si on s'intéresse à des points qui s'écartent de l'axe optique, on a besoin d'affiner le modèle. Dans le but d'utiliser une OTF très précise pour faire du découpage optique, Gibson *et al.* [Gibson 89] ont repris la modélisation de l'OTF du microscope pour des points situés loin de l'axe optique. Ils reprennent donc le cheminement d'Hopkins pour établir une OTF valable pour des points proches de l'axe optique, et ils proposent aussi leur

cheminement pour arriver à leur OTF. Ces deux fonctions ne diffèrent que très peu. Nous renvoyons le lecteur intéressé à cette référence qui décrit aussi les formulations d'autres OTF, sous des conditions différentes, que l'on peut trouver dans la littérature. La plupart des travaux (comme par exemple [Agard 84a] [Erhardt 85]) utilisent l'approximation faite par Stokseth de la formulation d'Hopkins. L'analyse de l'OTF faite par Frieden [Frieden 67] essaie aussi de prendre en compte les points situés loin de l'axe optique. Il propose une théorie qui détermine l'espace image d'un objet 3D, en lumière cohérente comme en lumière incohérente. Il montre que dans les deux cas, l'espace image obéit aux lois de la convolution comme dans le cas d'un objet 2D.

### 3.2.2.4 En lumière blanche

Dans [Pentland 87], Pentland propose un modèle de PSF pour un système optique simple. Pour une lumière monochromatique, il écrit la PSF du système comme une combinaison de fonctions de Bessel (se reporter à [Pentland 87] pour plus de détails) grâce à [Born 99]. Le point très intéressant est le fait qu'il écrit que la PSF en lumière blanche peut être comparée à une gaussienne :

*«Although this point spread function is quite complex, and the sum over different wavelengths even more so, our analysis shows that for white light the sum of the various functions obtained at different wavelengths has the general shape of a **two-dimensional Gaussian**.»<sup>3</sup> [Pentland 87, pp. 530]*

Dans [Boddeke 94], les auteurs montrent qu'un microscope est un système optique corrigé, et qu'en lumière blanche, il peut être comparé à un S.L.I.T.<sup>4</sup> En ce qui concerne la cohérence de la lumière pour un microscope optique, elle n'est ni complètement cohérente ni complètement incohérente [Streibl 85] : on dit qu'elle est partiellement cohérente.

### 3.2.2.5 Conclusion

Nous n'avons présenté ici que les travaux qui nous ont directement intéressé pour notre travail. Signalons que d'excellents ouvrages regroupant des reproductions de tous les papiers fondateurs sur le calcul de l'OTF de systèmes optiques peuvent apporter des compléments à tout ce que nous avons décrit ici. Ils peuvent être trouvés sous les références [Baker 92] et [Mahajan 94] et regroupent les principales citations que nous avons faites ici. La défocalisation est l'aberration majeure (mais quasi-inévitable) à laquelle nous avons eu à faire face. Dans [De 55], l'auteur montre que l'astigmatisme limite le pouvoir de résolution

<sup>3</sup> « Bien que cette PSF soit plutôt complexe, et la somme sur les différentes longueurs d'ondes encore plus, notre analyse montre que pour de la lumière blanche, la somme des fonctions obtenues pour chaque longueur d'onde **a la forme générale d'une gaussienne 2D**. »

<sup>4</sup> Système Linéaire Invariant par Translation : cela signifie que l'on peut modéliser la formation de l'image sous la forme d'une convolution de l'objet par la PSF du système.

de l'instrument et propose une version adaptée de l'OTF. Dans [Hopkins 84], Hopkins propose à nouveau un modèle d'OTF adapté dans le cas de la présence d'aberration de coma. Dans ce cas, l'OTF n'est plus uniquement réelle mais présente une partie imaginaire. Le modèle d'OTF peut donc devenir très compliqué, et nous avons supposé que seule la défocalisation intervenait de manière notable, et nous ne tiendrons pas compte des autres aberrations dans la suite.

### 3.2.3 Conclusion

Nous avons donc présenté de nombreux travaux fondateurs qui proposent des modélisations intéressantes du flou (partie 3.2.1) ou plus précisément de l'OTF du système optique (partie 3.2.2). Certains travaux comme [Hopkins 55] [Stokseth 69] [Castleman 96] donnent même une fonction analytique de l'OTF d'un microscope optique. Cela nous permet de mieux comprendre le phénomène de flou qui vient perturber l'image. En effet, la profondeur de champ n'est pas infinie, et donc certaines parties du spécimen ou de la scène observée sont défocalisées.

En microscopie, un moyen pratique d'obtenir une profondeur de champ quasi-infinie (et donc d'éviter tout flou) est d'utiliser un microscope confocal (voir la partie 2.5.2.3). Il est donc relativement simple de reconstruire un spécimen dans sa totalité à partir d'une séquence d'images. De nombreux auteurs [Kimura 89] [Carlson 90] [Sheppard 90] [Brakenhoff 93] se sont intéressés à formuler une expression adéquate de l'OTF de ces microscopes. Dans [White 87], White *et al.* démontrent la supériorité du confocal sur le microscope conventionnel, justement grâce à l'absence de flou. Le microscope confocal peut éliminer le signal fluorescent en provenance d'autres plans objet<sup>5</sup> grâce à un diaphragme *pinhole*. En l'absence de flou, une reconstruction 3D est possible [Laurent 92].

## 3.3 La formation de l'image

Pour proposer un modèle de formation de l'image, il faut avoir étudié le système optique. C'est ce que nous avons fait dans la partie 3.2. Nous nous intéressons maintenant à la formation de l'image, et nous allons présenter les travaux qui traitent d'interactions entre lumière et matière.

La façon la plus simple de modéliser ces interactions est peut être à l'aide de l'optique géométrique (partie 3.3.1). Ces approches sont généralement utilisées en vision par ordinateur [Pentland 87] ou bien en lancer de rayons [Kolb 95]. Ces interactions peuvent aussi être vues sous forme intégrale, à partir des équations de l'optique ondulatoire [Streibl 85], ou bien plus simplement traitées avec l'optique de Fourier [Agard 83] (partie 3.3.2).

---

5. [http://www.inra.fr/bia/J/imaste/Projets/AI2M\\_v2/node10.html](http://www.inra.fr/bia/J/imaste/Projets/AI2M_v2/node10.html)

### 3.3.1 Approche géométrique

Les auteurs utilisent très souvent l'approche géométrique pour étudier la formation de l'image. En effet, c'est une approche intuitive qui demeure relativement précise : la lumière est vue comme une succession de rayons lumineux qui se déplacent en ligne droite. Cette méthode est utilisée en synthèse d'image pour du lancer de rayons (partie 3.3.1.1), ou alors, combinée avec une carte de luminosité en *photon mapping* (partie 3.3.1.2).

#### 3.3.1.1 Le lancer de rayon

En synthèse d'images, les étapes de la formation de l'image (dans le sens où nous l'entendons) sont les suivantes : tout d'abord, on modélise la scène comme étant composée d'objets, eux-mêmes composés de formes géométriques plus simples (cubes, sphères, elles, *etc.*). Pendant cette phase de modélisation, on peut raffiner les objets en jouant sur le nombre de facettes<sup>6</sup>, leur position, ... C'est lors de cette phase que l'on peut décrire les objets de la scène en terme de média<sup>7</sup> [POV-Ray 99]<sup>8</sup> ; par exemple, pour un objet translucide, nous pouvons lui définir son indice de réfraction, son absorption, *etc.* L'étape suivante consiste à placer une ou plusieurs sources de lumière dans la scène, ainsi qu'au moins un point de vue : c'est l'observateur [Watt 92] [Watt 00].

Le lancer de rayons [Whitted 80] [Cook 84] est la technique la plus intuitive qui soit, puisque l'on va suivre le trajet des rayons lumineux en respectant les lois de Descartes (voir la partie 2.1) pour les réfractions et les réflexions. Pour optimiser la vitesse de calcul des images par le lancer de rayons, les rayons sont lancés de l'observateur vers la source lumineuse ; en effet, les rayons émis par la source lumineuse et qui n'atteignent pas l'observateur sont très nombreux.

Un thème qui nous intéresse particulièrement est la simulation du flou. Puisque le lancer de rayon est sensé suivre le trajet de la lumière de l'observateur à la source, il est bien obligé de passer à un moment à un autre par un système optique<sup>9</sup> comme une caméra [Kolb 95] par exemple. Kob *et al.* [Kolb 95] modélisent une caméra comme une succession de lentilles et de diaphragmes pour obtenir un modèle physique. Les auteurs se basent sur les lois de l'optique géométrique et arrivent ainsi à simuler la profondeur de champ, et donc le flou qui apparaît en dehors de cette profondeur de champ. Dans [Fearing 96], Fearing introduit une nouvelle façon de calculer la profondeur de champ. Son algorithme calcule d'abord les effets de la profondeur de champ qui sont les plus remarquables, et progresse dans les zones dans lesquelles les effets sont de moins en moins important. Cette

6. Une facette est un élément de surface élémentaire, souvent sous forme de triangle.

7. Le médium d'un objet, selon [POV-Ray 99], est le matériau dont est fait l'objet. Il s'agit évidemment d'un modèle de matériau qui se rapproche le plus possible de l'apparence du matériau réel.

8. <http://pov.monde.free.fr/povdocfr/textures/povfr-photon-01.htm>

9. Si on veut le modéliser bien-sûr, car le but de la synthèse d'image n'est pas obligatoirement de fournir des images physiquement vraies, mais des images physiquement réalistes. Elles doivent convenir, ne pas trop choquer un oeil humain.

progression se fait en fonction du temps de calcul, et l'auteur destine surtout son travail à des animations.

Pour avoir un modèle géométrique de lentille plus précis, Heidrich *et al.* [Heidrich 97] proposent un modèle de caméra qui est capable de simuler des propriétés compliquées des lentilles ; il s'agit en particulier de la profondeur de champ et d'abérations comme la distorsion, ou le vignettage. Ce modèle n'utilise pas du lancer de rayons classique mais approxime le champ lumineux entre la lentille et le plan image.

La synthèse d'images s'intéresse surtout à des scènes (donc des objets) macroscopiques, plus rarement microscopique. Il faut se tourner vers les travaux de Kagalwala *et al.* [Kagalwala 98] [Kagalwala 99b] [Kagalwala 99a] pour y voir une application microscopique : les auteurs simulent les effets d'un microscope à contraste d'interférences sur des spécimens transparents. Leur modèle est assez proche de la physique car il décrit les rayons lumineux de façon plus précise. Un rayon lumineux est ainsi composé d'un vecteur champ électrique  $\vec{E}$  et d'un vecteur champ magnétique  $\vec{B}$ . Cela leur permet de simuler les interférences de la lumière et aussi sa polarisation, c'est-à-dire des phénomènes plus « ondulatoires ».

### 3.3.1.2 Le *photon mapping*

Le « *photon mapping* » est une technique qui a moins d'une dizaine d'années [Jensen 95] et qui fait partie de la tendance de la synthèse d'image réaliste (*i.e.* qui simule les phénomènes physiques le mieux possible). Par exemple, pour reproduire rigoureusement une caustique<sup>10</sup>, il a fallu attendre le *photon mapping* [POV-Ray 99] de Jensen. Le *photon mapping* [Jensen 01b] est une méthode qui se compose essentiellement de deux passes :

- La première passe est la passe dite de « lancer de photons »<sup>11</sup> ; elle va permettre de construire la *photon map* relative à la scène en suivant le trajet de photons. Contrairement au lancer de rayons, les photons sont lancés de la source lumineuse vers la scène ; les photons propagent un flux lumineux. En tout point de l'espace, le photon est propagé, réfracté ou réfléchi, et son intensité lumineuse est enregistrée dans la *photon map*. L'intensité totale de la scène n'est pas la somme de l'intensité de tous les points de la *map*, mais seulement l'intensité totale de la source lumineuse ;
- La seconde est la phase de rendu qui utilise les informations de la *photon map* pour être plus performante. Pour cela, on utilise un moteur de lancer de rayons classique qui se sert de la *photon map* pour construire l'image finale. Les rayons sont lancés de l'observateur vers la scène ; avec un *ray tracer* sans *photon map*, le rayon est pris en compte si après ses réflexions/réfractions il rencontre une source lumineuse. Avec

10. Lieu géométrique des points d'intensité maximale après la traversée d'une lentille. Ce sont par exemple les effets très lumineux et assez chaotiques au fond d'une piscine en mouvement, en journée.

11. « *photon tracing* » dans la littérature en anglais.

une *photon map*, le rayon est pris en compte si il frappe au final un point de la *photon map* qui n'est pas d'intensité nulle. Avec cette méthode, les caustiques sont très faciles à calculer.

Les effets de transparence sont aussi très bien simulés avec le *photon mapping* [Jensen 01a]. A l'échelle macroscopique, les auteurs arrivent à simuler avec une très grande précision l'effet de transparence de surface d'une statue de marbre ou d'un verre de lait.

### 3.3.2 Approche ondulatoire

Nous présentons ici des travaux dans lesquels la formation de l'image est vue de façon plutôt ondulatoire. Il s'agit seulement de modéliser l'image comme le résultat d'une convolution. C'est une approche un peu plus ondulatoire que la précédente, mais le système optique est toujours vu de manière géométrique pour modéliser le flou. Une image est vu comme le résultat de la convolution de la scène par un modèle de flou (gaussien ou *pillbox* généralement), adapté au système optique.

En vision par ordinateur, la plupart du temps on veut interpréter une scène macroscopique, ou alors améliorer sa perception. Dans les deux cas, un modèle de formation de l'image est nécessaire. Les cas les plus courants sont le traitement de scènes macroscopiques (opaques) ou alors seulement d'objets opaques. Dans tous les cas, les modèles de formation de l'image sont relativement simples et géométriques : la caméra est considérée comme un système linéaire qui va rendre floues les parties de la scène ou de l'objet situées hors de la profondeur de champ. C'est souvent un modèle de flou gaussien [Nayar 94] [Rajagopalan 97b] [Tomczak 99a] ou plus simple [Horii 92] [Ens 93] [Nayar 95] (voir la partie 3.2.1). L'image de la scène est donc le résultat de la convolution de la scène par une fonction de flou, qui va être plus ou moins forte en fonction de la défocalisation.

Nous n'insistons pas beaucoup plus sur ce genre de modèles de flous, car en général les auteurs s'intéressent à récupérer la 3D dans une scène en discriminant les zones floues des zones nettes sur chaque image. Nous en parlons plus en détails dans les parties 3.4.1.1 et 3.4.1.

Dans [Schechner 00b] [Schechner 00c], Schechner *et al.* s'intéressent à des objets translucides. Ce n'est pas de la même façon que nous, car il s'agit d'objets macroscopiques ; leur travail s'intéresse exclusivement à repérer des objets translucides ou transparents grâce aux reflets<sup>12</sup> à la surface du milieu [Schechner 00b]. Une fois repérés, ces reflets sont traités pour que l'on puisse retrouver l'image réfléchie, qui est de très faible intensité [Schechner 00c].

---

12. Lorsque de la lumière passe à travers un milieu transparent ou translucide, il y a toujours (même pour un éclairage sous incidence normale) une partie de la lumière qui est **réfléchi**e. Cela se montre grâce à l'optique ondulatoire. Nous n'en avons pas tenu compte dans nos travaux, car il s'agit d'une infime part en éclairage quasi-normal ( $\ll 10\%$ ).

Pour utiliser la théorie des systèmes linéaires (voir la partie 2.2.2), il faut que le système optique soit de qualité suffisante. Dans une bonne approximation, on peut dire [Boddeke 94] que les microscopes conventionnels avec un éclairage de Köhler (voir la partie 2.6.3) produisent une réponse linéaire presque parfaite. Le microscope fluorescent est considéré comme un système linéaire dans de nombreux travaux de Agard [Agard 83] [Agard 84a] [Koshy 90]. Si on appelle  $h(x, y, z)$  la réponse impulsionnelle du microscope, et que  $o(x, y, z)$  est la répartition d'intensité 3D de l'objet, une image  $I|_{z_0}(x, y)$  est modélisée comme sur l'Eq. 3.14 :

$$I|_{z_0}(x, y) = \int o(x, y, z) * h(x, y, z - z_0) dz \quad (3.14)$$

De plus, cette description permet une analyse plus aisée de la formation de l'image dans le domaine fréquentiel (après transformation de Fourier) [Goodman 68].

### 3.3.3 Conclusion

Nous avons donc présenté quelques modèles de formation de l'image que l'on peut trouver dans la littérature. Ce sont soit des modèles explicites, décrits dans la partie 3.3.1, soit des modèles que nous considérons comme tels car ils se rapprochent de beaucoup de nos travaux (partie sur le *photon mapping*). Nous verrons que dans notre modèle, nous allons dans le sens des deux : une première partie tend à créer un espace 3D d'intensité, à l'aide de méthode de lancer de rayons ; une seconde partie nous permet d'obtenir une image en simulant de manière convolutionnelle la formation de l'image.

## 3.4 Reconnaissance et reconstruction

Les parties des objets qui sont situées en dehors de la profondeur de champ sont floues ; ce flou semble gênant et sans intérêt à première vue, mais il contient en fait des informations très intéressantes sur la 3D de la scène. Les méthodes de « *Shape from Focus / Defocus* » et de « *Depth from Focus / Defocus* » proposent des façons de récupérer ces informations.

### 3.4.1 Récupérer des informations sur un objet 3D

Dans cette partie, nous allons surtout nous intéresser aux méthodes utilisant un éclairage dit « passif » [Strand 85] qui utilisent l'éclairage ambiant, à la différence des méthodes utilisant un éclairage « actif ». Nous dirons juste quelques mots sur les méthodes actives (partie 3.4.1.3), car nous nous sommes surtout intéressés aux méthodes passives que sont les « *Shape from Focus* » (partie 3.4.1.1) et « *Depth from Focus* » (partie 3.4.1.2).

### 3.4.1.1 *Shape from Focus / Shape from Shading*

Les méthodes de *Shape from (De)Focus* et de *Shape from Shading* s'intéressent à récupérer la forme (*shape* en anglais) des objets tridimensionnels d'une scène [Horn 89]. Le problème provient surtout du fait que les équations qui décrivent la formation de l'image peuvent être difficiles à inverser. La plupart du temps, on peut faire l'hypothèse que la formation de l'image est une simple convolution. Dans [Schechner 02], Jin *et al.* proposent un algorithme de *Shape from Defocus* qui s'appuie sur les différences de textures (forme et radiance) d'une scène à partir de plusieurs images prises avec des conditions initiales différentes (différentes focales).

Nayar *et al.* proposent dans [Nayar 94] une méthode de *Shape from Focus* appliquée à des objets opaques microscopiques. Leur but est de repérer puis d'isoler la zone la plus nette d'une image, de stocker cette zone, et d'incrémenter le focus pour recommencer l'opération. Cela conduit les auteurs à la reconstruction de la partie visible de l'objet. Pour identifier la zone la plus nette, les auteurs proposent l'opérateur *SML* (*Sum Modified Laplacian*<sup>13</sup>). La méthode SML est basée sur le calcul d'un Laplacien modifié (ajout d'une valeur absolue) d'une zone d'une image (Eq. 3.15) :

$$\nabla_M^2 I = \left| \frac{\partial^2 I}{\partial x^2} \right| + \left| \frac{\partial^2 I}{\partial y^2} \right| \quad (3.15)$$

qui a pour approximation, dans le cas d'un calcul discret (Eq. 3.16) :

$$\begin{aligned} \text{ML}(x, y) = & |2i(x, y) - i(x - s, y) - i(x + s, y)| - \\ & \dots |2i(x, y) - i(x, y - s) - i(x, y + s)| \end{aligned} \quad (3.16)$$

où  $s$  est un paramètre qui est à régler en fonction de la texture à analyser. Le critère de netteté SML est donné par l'Eq. 3.17 :

$$\text{SML}(i) = \sum_x \sum_y \text{ML}(x, y) \text{ avec } \text{ML}(x, y) \geq T \quad (3.17)$$

Si le critère ML est inférieur à un seuil  $T$ , alors on ne le compte pas, sinon, on l'ajoute à la valeur *SML*. Et finalement, la valeur *SML* de cette zone de l'image donne une information de la netteté de l'image. En recommençant en chaque point de chaque image d'une séquence, ils arrivent à estimer la forme de l'objet. Ces méthodes de *Shape from X* sont très intéressantes mais, à notre connaissance, elles ne s'appliquent qu'à des objets opaques.

### 3.4.1.2 *Depth from Focus / Defocus*

Les méthodes de « *Depth from Focus / Defocus* » [Xiong 93] sont des méthodes qui cherchent à retrouver des informations sur la position d'un objet opaque dans une scène 3D

13. Somme d'opérateurs Laplaciens Modifiés.

(*depth* signifie profondeur en anglais), macroscopique ou bien microscopique. Plus précisément, c'est une famille de méthodes qui sont utilisées pour évaluer le degré de focalisation de régions d'une image [Bove 93] [Hönig 96]. Les objets étudiés sont généralement grands par rapport à la profondeur de champ, et de fait, des zones floues ou nettes apparaissent lorsqu'on modifie la focalisation.

Dans [Pentland 87], Pentland propose une méthode pour retrouver des informations sur la profondeur d'un objet macroscopique opaque dans une scène 3D. Il montre que dans un système optique biologique, il existe un « gradient de focus » qui est une source d'information 3D : la profondeur de champ finie des instruments d'optiques est donc une source d'informations. Considérant un système optique simple, il se propose de déterminer la position du plan image **net** pour toute position du plan objet.

Nous avons reproduit le schéma qui lui sert d'explication sur la Fig. 3.4. Pour une lentille mince, on a l'Eq. 2.2 qui devient :

$$\frac{1}{u} + \frac{1}{v} = \frac{1}{F} \quad (3.18)$$

où  $F$  est la focale de la lentille,  $u$  et  $v$  les distances de l'objet à la lentille et de la lentille au plan image lorsqu'il y a une focalisation parfaite. Si on fixe le plan image et que l'on s'intéresse à un plan défocalisé ( $u_0$ ), l'image nette se forme dans un plan ( $v_0$ ) différent du plan du capteur ( $v$ ) ; de fait, à un point du plan objet correspond une tache de rayon  $\sigma$  dans le plan du capteur. Il vient :

$$\frac{1}{u_0} + \frac{1}{v_0} = \frac{1}{F} \text{ soit } u_0 = \frac{F.v_0}{v_0 - F} \quad (3.19)$$

Si on fait un peu de géométrie, on trouve :

$$\tan \theta = \frac{r}{v} = \frac{\sigma}{v_0 - v} \quad (3.20)$$

et, en combinant l'Eq. 3.18 à l'Eq. 3.20, on obtient (Eq. 3.21) :

$$u = \frac{F.r.v_0}{r.v_0 - F.(r + \sigma)} \quad (3.21)$$

On peut donc remonter à la position de l'image nette ( $u$ ) en connaissant le système optique ( $f$ ,  $v_0$ ,  $r$ ) et en mesurant le rayon de la tache de flou ( $\sigma$ ).

C'est le principe même des méthodes de *Depth from Focus* : on modélise les effets des paramètres intrinsèques du système optique sur l'image de la scène, acquise avec une faible profondeur de champ. La partie la plus délicate de l'opération est la partie qui consiste à extraire (à déconvoluer) le modèle de flou de l'image. Dans [Ens 93], Ens *et al.* affirment que les méthodes précédentes de *Depth from Focus* sont inadaptées et présentent de nombreux défauts : imprécisions quant à trouver la représentation de l'espace des fréquences, effets de fenêtrage (*windowing effects*) et effets de bord. Les auteurs proposent une méthode basée sur des matrices régularisées qui élimine ces problèmes. La méthode est trop

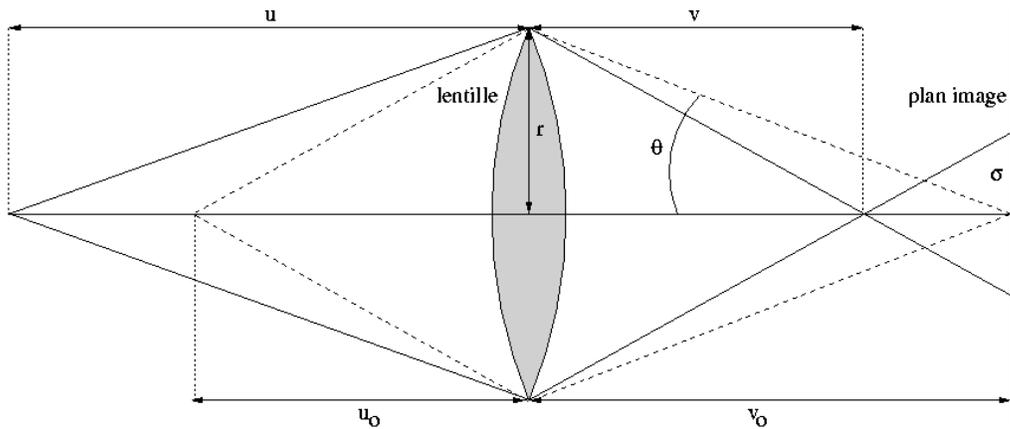


FIG. 3.4 – Figure recopiée de [Pentland 87, Fig. 6., pp. 530]. La seule modification a consisté à placer le plan image à droite pour rester cohérent avec nos conventions adoptées dans le chapitre 2.

complexe pour être résumée ici, nous invitons donc le lecteur intéressé à se reporter à la publication [Ens 93]. Horii propose dans [Horii 92] une méthode de *Depth from Defocusing* qu'il appelle aussi *Depth from Blurring*. En se servant du flou comme d'une source d'information, il retrouve avec précision une scène 3D (composée d'un objet macroscopique opaque) à partir d'une image. Il calcule une « carte de profondeurs » (*Depth Map*). Une méthode similaire est utilisée par Rajagopalan *et al.* [Rajagopalan 97a] [Rajagopalan 97b] [Rajagopalan 97a] pour estimer la profondeur du même genre d'objets dans une scène 3D. Dans [Schechner 00a], Schechner fait une bonne étude des *Depth from Focus* et *Defocus*, et les compare à l'imagerie par stéréo.

### 3.4.1.3 Méthodes actives

Il existe des méthodes de *Shape from Focus* qui utilisent des conditions particulières d'expérience. Par exemple, elles peuvent se servir d'un éclairage tramé connu pour évaluer le relief (*active illumination*). Dans [Strand 85], Strand expose les différents éclairages structurés que l'on rencontre dans la littérature : ce peut être des points lumineux, des lignes parallèles ou bien des moirés. Dans [Noguchi 94], Nayar *et al.* présentent une méthode de *Shape from Focus* dérivée de [Nayar 94] car utilisant un éclairage en forme de damier pour éclairer le spécimen (opaque) sous le microscope optique. Les auteurs démontrent que c'est l'éclairage optimal pour leur application. Nous ne développerons pas plus le sujet car il est très éloigné de notre travail.

### 3.4.1.4 Conclusion

Nous avons vu à la partie 2.1.1.2 que pour certains systèmes optiques, le grossissement n'était pas constant en fonction de la défocalisation. Les travaux de Deschênes [Deschênes 00] [Deschênes 02] se proposent de corriger cet effet qui est surtout présent pour des scènes macroscopiques (plus grande profondeur de champ).

Il existe bien-sûr d'autres techniques pour retrouver la profondeur ou la forme d'un objet dans une scène, mais elles sont trop éloignées du sujet. Il s'agit [Strand 85] par exemple des méthodes interférométriques, celles utilisant la diffraction ou bien l'holographie.

### 3.4.2 Focalisation automatique de microscopes

Dans la focalisation automatique, on s'intéresse à trouver l'image la plus nette d'une séquence d'images. Mais pour trouver l'image la plus nette, il faut d'abord trouver des critères de netteté. Häusler *et al.* proposent le critère qui leur semble le plus simple, dans [Häusler 84]. La formation de l'image d'un objet 2D défocalisée de  $z$  est donnée par  $i(x, y, z) = o(x, y) * h(x, y, z)$ . En éclairage incohérent, l'image la plus nette est tout simplement l'image  $i(x, y, z)$  qui vérifie l'Eq. 3.22 :

$$\left. \frac{\partial i(x, y, z)}{\partial z} \right|_{z_0} = 0 \Leftrightarrow \left. \frac{\partial h(x, y, z)}{\partial z} \right|_{z_0} = 0 \text{ pour tout } x \quad (3.22)$$

Ces solutions sont indépendantes de l'objet. Le critère est le même dans l'espace de Fourier avec la TF de  $h$ .

Nous avons vu dans la partie 3.1.1 que l'on pouvait exprimer de façon géométrique [Pentland 87] la distance du plan image net par rapport au système optique [Tomczak 99a]. En pratique, il faut en plus déterminer une constante caractéristique du système optique  $k$ , qui est sans dimension. L'Eq. 3.21 devient alors (Eq. 3.23) :

$$u = \frac{F.r.v_0}{r.v_0 - F.(r + k.\sigma)} \quad (3.23)$$

La valeur de  $k$  se détermine en faisant des mesures sur le système optique, qui sont très précises sur un microscope, à l'aide d'une grille à très petit grain. Nous en parlons plus largement dans [Dey 99].

Dans [Boddeke 94] [Boddeke 99], Boddeke *et al.* se basent sur l'échantillonnage de l'image et l'OTF. Ce sont les premiers à inclure l'échantillonnage dans leur critère de netteté. Les auteurs cherchent un critère de focalisation automatique pour un microscope optique (en lumière blanche ou en fluorescence) ; les objets observés sont des chromosomes en métaphase (objets forts absorbant après marquage, et quasiment 2D). Leur critère se présente sous la forme d'un filtrage passe-bande ; la bande de fréquence autorisée est celle qui est la plus dépendante de la défocalisation. Le filtre passe-bande dépend alors du

microscope et de la longueur d'onde de l'éclairage (Eq. 3.24) :

$$\Omega = \frac{2\pi \text{ON}}{\lambda} \frac{p_{xy}}{G} \quad (3.24)$$

où  $G$  est le grossissement d'un microscope d'ouverture numérique  $\text{ON}$ ,  $\lambda$  la longueur d'onde et  $p_{xy}$  la taille d'un pixel carré. Le filtrage devient (Eq. 3.25) :

$$F_{2D}(z) = \sum_x \sum_y |i_z(x, y) * h_\Omega(x, y)| \quad (3.25)$$

avec  $i_z(x, y)$  l'image numérique prise à un focus de  $z$ . Ils proposent ensuite une amélioration du modèle de façon à traiter des objets épais. Ils ne prennent pas en compte l'absorption de l'objet. Le critère de netteté est dérivé de l'Eq. 3.25 pour donner :

$$F_{3D}(z) = \int_{\text{objet}} F_{2D}(z + \varepsilon).d\varepsilon \quad (3.26)$$

L'Eq. 3.26 donne un critère qui est maximal lorsque la somme des critères 2D est maximale. Leur algorithme de focalisation automatique est réglé en 3 te : tout d'abord, une recherche grossière avec un pas de déplacement de l'ordre de quelques microns, puis, une fois une zone de netteté détectée, un balayage avec un pas de l'ordre du micron. La dernière étape consiste à trouver la meilleure position, au sens d'une analyse quadratique de l'erreur.

Tomczak *et al.* [Tomczak 98] [Tomczak 99b] utilisent un critère de mesure de la netteté de l'image développé par Nayar [Nayar 94] : l'opérateur *SML* (*Sum Modified Laplacian*<sup>14</sup>). Nayar avait proposé cet opérateur pour isoler les zones nettes des zones floues d'un objet microscopique opaque dans une image (voir la partie 3.4.1.1). Tomczack *et al.* s'en servent pour développer un algorithme de mise au point automatique d'un microscope optique sur des objets translucides 3D (grains de pollen). Les auteurs appliquent la méthode *SML* pour déterminer l'image la plus nette d'une séquence d'images, et non pour isoler les parties nettes de chaque image comme Nayar (cf. la partie 3.4.1.1). Ils comparent plusieurs critères de netteté courants, mais prouvent que dans le cas d'objets épais, le critère *SML* est le plus adapté.

Geusebroek *et al.* proposent dans [Geusebroek 00] une méthode de focalisation automatique rapide et robuste pour 3 types de microscopies : microscopie optique en lumière blanche, en fluorescence et microscopie à contraste de phase.

### 3.4.3 Reconnaissance et Classification

Il existe dans la littérature de nombreux travaux sur la reconnaissance et la classification d'objets microscopiques, comme des pollens<sup>15</sup> [Mazière 97] [Cushing 96], ou bien des micro-organismes [Rodenacker 01]. Ce sont des objets translucides ou transparents,

14. Somme d'opérateurs Laplaciens Modifiés.

15. Se reporter à l'annexe A.

et la reconnaissance s'effectue soit en lumière blanche (microscope optique conventionnel) [Tomczak 99a] [Boucher 02] soit en fluorescence (microscope optique en fluorescence) [Ronneberger 02]. La reconnaissance automatique ou semi-automatique répond à un besoin [Streibl 85] de la part des spécialistes<sup>16</sup> : la reconnaissance et le comptage de ces micro-organismes se fait à l'œil [Cushing 97]. C'est une tâche répétitive et fatigante qui requiert un expert à te plein. Ces systèmes, pour être un peu autonomes, ont généralement besoin d'algorithmes de focalisation automatique (voir la partie 3.4.2).

### 3.4.3.1 Microscopie en fluorescence

La reconnaissance de micro-organismes en microscopie à fluorescence n'est pas à notre connaissance très répandue. Cependant, Ronneberger *et al.* [Ronneberger 02] s'intéressent à la reconnaissance de grains de pollen en fluorescence. Dans un premier te, les auteurs utilisent un microscope confocal pour s'affranchir du flou. Ils ont ainsi des images de très bonne qualité. Nous verrons qu'il existe de nombreux travaux qui portent sur la déconvolution de séquences d'images 3D obtenues avec un microscope optique en fluorescence (partie 3.4.4.2.2). Ils utilisent la méthode des « invariants en niveaux de gris » qui présente l'avantage de décrire un objet dans différentes orientations et dans différentes positions comme appartenant à une même classe. Leur technique de reconnaissance donne de bons résultats puisque 92% des pollens sont discriminés avec succès.

Effectuer le même travail en lumière blanche est plus ardu, puisque non seulement le flou mais aussi la réfraction de la lumière à l'intérieur du grain de pollen perturbent la reconnaissance.

### 3.4.3.2 Microscopie en lumière blanche

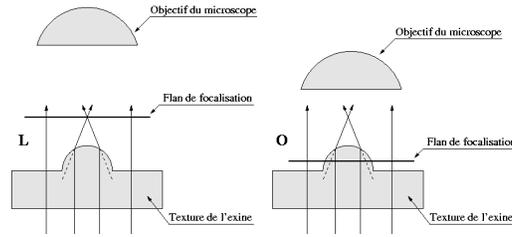
La réfraction à l'intérieur et en surface des grains de pollen est très importante. Une technique de reconnaissance de pollens se base même sur la réfraction [Cushing 97] : c'est l'*analyse L.O.*<sup>17</sup>. Il s'agit d'une observation minutieuse de la luminosité relative observée en changeant la focalisation du microscope à la surface du pollen (Fig. 3.5) : la texture est une succession de creux et de bosses de l'ordre du micromètre dans une matière translucide. Chacun d'eux se comporte comme une petite lentille divergente (creux) ou convergente (bosses) de faible distance focale (environ 1  $\mu\text{m}$ ). Plus la différence entre l'indice de réfraction du pollen et le milieu dans lequel il baigne est forte, et plus l'effet L.O. est important.

Il existe de nombreux travaux sur la détection et la reconnaissance automatique de pollen en microscopie optique [Bechar 97] qui ne tiennent pas compte explicitement de la réfraction, mais se servent plutôt de méthodes de classification [Nguyen 00] pour classifier des pollens.

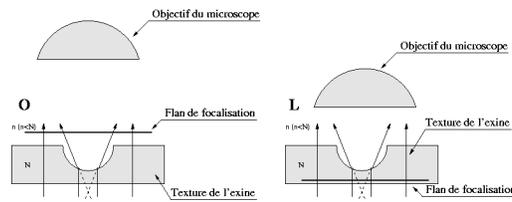
---

16. Par exemple, un palynologue est un botaniste qui sait reconnaître des grains de pollen en se servant d'un microscope. Pour en savoir plus au sujet des pollens, se reporter à l'annexe A.

17. La lettre « L » correspond au mot latin *Lux* (lumière), et le « O » au mot latin *Obscuritas* (obscurité).



(a) bosse (lentille convergente)



(b) creux (lentille divergente)

FIG. 3.5 – Illustration du phénomène étudié par l'analyse L.O.. Dans le cas d'une bosse à la surface du pollen (a), tout se passe comme si la lumière (arrivant par dessous) rencontrait une lentille convergente. Si le plan de focalisation du microscope est situé dans la zone de convergence de la lumière, on voit une tache lumineuse, alors que si on est en-deçà de la convergence des rayons lumineux, c'est plutôt une zone plus sombre qui apparaît. (b) Pour un creux, c'est exactement le même phénomène, mais avec une lentille divergente.

Le projet européen A.S.T.H.M.A.<sup>18</sup> [Bonton 02] [Hidalgo 02] qui s'est terminé fin 2001, visait à étudier la dispersion des pollens dans l'atmosphère et aussi à automatiser la tâche de reconnaissance des pollens. La méthode proposée est composée de 2 modules : après l'étape initiale qui consiste à repérer et focaliser automatiquement le microscope sur un grain de pollen (voir la partie 3.4.2), le premier [Bonton 01] [Bonton 02] isole le grains de pollen des poussières et moisissures qui perturbent la reconnaissance. Ensuite vient l'identification du grain de pollen proprement dite [Boucher 02] qui s'effectue elle-même en deux étapes.

La première étape (2D) consiste à isoler le grain dans la coupe la plus nette et à calculer un certain nombre de paramètres comme la couleur moyenne, la taille, la forme, la convexité, *etc.* Ces paramètres permettent au système d'établir les premières estimations sous la forme d'une liste triée de solutions possibles. La deuxième étape (3D) s'appuie sur la connaissance des types de pollen pour tester différentes caractéristiques possibles en fonction des hypothèses de solution existantes. Ces caractéristiques sont recherchées

18. *Advanced System of Teledetection for Healthcare Management of Asthma* : système avancé de télédétection pour la prévention de l'asthme.

en fonction de leurs positions possibles : images d'intérêts dans la séquence et régions d'intérêts dans ces images. La méthode utilisée segmente d'abord plusieurs images 2D en parallèle pour ensuite valider la présence ou non de la caractéristique en 3D en confrontant les différentes segmentations. Les résultats préliminaires de ce système montrent un taux de reconnaissance de 73%. Rappelons que nous sommes en microscopie optique.

On retrouve un projet similaire d'identification de forme et d'ornementation de diatomées<sup>19</sup> dans [du Buf 99], toujours avec un microscope optique. Ils visent à réaliser un système totalement non-supervisé qui utilise une base de données sur les diatomées. La différence avec les grains de pollen vient du fait que ces algues sont transparentes et pratiquement 2D : elles sont très fines. D'autres travaux du même genre existent, comme ceux de Beyon *et al.* [Benyon 99] qui s'intéressent par exemple à discriminer les spores de champignon en utilisant des critères géométriques, ou ceux Rodenacker *et al.* [Rodenacker 01] qui visent à identifier et quantifier des populations de micro-organismes (translucides) dans l'eau.

### 3.4.4 La déconvolution

Nous avons déjà parlé de méthodes qui augmentent la profondeur de champ d'un appareil optique (voir la partie 3.1.2), mais là nous allons nous intéresser à traiter numériquement une seule image ou bien une séquence d'images pour **enlever** le flou, ou les informations non désirables. Il faut remarquer que les méthodes de déconvolution sont très nombreuses et que le résultat est un résultat numérique, selon certains critères imposés. Il est important d'avoir plusieurs critères *a priori* pour déconvoluer des images, car cela permet d'avoir une idée du résultat. Nous allons présenter quelques unes de ces méthodes.

#### 3.4.4.1 Correction de la focalisation

La déconvolution comme on l'entend *a priori* au sens premier, consiste à améliorer numériquement la qualité d'une image. A partir d'une image floue la plupart du temps [t. Haar Romeny 94] [Jalobeanu 01], ou bien bruitée par le système imageur, la déconvolution consiste en l'application d'un filtre numérique qui enlève l'effet convolutif de la réponse impulsionnelle du système. Dans [t. Haar Romeny 94], Haar *et al.* proposent une méthode de déconvolution pour supprimer du flou gaussien. La gaussienne est un des modèles de flou les plus souvent utilisés. La déconvolution est appliquée à des images satellitaires dans [Jalobeanu 01] : à partir de la connaissance de la fonction de transfert du système optique et du niveau de bruit, Jalobeanu *et al.* utilisent une base d'ondelettes complexes pour la déconvolution des images.

---

<sup>19</sup>. Une diatomée est une algue unicellulaire qui est translucide au microscope optique. URL : <http://www.ualg.pt/adiac/>

Une branche importante de la déconvolution est la déconvolution aveugle<sup>20</sup> ; ce type de déconvolution doit améliorer une image sans connaître dans son ensemble la réponse impulsionnelle du système imageur qui l’a produite. Il faut donc donner des contraintes *a posteriori* sur le système et l’image [Lam 00]. Nous n’en dirons pas beaucoup plus sur la déconvolution d’une image. Nous en avons parlé pour introduire le terme de déconvolution. La déconvolution de séquences d’images, comme nous allons le voir dans la partie suivante, est très intéressante pour notre sujet car elle nécessite un modèle 3D de formation de l’image avant tout traitement.

#### 3.4.4.2 Reconstruction et restauration d’un objet microscopique 3D

Lorsque l’on est confronté à des objets 3D en microscopie optique (en lumière blanche et en fluorescence), on retrouve souvent le terme de « découpage optique » [Agard 84a] [Fay 89] [Carrington 90] (qui se traduit par *optical slicing*, *optical sectioning* ou *optical cutting*). Cette méthode consiste à faire varier le focus du microscope de façon à découper l’objet en tranches de même épaisseur, sans le couper physiquement. La tâche serait relativement difficile compte tenu de la taille des objets, en général, et surtout elle ne peut s’opérer sur des spécimens *in vivo* : le découpage physique est destructif. En utilisant cette méthode de découpage optique, on trouve de nombreux travaux en microscopie optique conventionnelle [Zinser 83] ou en fluorescence [Carrington 87]. En général, les auteurs s’intéressent à déconvoluer<sup>21</sup> des séquences d’images d’un objet microscopique 3D pour le reconstruire ou le représenter au mieux possible. En 3D, si on prend une séquence d’images (par exemple en défocalisant d’un pas constant un microscope), on s’aperçoit que chaque image contient non seulement de l’information sur la partie focalisée de l’objet, mais aussi sur la partie défocalisée [Preza 92a] [McNally 94]. Nous allons présenter quelques travaux.

**3.4.4.2.1 Microscope optique conventionnel** Zinser propose dans [Zinser 83] une technique simple de déconvolution d’une séquence d’images de noyau de cellule, observé avec un microscope optique. Il modélise le système optique sous la forme d’un système linéaire, qui accepte donc la convolution. Afin de simuler l’OTF du microscope, il utilise le modèle de Stokseth (Eq. 3.12). Son algorithme est assez intuitif, et il ne traite pas trop du problème du bruit de fond : dans l’espace des fréquences, il échantillonne en 2D l’OTF, puis il l’inverse brutalement pixel par pixel. Evidemment, il y a un problème si la valeur du pixel est nulle ou très petite (dans ce cas l’OTF<sup>-1</sup> explose!), et il le résout en annulant les valeurs de l’OTF<sup>-1</sup> qui sont supérieures à 10<sup>3</sup>. Dans [Kaufhold 98], Kaufhold et Karl présentent une méthode de reconstruction de structures 3D fines de dendrites<sup>22</sup>. A partir

20. Ce terme apparaît en anglais sous le terme « *blind deconvolution* ».

21. Le terme est employé ici comme « enlever le flou de l’image en utilisant une séquence d’images ».

22. D’après <http://www.sciences-en-ligne.com/Dictionnaire/> : « extension ramifiée du co cellulaire recevant les informations des autres cellules nerveuses en des zones appelées synes. Les dendrites peuvent constituer de longs filaments (dendrites apicales) ou s’étaler autour du co cellulaire (dendrites basales). »

d'une série d'images obtenues par découpage optique, ils utilisent des méthodes de *Depth from Defocus* (voir la partie 3.4.1) sans connaissance *a priori* sur le microscope, à part une étape de calibration. Ils estiment la profondeur de chaque point de la séquence, et ils font une reconstruction de la dendrite. Concernant l'absorption de la lumière par les objets, Erhard *et al.* écrivent dans [Erhardt 85] :

*«Because of the nonlinearity of light absorption, linear system theory requires absorption-free objects. In practice, of course, microscopic objects are never free of absorption, but it is sufficient that the absorption within the object is small enough to be approximately linear.»*<sup>23</sup>

Dans cet article, ils proposent un modèle d'OTF puis ils présentent une méthode de reconstruction d'objet 3D avec un microscope conventionnel. Ce sont donc des objets simples, très peu absorbants avec lesquels ils travaillent. La reconstruction sur les coupes transversales ( $XY$ ) donne de bon résultats, mais ils sont moins bons sur les coupes latérales (parallèles à l'axe optique  $XZ$ ). En effet, il manque des fréquences spatiales. On peut encore trouver dans [Laub 85] une méthode similaire de reconstruction d'images microscopiques. Les objets sont du même type que ceux de Erhardt [Erhardt 85] car ils sont peu absorbants et transparents (ce sont des cellules).

**3.4.4.2 Microscope en fluorescence** Ces techniques de déconvolution et de reconstruction sont beaucoup plus nombreuses en microscopie en fluorescence. La déconvolution du flou, puis la reconstruction 3D du spécimen sont plus aisées, car le flou n'a pas une influence trop lointaine (cf. chapitre 4) et on ne peut pas quantifier l'absorption de la lumière car les objets sont eux-mêmes lumineux.

Dans le cas d'un microscope optique en lumière fluorescente, on suppose aussi que le système optique est linéaire [Agard 83]. On peut écrire la formation de l'image d'un objet épais, fluorescent comme une série de convolutions :

$$I(x, y)|_{z_0} = \int_{\text{espace } z} o(x, y, z) * h(x, y, z - z_0) dz \quad (3.27)$$

où  $o(x, y, z)$  désigne l'objet tridimensionnel,  $h(x, y, z)$  la réponse impulsionnelle 3D et  $z_0$  la distance focalisée. On appelle  $\varepsilon = z - z_0$  la défocalisation.

Weinstein et Castleman [Weinstein 71] ont les premiers proposé une méthode de déconvolution du flou qui s'appuie non pas sur un seul plan image, mais sur les plans mitoyens. Ils utilisent l'OTF de Stokseth pour simuler le système optique. Ensuite Castleman a proposé une amélioration de la méthode en remplaçant l'OTF de Stokseth par une OTF peu

<sup>23</sup> « A cause de la non-linéarité de l'absorption de la lumière, la théorie des systèmes linéaires requiert des objets non-absorbants. En pratique, bien-sûr, les objets microscopiques ne sont jamais totalement non-absorbants, et il est suffisant que l'absorption à l'intérieur de l'objet soit suffisamment petite pour qu'elle soit presque linéaire. »

défocalisée (voir l'Eq. 3.13). Cette approche apporte une meilleure approximation pour de petites défocalisations (en « flou proche ») mais est plus gourmande en calculs et introduit certains facteurs d'échelle. Dans [Agard 83] [Agard 84b], les auteurs améliorent la méthode de déconvolution en permettant de supprimer les basses fréquences et d'augmenter le contraste. Parallèlement, ils raffinent le modèle d'OTF pour l'appliquer à la restauration et au filtrage inverse [Agard 89]. Agard *et al.* [Hiraoka 90] [Swedlow 97]<sup>24</sup> ont repris et appliqué cette méthode pour restaurer une séquence d'images d'un objet 3D. Les auteurs proposent donc une méthode qui utilise plusieurs plans objet de chaque côté. Pour restaurer une image  $I_0$  de la séquence, ils ne se servent pas des informations contenues dans la seule image  $I_0$ , mais aussi de l'information redondante contenue dans ses plus proches voisines. Pour lutter contre le bruit qui atténue les très hautes fréquences du spectre, on peut utiliser un filtre moyenneur [Macias-Garza 89]. La méthode de déconvolution utilisant les plus proches voisins est décrite en détails dans [Swedlow 97]. Plus récemment encore, les thèses de Verveer [Verveer 98] et de van Kempen [v. Kempen 99] proposent des méthodes plus précises de restauration de séquences d'images en microscopie à fluorescence.

**3.4.4.2.3 Microscope de Normaski** Les méthodes de simulation de la formation d'images de Kagalwala et Kanade [Kagalwala 99a] [Kagalwala 00a] sont à rapprocher des méthodes de lancer de rayon (voir la partie 3.3.1.1 sur la synthèse d'images). Leur but est de reconstruire des spécimens biologiques **transparents** (pas d'absorption) observés à l'aide d'un microscope à contraste interférentiel (microscope de Normaski, voir la partie 2.5.2.4). Ils se basent sur une série d'images, et ils n'effectuent pas de déconvolution à proprement parler : il s'agit plus exactement d'une reconstruction à partir de plusieurs simulations.

Ils ont un modèle d'objet [Kagalwala 98] [Kagalwala 99b] représenté comme une répartition 3D d'indices de réfraction. Ensuite, ils décomposent les données des images réelles sous une forme hiérarchique, pour avoir une base de critères de correspondance, car ils n'ont pas de modèle de formation de l'image : la relation entre l'intensité réelle de l'objet et l'intensité de l'image n'étant pas linéaire, ils ne peuvent pas définir une OTF analytique [Kagalwala 00b]. Ils se basent donc sur une correspondance entre critères sur les images réelles et critères sur les objets simulés. A chaque itération, ils proposent donc un modèle d'objet qu'ils affinent à chaque itération.

**3.4.4.2.4 La reconstruction totale est impossible** Nous allons présenter quelques travaux qui montrent qu'une reconstruction 3D totale n'est pas possible d'un point de vue théorique. En tomographie, c'est un problème connu et Chiu *et al.* [Chiu 79] parlent du « cône de disparition » (« *missing cone* » dans la littérature anglaise) : c'est une région

---

24. Note pour le lecteur intéressé par les références : dans toutes ces références, nous n'avons pas les mêmes notations qu'Agard. En effet, un plan objet est noté  $o$  chez nous et  $i$  chez Agard. Et vice-versa.

de l'espace 3D de Fourier dans laquelle la TF 3D de l'objet se voit annulée à cause de la fonction de transfert de l'instrument. Ils montrent qu'en tomographie, la reconstruction est possible et que les effets du cône de disparition ne sont pas aussi désastreux que la théorie le laissait présager. En microscopie, le problème est abordé dans [Streibl 84], [Agard 84a] et [Bianco 89]. Streibl [Streibl 84] fait l'analogie entre les problèmes de cône de disparition et la perte de fréquences spatiales longitudinales ( $w$ ). Bianco et Diaspro [Bianco 89] étudient les propriétés des microscopes optiques et les évaluent analytiquement avec un modèle simple pour faire de la reconstruction 3D efficace. Plutôt que de voir explicitement la formation de l'image comme une série de convolutions (voir [Agard 84a]), ils voient globalement le résultat comme une convolution (Eq. 3.28) :

$$i(x, y, z) = i_0(x, y, z) * s(x, y, z) \quad (3.28)$$

L'image floue  $i(x, y)$  est le résultat de la convolution de l'image non floue  $i_0(x, y)$  par une fonction  $s(x, y, z)$  qu'il reste à déterminer.

On peut calculer  $S(u, v, w)$ , la TF à 3 dimensions de la fonction  $s(x, y, z)$ . L'axe des abscisses n'est plus l'axe optique  $z$  comme pour nous, mais les fréquences spatiales correspondantes  $w$ . Ils soulignent le fait suivant : la fonction  $S(u, v, w)$  présente un double cône dans l'espace  $(O; u, v, w)$ , de sommet  $O$ , à l'intérieur duquel toutes les fréquences sont coupées. Il n'y a donc aucun moyen de remonter à l'intégralité des informations car celles hors du cône sont perdues. Cela n'empêche pas de faire de la déconvolution pour enlever du flou et ensuite ré-empiler la séquence améliorée dans l'ordre pour la représenter dans l'espace [Diaspro 90].

### 3.4.5 Conclusion

La reconnaissance de spécimens biologiques à l'aide d'un microscope est très développée actuellement : nous avons vu que c'est pour simplifier le travail des spécialistes que des systèmes de reconnaissance automatiques ou semi-automatiques sont créés. Les grains de pollen sont une application assez importante dans ce thème, car ils présentent le désavantage d'être des objets très compliqués : avec un microscope optique, la tâche de reconnaissance devient très ardue. Avec d'autres types de microscopies (fluorescence ou confocal), la reconnaissance devient plus facile. Il existe bien sûr d'autres travaux qui ont les mêmes thèmes, comme Pudney [Pudney 94] qui s'intéresse à détecter la surface de grains de pollen au microscope confocal.

Nous avons aussi vu plusieurs méthodes de reconstruction ou de déconvolution en microscopie optique : en fluorescence, en lumière visible ou bien en contraste interférentiel. Les méthodes utilisées en lumière blanche ou bien en lumière fluorescente sont très intéressantes, car pour enlever le flou d'une séquence d'images, il faut au préalable définir un modèle de formation de l'image. Nous nous sommes particulièrement intéressé à celui

développé par Agard *et al.* [Agard 89]. Nous l'exposerons dans la partie 4.4.3. En ce qui concerne le microscope à contraste interférentiel, l'idée majeure à retenir est de comparer aux données réelles (images) un modèle d'objet qui est affiné à chaque itération, et qui converge vers la meilleure solution envisagée.

## 3.5 Conclusion

Nous avons présenté dans ce chapitre 3 les travaux qui nous ont semblé les plus intéressants, et qui ont pour la plupart eu un apport conséquent dans l'avancée de nos travaux. Dans le chapitre suivant, nous allons présenter le modèle de formation de l'image que nous avons proposé, ainsi que les méthodes de calculs utilisées.



# Chapitre 4

## Le modèle proposé

**M**AINTENANT que nous avons synthétisé les travaux proches des nôtres, nous présentons et expliquons dans ce chapitre le modèle global de formation de l'image que nous avons développé. Il s'agit d'un modèle de formation de l'image pour un objet 3D translucide, observé en transmission avec un microscope optique. Dans le chapitre 2 nous avons introduit puis développé les notions physiques nécessaires à la compréhension du modèle. Nous allons maintenant les utiliser. Nous nous sommes intéressés à créer un modèle complet de la formation de l'image le plus proche possible de la réalité, mais restant toutefois utilisable en pratique : ce n'est pas un modèle à vocation uniquement théorique, c'est aussi un modèle qui doit faciliter la compréhension de certains phénomènes observés. Nous avons donc fait plusieurs approximations en nous appuyant sur les hypothèses de travail (taille de l'objet observé, sa nature physique...). De plus, nous nous sommes placés dans le cadre suivant :

- une seule source de lumière ;
- un seul objet ;
- un système d'acquisition.

Nous proposons un modèle de formation de l'image sous les hypothèses physiques suivantes :

- la source lumineuse est incohérente ;
- l'objet observé est 3D ; c'est aussi un objet translucide ;
- le système d'acquisition est composé d'un microscope et d'une caméra CCD.

Nous présentons dans ce chapitre le modèle complet de la formation de l'image, adapté aux conditions précédentes. Elles sont fortes, mais pas exclusives. Le cas translucide étant le plus difficile à traiter, le modèle ne se restreint pas aux conditions précédentes, mais peut être plus général (objet opaque, pas de microscope, ...). Ce modèle s'articule essentiellement autour de 3 modules qui représentent au mieux la réalité de la formation de l'image. Sur la

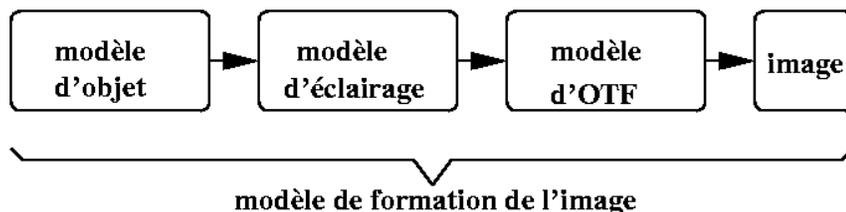


FIG. 4.1 – Nous avons schématisé le modèle complet de la formation de l'image à l'aide de plusieurs modules en cascade. Cela est calqué sur la réalité physique du phénomène. Avant de pouvoir obtenir l'image d'un objet, il faut d'abord une modélisation physique de l'objet, sans lumière (à gauche), puis une modélisation des processus d'interaction entre la lumière et la matière, et enfin un modèle d'OTF (Optical Transfert Function) pour obtenir une image (à droite).

Fig. 4.1, le schéma représente les 3 modules en question ; avant de pouvoir obtenir l'image d'un objet, il faut que plusieurs étapes soient vérifiées :

- il faut que cet objet existe : il nous faut un modèle d'objet ;
- il faut que cet objet soit éclairé par une source lumineuse, pour « voir » quelque chose : il est nécessaire de modéliser les interactions de la lumière avec l'objet ;
- et enfin, il faut qu'un système optique (avec une OTF<sup>1</sup>) soit présent : modélisation de l'OTF.

Toutes ces étapes sont nécessaires et elles dépendent l'une de l'autre, et si l'on en supprime une seule, il n'y aura pas d'image : s'il n'y a pas d'objet physique, il sera impossible d'en voir une image ; si l'objet existe, mais n'est pas éclairé, ce sera pareil ; enfin, si l'objet existe et est éclairé, il n'y aura pas d'image sans système optique. La formation d'une image dépend de tous ces éléments, en cascade : un objet physique, que l'on va éclairer, avant de pouvoir « l'observer », et obtenir ainsi une image.

Dans un premier temps nous allons parler des différents espaces abstraits que nous allons aborder (partie 4.1). Nous devons tout d'abord clairement introduire ces notions capitales pour la compréhension de la suite du manuscrit. La partie 4.2 présente le modèle proposé pour la description des objets. Dans la partie 4.3, nous présentons notre modèle d'éclairage. Après ce modèle d'éclairage, la dernière étape du modèle est abordée dans la partie 4.4 : il s'agit de la modélisation du système optique. Nous donnons dans chaque partie le maximum de détails quant à l'implémentation que nous avons réalisée.

1. *Optical Transfert Function* : Fonction de Transfert Optique, voir chapitre 3. C'est une fonction qui caractérise un système optique ; elle « existe » dans l'espace des fréquences spatiales, et correspond à la Transformée de Fourier de la Réponse Impulsionnelle (PSF en anglais : *Point Spread Function*).

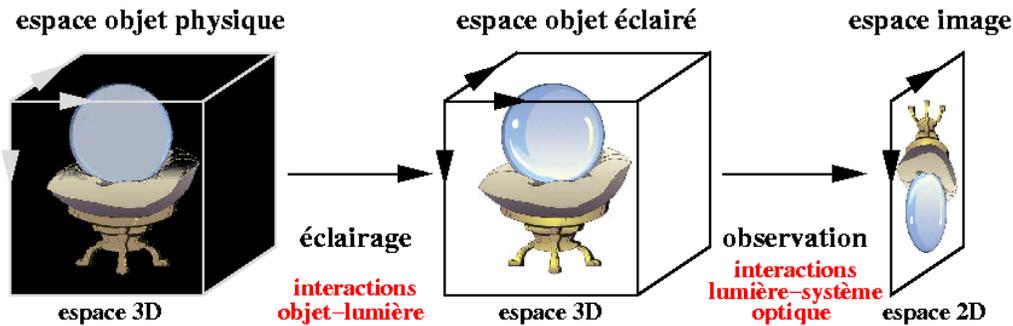


FIG. 4.2 – Sur cette figure sont représentés les 3 espaces abstraits que nous avons définis. Le premier (à gauche) est l'espace objet dans lequel on définit l'objet physique grâce à ses propriétés physiques (des grandeurs mesurables). C'est un espace 3D dans lequel il n'y a pas de lumière. Ensuite, en éclairant cet espace, des interactions lumière-matière vont avoir lieu (réfraction, absorption, ...) et vont conduire à un nouvel espace 3D : l'espace objet éclairé. Enfin vient la phase d'observation, qui va transformer cet espace 3D en un espace 2D qui est l'espace image, dans lequel on peut « voir » ce que l'on observait.

## 4.1 Les différents espaces abstraits

Il est tout d'abord nécessaire de bien comprendre le phénomène de la formation de l'image dans le cas général. En effet, une meilleure compréhension permettra de mieux appréhender dans leur globalité les phénomènes qui se produisent, et ainsi, nous pourrons plus facilement les modéliser. En introduction de ce chapitre, nous avons déjà expliqué rapidement les différentes étapes de modélisation que nous allons aborder : il y aura un modèle « physique » d'objet, un modèle d'interactions entre lumière et matière (modèle d'éclairage), et enfin un modèle d'interactions entre la lumière et un système optique (modèle d'OTF) pour obtenir une image.

Plaçons-nous dans un cas réel où un objet matériel est éclairé avec une source lumineuse, qui est ensuite observé à l'aide d'un système optique quelconque. Nous allons définir 3 notions d'espaces abstraits qui vont nous permettre de séparer 3 « états » successifs de la formation de l'image : l'état dans lequel l'objet physique existe avant d'être éclairé, puis celui où il est soumis à un éclairage, et enfin le dernier état que l'on définit quand on veut former son image.

### 4.1.1 Présentation des espaces abstraits

La modélisation a donc débuté par une subdivision du problème en 3 espaces abstraits distincts, qui sont :

- l'**espace de l'objet physique**, dans lequel l'objet existe grâce à des données physiques, sans lumière ;



FIG. 4.3 – Représentation imagée de ce que nous appelons l'espace objet physique : la bougie éteinte souligne l'absence de lumière, et la boule de cristal possède les caractéristiques des objets qui nous intéresseront par la suite (objet 3D, à la fois absorbants et translucides).

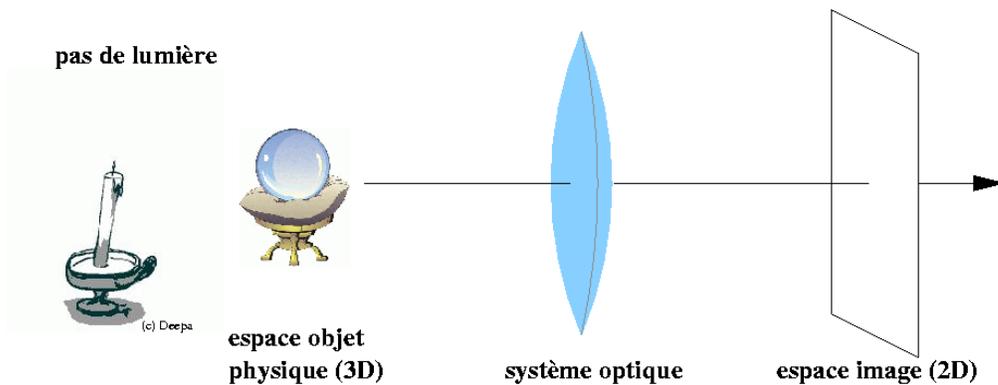


FIG. 4.4 – Si l'on tentait d'observer avec un instrument d'optique l'espace objet physique, on ne verrait rien car aucune image ne se forme : il n'y a pas de lumière. Notons que sur cette figure, le système optique et le plan image (à droite) ne font pas partie de l'espace objet.

- l'**espace objet éclairé** qui est le résultat de l'éclairement de l'espace objet précédant par une source lumineuse ;
- l'**espace image** qui est l'espace dans lequel va se former l'image que l'on observera.

Il est intéressant de remarquer que la notion d'« observation » n'intervient que dans le troisième et dernier espace modélisé ; elle peut sembler apparaître dans l'espace objet éclairé, mais ce n'est pas le cas, c'est seulement un abus de langage. Ces 3 espaces qui nous intéressent sont représentés sur la Fig. 4.2 ; elle schématise aussi les interactions qui les relient. Les espaces objets sont 3D, tandis que l'espace image est 2D.

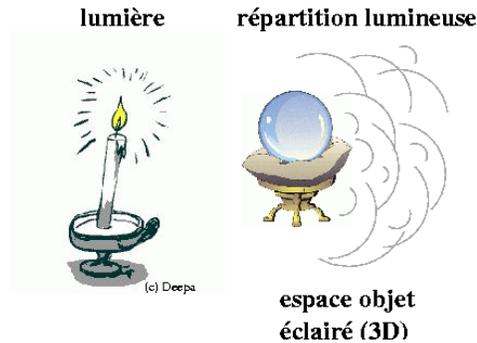


FIG. 4.5 – La propagation de la lumière à travers l’espace objet physique va donner l’espace objet éclairé. Nous avons représenté la propagation lumineuse par de arcs de cercles à droite de l’objet. Nous ferons l’hypothèse que cette propagation est stationnaire, i.e. que la répartition lumineuse 3D est toujours la même (à un très faible écart interférentiel près) quel que soit le moment d’observation. Il ne faut pas comprendre que l’on fige la lumière à un moment donné, mais au contraire, nous gardons sa nature propagative.

#### 4.1.1.1 L’espace objet physique

Dans cet espace 3D, nous allons supposer que l’on a un objet (3D lui-aussi) qui « baigne » dans un milieu homogène (vide, air, *etc.*); ici, l’objet comme le milieu ambiant ont des existences physiques, c’est-à-dire qu’ils possèdent des propriétés physiques qui sont mesurables. Ce sont par exemple leur densité, leurs propriétés de réfraction de la lumière, *etc.* Nous verrons que la modélisation de cet espace objet sera restreinte à quelques paramètres pertinents qui le décriront le mieux par la suite : les paramètres optiques. Sur la Fig. 4.3, l’espace objet physique est composé de la boule de cristal et du milieu environnant. La bougie n’est présente que pour signaler l’absence de lumière. Rien n’empêche que le système optique soit déjà présent, mais aucune image ne peut encore se former dans l’espace image (à droite sur la Fig. 4.4). L’objet physique existe, mais c’est tout. Dans la suite, nous allons éclairer l’espace objet.

#### 4.1.1.2 L’espace objet éclairé

L’espace objet dont nous venons de discuter est maintenant éclairé. La propagation de la lumière dans l’espace objet va donner lieu à des interactions lumière-matière. Des phénomènes comme de l’absorption, de la réfraction vont avoir lieu. Nous avons déjà discuté de ces phénomènes physiques dans le chapitre 2. L’espace objet éclairé est donc un espace toujours 3D, qui est défini comme une répartition tridimensionnelle d’intensité lumineuse. Sur la Fig. 4.5, la bougie allumée va envoyer de la lumière dans l’espace objet physique. C’est cette répartition lumineuse qui peut être observée avec un instrument d’optique.

**4.1.1.2.1 L'utilité de chaque rayon** Toujours dans l'espace objet éclairé, nous allons commencer à penser à l'utilité de chaque rayon à la construction de l'image. Plus précisément, nous allons étudier si les rayons contribuent ou pas à la formation de l'image. Si par exemple leur énergie est trop faible pour apporter une contribution, ils ne seront pas utiles par la suite, et pourront être supprimés dès à présent. Nous y reviendrons plus en détails lorsque nous expliquerons le modèle de création de l'espace objet éclairé dans la partie 4.3.2.4.2. En fait, tout se passe comme s'il y avait un observateur virtuel posté à droite de l'objet physique, et qui attend de « voir » si un rayon qui interagit avec de la matière va lui parvenir. Si c'est le cas, le rayon est conservé, et sinon, le rayon est détruit depuis son origine : nous supposons qu'il ne contribue pas à l'espace objet éclairé, et donc pas non plus à l'espace image. Les notions physiques qui sont rattachées à ce concept sont les notions d'angle de vue maximal (ouverture de champ) et de limitation du flux lumineux (diaphragme). Une fois que cet espace est construit, il va pouvoir être observé, *i.e.* mis en interaction avec un système optique.

### 4.1.1.3 L'espace image

En plaçant un système optique de manière à observer la scène créée par l'espace objet éclairé, on peut obtenir une image. Nous avons déjà expliqué (voir le chapitre 2) la plupart des phénomènes qui interviennent lors de cette phase d'observation, que ce soit avec une lentille simple ou bien avec un microscope. C'est ce que l'on voit avec l'image de la boule de cristal sur la Fig. 4.6 (a) : lorsqu'un état stationnaire est atteint, nous obtenons l'espace objet éclairé qui est la transcription de la propagation de la lumière dans l'espace objet physique. Le système optique va projeter cet espace 3D sur l'espace image 2D. C'est à ce niveau, pendant cette phase projective que peut apparaître le flou. Le chapitre 2 précise les conditions d'apparition du flou causé par cette observation.

La Fig. 4.6 (b) illustre la façon d'obtenir une séquence d'images. Dans les parties dans lesquelles nous présentons des résultats, il faudra faire très attention à ceux présentés dans l'espace image. En effet, il semble que les images et les coupes latérales qui y sont présentée (voir par exemple les Fig. 5.7 et 5.11) soient 3D, alors que nous sommes en train d'insister sur le fait que l'espace image est 2D. Les résultats présentés correspondent en fait à des séquences d'images 2D, et ce sont donc ces séquences représentées qui sont 3D! Dans ces cas-là, nous parlerons peut-être d'espace image par abus de langage.

### 4.1.1.4 Le terme d'observation

Nous nous plaçons ici dans la réalité que l'on perçoit, *i.e.* dans l'espace image. Nous allons discuter quelque peu du terme d'« observation » qui traduit le fait que l'on est capable d'appréhender l'espace (objet) physique à l'aide d'un instrument de mesure. Il est lié à la notion d'observateur introduite peu avant, dans le paragraphe 4.1.1.2, bien que la

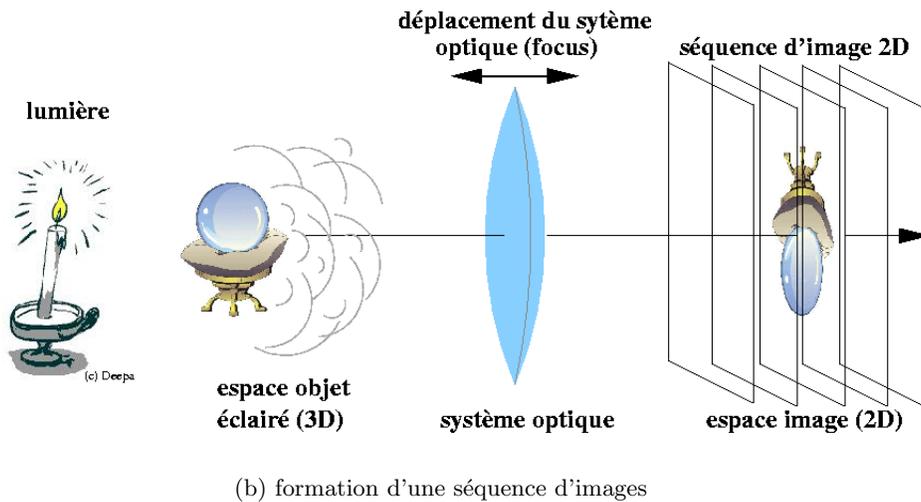
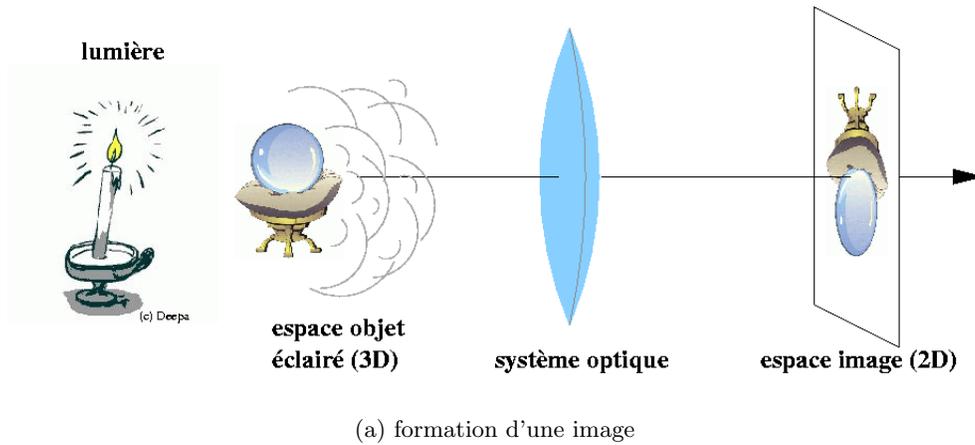


FIG. 4.6 – En observant l'espace objet éclairé avec un système optique, (a) son image va se former dans l'espace image, qui correspond physiquement au capteur sensible à la lumière (capteur CCD, ...). Comme cette image est 2D, l'information 3D va être projetée, et c'est le flou qui va apparaître dans l'image qui va être en relation avec la tridimensionnalité de l'espace objet. (b) Si on fait varier la mise au point du système optique (le « focus ») une image différente apparaît, mais elle correspond toujours au même objet. En stockant ces différentes images, nous pouvons obtenir une séquence d'images 2D.

notion précédente se situe en amont, dans l'espace objet éclairé (voir paragraphe 4.1.1.2).

Nous allons essentiellement nous attacher au cas de l'observation par des moyens optiques, car c'est à elle que nous avons affaire. Dans ce cas, le moyen d'observation le plus courant est un système de lentilles couplé à un capteur sensible à la lumière (caméra CCD, rétine, ...). Le point essentiel est un passage d'un espace 3D (espace physique) à un espace 2D (espace image) : le fait de réaliser une observation projette la réalité 3D sur un espace 2D que l'on peut atteindre.

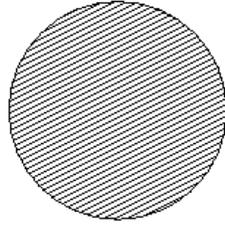
L'observation optique ne peut exister sans un éclairage préalable de l'espace objet physique. L'éclairage lui-même va perturber la réalité du fait des interactions de la lumière avec la matière. Imaginons par exemple la formation d'une caustique produite par la réfraction de la lumière sur un objet. Cette caustique n'a aucune existence « palpable » et n'existe pas dans l'espace objet physique. Pourtant, elle va perturber la réalité car nous pouvons la voir lors de l'observation.

Ce que nous essayons de démontrer, c'est que le fait d'éclairer dégrade déjà la réalité (autrement dit l'espace objet physique), et que l'observation de l'espace objet éclairé conduit à une dégradation encore plus importante de la réalité (projection). L'information 3D relative à l'objet va donner naissance au phénomène du flou (voir chapitre 2). Dans certain cas, il est possible de se servir de ce flou pour remonter à une partie de l'information 3D en prenant le chemin inverse (voir le chapitre 3), mais nous perdons tout de même beaucoup d'information. L'éclairage peut faire apparaître des artefacts optiques, mais l'observation réalise une projection 3D vers 2D qui fait apparaître du flou.

#### 4.1.2 Les interactions lumière-matière

Nous avons à faire face à un problème compliqué qui est la formation de l'image d'un objet **translucide**. Et c'est surtout le fait que l'objet soit translucide qui accroît la difficulté. Nous avons déjà parlé dans le chapitre 3 de modèles qui s'appliquaient à des objets opaques ou fluorescents, mais dans ces cas-là, les interactions lumière-matière sont plus simples optiquement parlant. Nous avons déjà présenté dans le chapitre 2 les phénomènes dont nous allons parler dans cette partie. De plus, nous confondrons volontairement par la suite les termes d'espace objet physique et d'objet physique. De plus, nous garderons en tête le schéma du montage représenté sur la Fig. 4.6 dans cet ordre : lumière, objet, système optique et plan image.

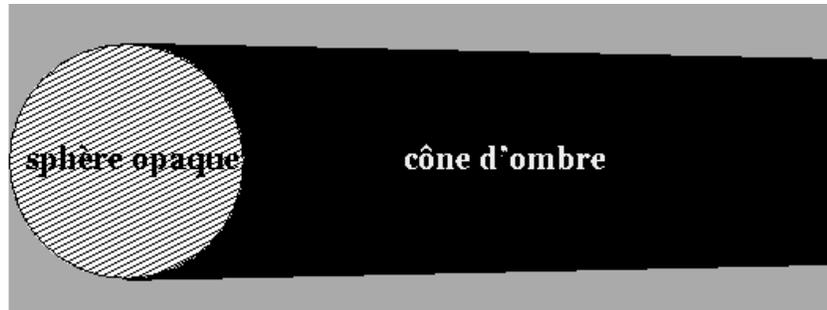
Dans le cas d'un objet opaque (diaphragme (2D), bille d'acier (3D), ...), la lumière ne peut le traverser, par définition. Si on ne tient pas compte des phénomènes ondulatoires (diffraction, interférences), les phénomènes qui vont se produire sont des réflexions à la surface et de l'absorption lumineuse ; ces phénomènes dépendent de la nature physique de l'objet considéré. Dans le cas d'objets opaques, l'espace objet éclairé présentera une forte composante d'ombre (parties sombres) due au fait que la lumière ne passe pas la barrière

**sphère opaque**

(a) espace objet physique : un objet opaque



(b) espace objet éclairé



(c) illustration des caractéristiques de l'espace objet éclairé

FIG. 4.7 – *Les interactions lumière-matière pour un objet opaque. Ici, nous nous intéressons à une sphère opaque de rayon  $20\ \mu\text{m}$ . Toutes les vues sont latérales (coupes  $XZ$ ). Dans l'espace objet éclairé, nous modélisons une sphère opaque et une source lumineuse incohérente et étendue (a) puis nous étudions la propagation des rayons (b). Nous pouvons remarquer que la sphère opaque produit un cône d'ombre ((b) et (c)). Dans le présent cas, ce cône est peu marqué. Pour le moment, nous avons conservé tous les rayons.*

optique qu'est l'objet. Sur la Fig. 4.7, nous avons modélisé une sphère opaque, et nous nous intéressons aux interactions lumière-matière. Les 3 images (a), (b) et (c) sont vues de côté dans un espace  $XZ$ . Sur la gauche de l'image (a), nous avons simulé une source étendue incohérente et sur sa droite, une sphère opaque. Le résultat de la simulation de ces interactions est représenté sur la Fig. 4.7 (b); c'est une représentation dans l'espace objet éclairé. La dernière figure (c) insiste sur les caractéristiques importantes que l'on retrouve: dans ce cas, la sphère opaque produit un cône d'ombre. Ce cône est très peu marqué si les rayons lumineux sont presque tous parallèles à l'axe optique; c'est d'ailleurs un cylindre dans la limite où les rayons sont tous parallèles à l'axe optique. Il est beaucoup plus marqué si l'angle maximum d'éclairage (voir la partie 4.3.2.2) est élevé.

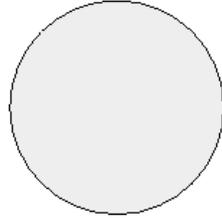
Pour un objet translucide, les interactions dominantes entre la lumière et la matière sont essentiellement la réfraction et l'absorption. La réflexion (faible) est d'ailleurs une composante de la réfraction, phénomène qui est prédominant pour un objet translucide. Sur la Fig. 4.8, nous avons étudié le cas d'une sphère translucide (a) dans des vues latérales. Sur les 2 figures du bas ((b) et (c)), nous pouvons remarquer que la réfraction crée une caustique, lieu géométrique où se croisent des rayons lumineux. Du fait du croisement de nombreux rayons lumineux, l'intensité lumineuse est plus forte sur la caustique, avec un maximum sur l'axe optique où on retrouve un point de très forte intensité qui correspond au point focal image du dioptré sphérique (voir le chapitre 2). D'autre part, nous voyons apparaître des zones d'ombre, dans lesquelles l'intensité lumineuse est nulle; elles correspondent aux lieux géométriques dans lesquels aucun rayon ne passe. Au phénomène d'absorption près, le flux lumineux doit être le même en tout plan  $XZ$ , donc il est normal d'avoir des zones d'ombre si l'on a des zones plus intenses.

### 4.1.3 Conclusion

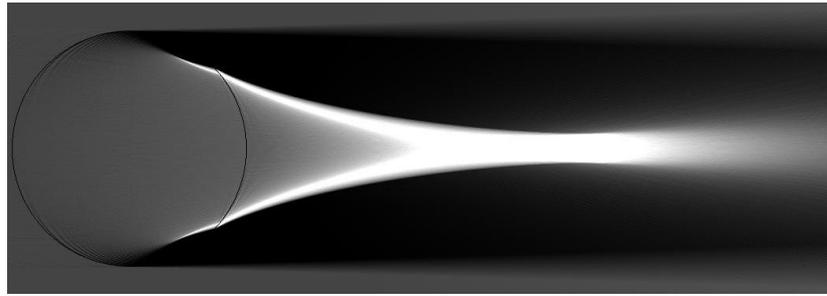
Nous avons donc proposé une modélisation plutôt intuitive du phénomène complet de formation de l'image, dans le cas d'un objet translucide ou bien opaque. Cette modélisation repose sur 3 espaces abstraits qui sont, dans l'ordre l'espace objet physique, puis l'espace objet éclairé, résultat de la propagation de la lumière à travers l'espace précédant, et enfin l'espace image, qui est défini comme le résultat de l'observation de l'espace éclairé par un instrument d'optique. Dans les parties qui vont suivre, nous allons voir plus en détails comment nous avons implémenté ces différents espaces, et aussi les « opérateurs » qui permettent de passer de l'un à l'autre comme nous venons de le définir.

## 4.2 La modélisation de l'objet

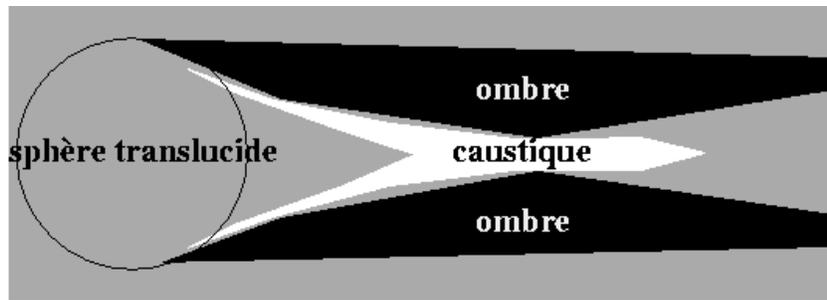
Nous allons dans cette partie nous intéresser plus en détails à la modélisation d'un objet 3D, translucide ou absorbant, dans l'espace objet physique. Nous allons le définir de

**sphère translucide**

(a) espace objet physique : une sphère translucide



(b) espace objet éclairé



(c) caractéristiques de l'espace objet éclairé

FIG. 4.8 – Les interactions lumière-matière pour un objet translucide. Nous avons modélisé une sphère translucide d'indice de réfraction  $n_1 = 1.52$  (verre) et d'absorption négligeable placée dans un milieu non absorbant d'indice  $n_2 = 1.33$  (eau), de même rayon que la sphère opaque de la Fig. 4.7, soit un rayon de  $20 \mu\text{m}$ . Toutes les vues sont latérales (coupe  $XZ$ ). Dans l'espace objet éclairé, nous modélisons ensuite une source lumineuse incohérente et étendue (a). L'image de la propagation des rayons à travers tout l'espace (b) montre l'apparition d'une caustique et de zones d'ombre (c).

manière analytique, c'est-à-dire que l'objet (simple) modélisé sera décrit par une équation dépendant des 3 coordonnées  $(x, y, z)$  de l'espace physique. Une fois modélisé de manière continue, nous allons expliquer comment il sera discrétisé.

### 4.2.1 Représentation théorique d'un objet quelconque

Afin d'avoir un modèle théorique d'objet, il est nécessaire de définir plusieurs grandeurs physiques qui sont utiles pour définir l'objet, sa taille, sa forme, ses propriétés... Nous les décrivons de manière analytique : en tout point  $(x, y, z)$ , il est possible de définir un indice complexe de réfraction (décrivant l'absorption et l'indice de réfraction de ce point). A tout point de l'espace des réels à 3 dimensions  $\mathbb{R}^3$  correspond une unique valeur dans l'espace des complexes  $\mathbb{C}$  :

$$\text{objet}(x, y, z) : \mathbb{R}^3 \rightarrow \mathbb{C}$$

L'indice complexe de réfraction est introduit dans le chapitre 2 et se note (Eq. 4.1) :

$$\widehat{n} = n + i.\kappa \tag{4.1}$$

la partie réelle décrivant la réfraction et la partie imaginaire décrivant l'absorption. Voici un exemple (eneudo-code) pour définir de manière analytique une sphère translucide ou opaque d'indice  $\widehat{n}_{int}$  plongée dans un milieu d'indice  $\widehat{n}_{ext}$  :

```

if ((x2 + y2 + z2) >= R2)
    return  $\widehat{n}_{int}$ ;
else
    return  $\widehat{n}_{ext}$ ;

```

Pour tous les points à l'intérieur de la sphère (voir Fig. 4.9), on associe un indice  $\widehat{n}_{int}$ , et pour tous ceux à l'extérieur, on leur associe un indice  $\widehat{n}_{ext}$ . De cette façon, tous les points de l'espace sont décrits (à la précision des *doubles* près). Il est donc assez facile de décrire des objets simples, mais la difficulté augmente très vite en fonction de la complexité de l'objet.

Dans la communauté de la synthèse d'images, cette modélisation analytique de formes géométriques s'appelle la « modélisation implicite » (ou « surface implicite ») par opposition à la « modélisation explicite » où on décrit les surfaces directement (*e.g.* B-rep<sup>2</sup>, CSG<sup>3</sup>, ...).

---

2. « *boundary representation* » qui correspond à l'énumération des facettes (triangles par exemple).

3. « *constructive solid geometry* » qui consiste à combiner des primitives de bases (sphère, cube, *etc.*) avec des opérateurs booléens (union, intersection, différence).

### 4.2.2 Discrétisation

Il est bien sûr évident que tous les points de l'espace ne nous intéressent pas, et qu'il va falloir nous limiter à un certain nombre d'entre eux. De plus, la création et l'exploitation de données numériques induit nécessairement une discrétisation.

Nous discrétisons un objet ainsi : nous le représentons comme une suite de plans 2-D (Fig. 4.9 (a)), où chaque plan est une répartition d'indices complexes de réfraction. De façon à travailler dans un espace 3D fini, nous plaçons une boîte virtuelle autour de l'objet (Fig. 4.9(b)). Cela nous permettra aussi de traiter un cas d'énergie finie, lorsque nous soumettrons cet espace objet à un éclairage. Nous pouvons choisir la discrétisation la mieux adaptée dans chaque direction  $x$ ,  $y$  ou  $z$ , mais en général nous conservons la même valeur  $p_{xy}$  pour les directions  $x$  et  $y$ . La discrétisation en  $z$  donne la distance entre 2 plans  $XY$  successifs.

### 4.2.3 Conclusion et perspectives

Nous venons de présenter la manière de modéliser des objets : nous partons d'une forme analytique de l'objet (essentiellement composée de sphères) et nous sommes en mesure de l'utiliser directement pour modéliser l'espace objet éclairé, ou bien de le discrétiser pour visualiser ses propriétés. L'étape d'interaction avec la lumière pour créer l'espace objet éclairé n'acceptant pas encore en entrée des objets physiques autres qu'analytiques, nous sommes confrontés au problème de la difficulté de modéliser un objet de façon suffisamment complexe.

Une évolution intéressante du modèle serait la compatibilité de l'étape suivante (décrite dans la partie 4.3) avec un espace objet physique déjà discrétisé. Cela nous permettrait de fournir en entrée des données numériques correspondant à des objets de formes complexes. On peut même imaginer des outils graphiques d'aide à la modélisation (logiciel de modélisation 3D) qui exportent dans des formats non propriétaires (type VRML par exemple). Les objets seraient donc plus faciles à modéliser, tout en étant aussi plus complexes, donc plus proches des objets physiques réels.

## 4.3 La modélisation de l'espace objet éclairé

Nous allons à présent détailler la méthode qui a été adoptée pour obtenir une simulation de l'espace objet (éclairé) à partir de l'espace objet physique dont nous avons parlé dans la partie 4.2. Nous simulons tout d'abord une source lumineuse, puis les interactions entre lumière et matière. Nous simulons exclusivement les phénomènes géométriques de la lumière et pas les phénomènes ondulatoires.

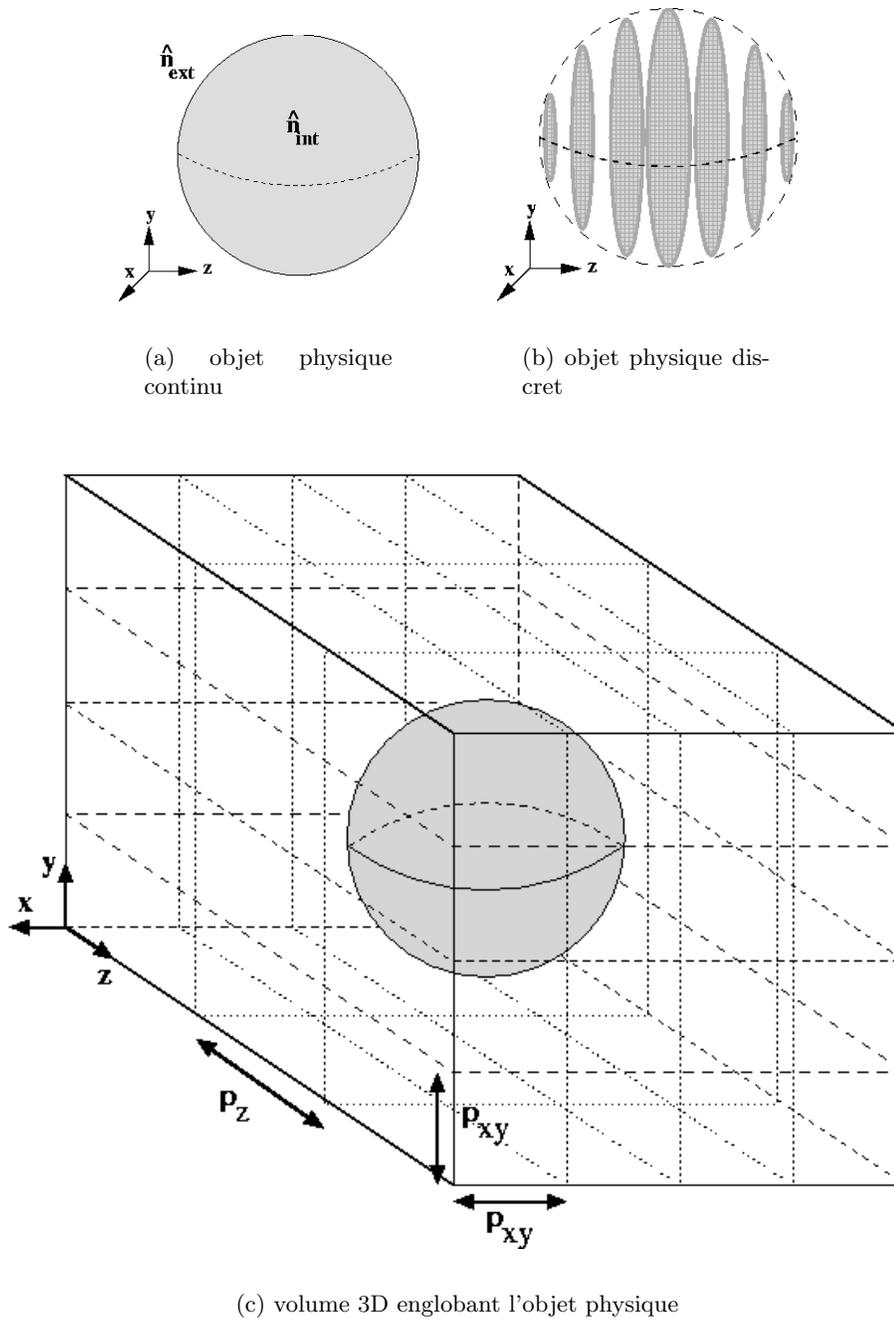


FIG. 4.9 – Plusieurs étapes de la modélisation de l'espace objet physique : une expression analytique, et donc continue dans tout l'espace 3D, donne la représentation (a) ; celle-ci, après discrétisation selon les 3 directions, va donner (b) une série de plans objet selon l'axe  $z$ . Un plan objet est un plan 2D qui est défini dans le plan  $XY$ . Nous avons finalement représenté (c) le volume 3D discret contenant l'objet physique et une partie du milieu ambiant.

### 4.3.1 La source de lumière

Nous avons simulé une source de lumière incohérente et étendue. Elle est modélisée comme une multitude de points source (nous pouvons piloter le paramètre de la densité de point source par unité de longueur) qui éclairent un angle solide paramétrable. La source lumineuse est incohérente, c'est-à-dire que tous les points source émettent de manière indépendante. Cette propriété va surtout nous intéresser par la suite : cela signifie aussi que les intensités lumineuses sont additives [Born 99] [Perez 95].

Pour résumer, nous travaillons donc avec une source qui est :

- étendue ;
- incohérente ;
- monochromatique.

et nous pouvons piloter de nombreux paramètres comme :

- les dimensions de la source (rectangulaire) ;
- la densité de points source par unité de longueur ;
- l'angle solide dans lequel émet chaque point source, ou « angle solide d'éclairage » (voir la partie 4.3.2.2.2) ;
- la densité de rayons à lancer par point source et par unité d'angle solide ;
- la longueur d'onde.

Nous avons fait varier quelques-uns de ces paramètres sur la Fig. 4.10. La figure du haut (a) est la figure de référence, et les figures suivantes (en descendant) correspondent, dans l'ordre, à une variation de la discrétisation de la source, de l'angle maximal d'éclairage et enfin de la discrétisation angulaire.

#### 4.3.1.1 Lumière monochromatique

Nous avons choisi un éclairage monochromatique, *i.e.* une longueur d'onde fixée. En général, nous gardons une longueur d'onde moyenne de  $\lambda = 0.6 \mu m$ . Nous nous sommes cantonnés à ce type de lumière pour notre modèle, mais nous avons laissé  $\lambda$  comme paramètre, de façon à pouvoir facilement le changer. Il est assez facile de généraliser le modèle à une source de lumière blanche. Plaçons-nous loin de la conception du modèle pour étudier si cette hypothèse est forte. La polychromaticité de la lumière n'intervient pas de façon notable si l'on fait abstraction de la dispersion de la lumière blanche lors de sa rencontre de la matière (soit l'objet observé soit le système optique). Si on fait abstraction de la dispersion de la lumière blanche et que l'on compte sur la correction de l'objectif du système optique, on peut supposer que l'on éclaire en lumière monochromatique. Dans le cas d'un microscope, l'objectif est corrigé de façon à ce qu'il n'y ait pas de dispersion chromatique dans les lentilles. Nous travaillons avec des objets suffisamment gros devant la longueur d'onde pour pouvoir faire l'hypothèse qu'il n'y a pas de diffraction.

### 4.3.2 La phase propagative de la lumière

Nous présentons ici le modèle de construction de l'espace objet éclairé. Nous simulons de façon géométrique la propagation de la lumière à travers l'espace objet physique. Pour cela, nous n'avons pas utilisé un moteur de lancer de rayons (« *ray tracing* » en anglais) déjà existant, mais nous en avons implémenté un nouveau. Il nous permet donc de simuler de manière géométrique les interactions de la lumière avec la matière. Nous avons déjà parlé de l'interaction de la lumière avec un objet translucide dans le chapitre 2 et aussi un peu dans la partie 4.1.2. Plusieurs phénomènes de différentes natures coexistent, mais nous n'avons modélisé qu'un seul type : les phénomènes de nature géométrique. Ces phénomènes dépendent de la nature physique des objets, de leur taille relative par rapport à la longueur d'onde. Nous pouvons citer :

- l'absorption : ce phénomène est plus ou moins important et dépend de la nature physique du spécimen ; il est modélisé ;
- la réfraction : ce phénomène est important s'il s'agit d'un objet translucide ou transparent, et est totalement inexistant dans le cas d'un objet opaque ; il est modélisé ;
- la dispersion : phénomène ondulatoire, peu important dans le cadre de notre étude ; il n'est pas modélisé comme tel, mais il est quand même simulé ;
- la diffraction : phénomène ondulatoire, assez important dès que le spécimen possède une taille de l'ordre de la longueur d'onde de l'éclairage. Il n'est pas modélisé car les spécimens observés sont grands devant la longueur d'onde, mais pourrait être une bonne amélioration si l'on s'intéressait à des objets ou des détails plus petits (de l'ordre du micromètre).

#### 4.3.2.1 Un nouveau moteur de lancer de rayons

Nous avons donc implémenté un logiciel de type ray-tracing dédié à ce travail. Bien qu'il existe des logiciels commerciaux (3D Studio<sup>4</sup>, LightWave 3D<sup>5</sup>, ...) ou libres de droit et open sources (POV-Ray<sup>6</sup>) déjà existants, nous avons choisi de créer notre propre logiciel pour plusieurs raisons :

- nous voulions un résultat qui soit le plus proche possible de la physique. Le but du ray-tracing et de l'image de synthèse en général est de créer des images (magnifiques) **ressemblant le plus possible** à la ce que visualise l'œil humain. Il suffit que les écarts à la réalité dérangent le moins possible l'oeil pour que l'image puisse avoir un **aspect** réel. C'est ce que nous voulions éviter : des astuces pour accélérer le calcul

---

4. Site officiel sur <http://www.ktx.com/3dsr4/>

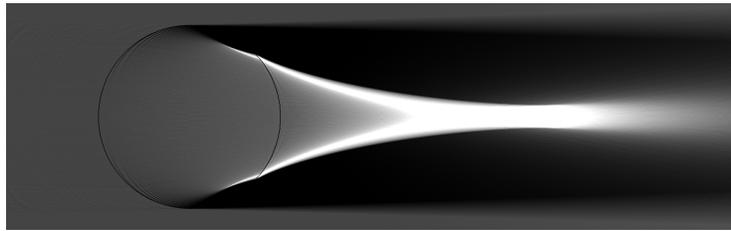
5. Site officiel sur <http://www.newtek.com/>

6. Site officiel sur <http://www.povray.org> .

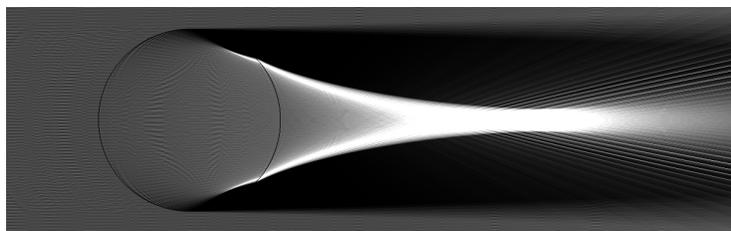
d'une image tout en conservant un aspect réel. En codant à nouveau un moteur de lancer de rayons, nous étions sûrs de conserver les propriétés physiques que nous voulions y introduire ;

- pour ce faire, nous utilisons une méthode différente de celle employée en lancer de rayons : nous lançons tous les rayons depuis la source lumineuse. Comme un grand nombre de rayons lancés de la source ne contribuent pas à l'image (ils sont déviés, absorbés...), une méthode inverse est généralement utilisée : les rayons sont lancés depuis l'observateur vers la source. C'est une bonne optimisation en te de calcul, mais si l'observateur change de place, il faut tout recalculer. De plus, dans notre cas, nous n'avons pas encore défini d'observateur ou de caméra ;
- bien que nous fassions du lancer de rayons, le résultat que nous attendons n'est pas celui généralement fourni en sortie par un logiciel déjà existant. Presque toujours, en lancer de rayons, on modélise une scène 3D dans laquelle on définit les objets, leurs propriétés physiques, *etc.* C'est l'équivalent de notre espace objet physique. Ensuite, on place une **caméra** qui va observer la scène en un endroit donné. La phase suivante est la phase de rendu, durant laquelle est réalisé le lancer de rayons. Une fois qu'elle est terminée, l'image est construite : il s'agit d'un point de vue de la scène ; si on décide d'en changer, il va falloir modifier les paramètres de la caméra et recommencer la phase de rendu en entier. De notre côté, nous nous intéressons à la répartition en énergie de la scène (voir la partie 4.1.2) en tout point, et c'est seulement une étape. L'étape de simulation d'une image se situe plus loin dans le modèle. Nous nous rapprochons de ce fait des techniques de *photon mapping* développées par Jensen [Jensen 95] [Jensen 01b] (voir la partie 3.3.1). Nous n'utilisons pas le même vocabulaire que lui, car nous avons découvert ses travaux après avoir travaillé sur notre modèle, mais nous pouvons assimiler l'**espace objet éclairé** à la *photon map* qu'il calcule.

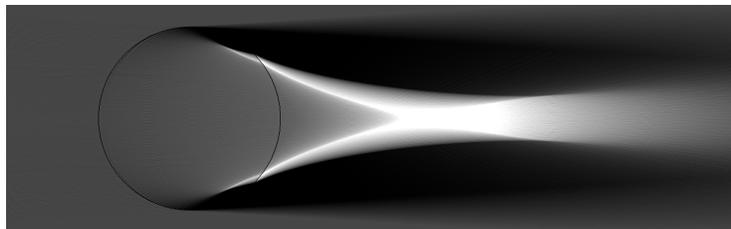
Nous avons besoin de décrire quelques-unes des caractéristiques qui vont nous être utiles. Celles-ci seront expliquées plus en détails dans la partie 4.3.2.4. Tout d'abord, la source lumineuse est incohérente (voir le chapitre 2), c'est-à-dire que les intensités sont additives : si 2 rayons d'intensité  $I_1$  et  $I_2$  se coupent en un point, la valeur de l'intensité qui sera stockée en ce point sera  $(I_1 + I_2)$ . Ensuite, nous considérons la lumière d'un point de vue géométrique, c'est-à-dire que l'on peut isoler des rayons (chose impossible d'un point de vue ondulatoire), et que ceux-ci sont soumis aux lois géométriques de la réfraction : les lois de Snell-Descartes (ou bien les équations de Maxwell dans le cas ondulatoire). Ces lois sont introduites dans le chapitre 2.



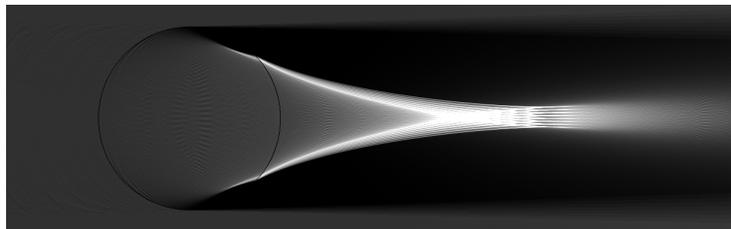
(a) espace éclairé de référence



(b) influence de la discrétisation de la source



(c) influence de l'angle d'éclairage



(d) variation du nombre de rayons par unité d'angle

FIG. 4.10 – Comparaison de l'image de référence (a) avec des images similaires, pour lesquelles nous avons fait varier un seul paramètre à chaque fois : la discrétisation de la source (b), l'angle  $\alpha_{max}$  d'éclairage (c) et finalement la discrétisation angulaire de la source.

### 4.3.2.2 La source lumineuse

Si nous faisons varier la taille de la source, il arrive un moment où nous remarquons l'absence de rayons en certaines zones. Il faut de toute façon que les dimensions de la source soit grande devant les dimensions de l'objet, puisqu'en réalité, avec un microscope optique, le rapport entre la taille de la source lumineuse (quelques centimètres) et la taille moyenne des spécimens observés (quelques dizaines de micromètres) donne  $\frac{10^{-2}}{10 \cdot 10^{-6}} \simeq 10^3$ . On a donc un rapport de l'ordre de 1000 entre la source et l'objet dans le cas d'un microscope réel. Dans le cadre de notre modélisation, nous expliquons dans la partie 4.3.2.3.1 que pour des raisons d'optimisation de temps de calcul, il est possible de limiter la taille de la source.

**4.3.2.2.1 Discrétisation de la source** Si nous faisons varier le nombre de points source pour une même intensité, on voit sur la Fig. 4.10 (b) l'apparition d'*aliasing*<sup>7</sup>. Tout se passe comme si certains points de l'espace n'étaient jamais, ou rarement sur le trajet des rayons lumineux : l'aspect discret de l'image apparaît alors.

**4.3.2.2.2 L'angle maximum d'éclairage** Sur la Fig. 4.10 (c) nous avons augmenté l'angle maximum d'éclairage. Il faut en tenir compte, car il est très important dans l'espace objet éclairé, et il l'est aussi dans l'espace image : la distribution en intensité dans l'espace éclairé peut changer énormément (en valeurs relatives) lorsque l'on change la valeur de ce paramètre. Dans le cas du modèle d'une sphère translucide qui baigne dans un milieu d'indice inférieur, une caustique se forme (voir le chapitre 2 et la Fig. 4.10 par exemple), et un point caractéristique très intense apparaît sur l'axe optique. Si on augmente l'angle maximum d'éclairage, ce point particulier se rapproche de la sphère, comme si l'on avait fait varier les indices. Pour ce point particulier, il existe une distance maximale à la sphère qui correspond à un angle d'éclairage maximal égal à zéro (lumière incidente parallèle à l'axe optique).

**4.3.2.2.3 Le nombre de rayons par unité d'angle** La discrétisation angulaire est aussi importante que la discrétisation de la source, et on voit aussi apparaître des phénomènes d'*aliasing* si cette valeur est trop faible (Fig. 4.10 (d)).

### 4.3.2.3 Détails sur l'implémentation de la source lumineuse

La source lumineuse est donc simulée comme une multitude de points source élémentaires répartis sur un support rectangulaire (Fig. 4.11 (a)). Chacun de ces points source peut émettre dans toutes les directions, selon un angle variant de  $0^\circ$  à  $90^\circ$ , mais généralement on choisit un angle maximum que l'on note  $\alpha_{max}$ . Nous l'avons représenté en détails sur la Fig. 4.11 (b) : en haut, nous voyons l'angle maximal d'éclairage, et en bas, nous

7. Apparition de phénomènes discrets à travers des motifs de pixels non désirés.

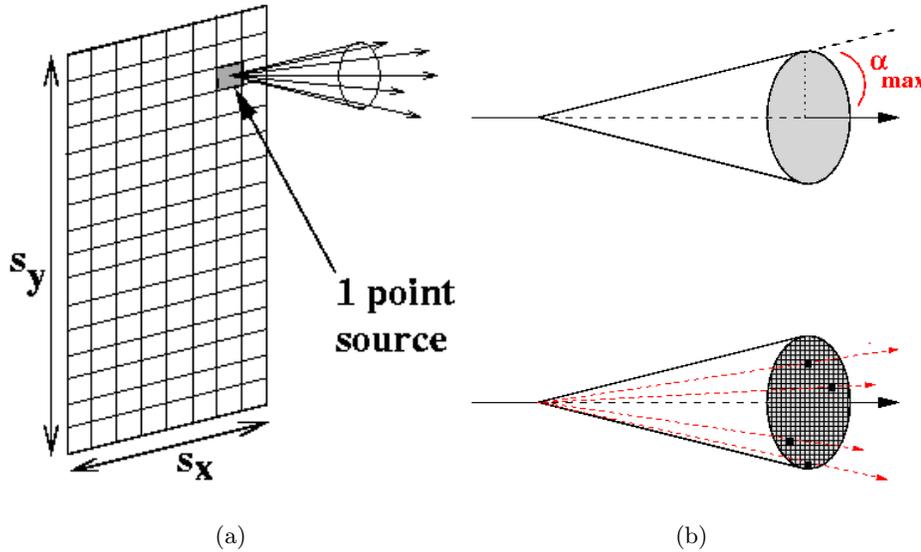
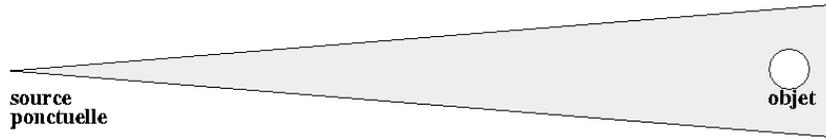


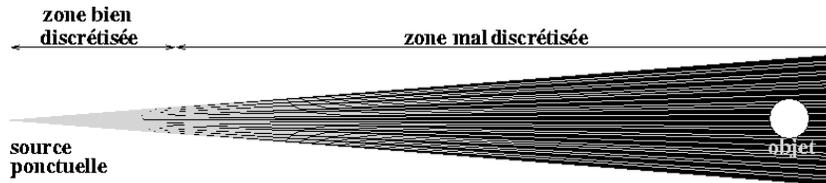
FIG. 4.11 – Détails de la source lumineuse : (a) représente le support de la source. Il est bidimensionnel, de taille  $s_x \times s_y$  (très souvent  $s_x = s_y$ ). Lorsque l'on passe à un monde discret, on a un nombre fini de points source. On pilote l'échantillonnage XY de la source à travers un paramètre. (b) Nous avons représenté un détail d'un point source : afin de simuler une source qui éclaire dans toutes les directions (source d'onde sphérique), à chaque point source est associé le même angle solide d'éclairage. Il est fourni à travers un angle  $\alpha_{max}$ , angle maximum au-delà duquel on n'envoie plus de rayon. Enfin, la discrétisation de l'angle solide ((b), en bas) nous donne le nombre de rayons par unité d'angle solide ; cela nous permet d'avoir un nombre fini de rayons à lancer.

avons représenté la discrétisation de cet angle solide pour avoir un nombre fini de rayons. Plutôt que de simuler une source lointaine très étendue qui émet dans un certain angle limité par  $\alpha_{max}$ , on peut simuler une source proche moins étendue (suffisamment pour qu'aucune discontinuité d'intensité n'apparaisse spontanément) avec le même angle limite  $\alpha_{max}$ . Nous illustrons ces propos sur la Fig. 4.12 avec une source ponctuelle. Si le nombre de rayons par unité d'angle (sur la figure, en 2D) est très grand, la source peut être placée très loin sans altérer la continuité de la répartition lumineuse (Fig. 4.12 (a)).

On définit la longueur de continuité comme étant la distance à la source à laquelle apparaît la discrétisation angulaire de la source. Connaissant la taille  $t$  (en  $\mu m$ ) d'un pixel carré et la valeur  $A$  (en rayons par radian en 2D, et en rayons par stéradian en 3D) de la discrétisation angulaire, on peut facilement déduire à quelle distance  $d_{disc}$  de la source, 2 rayons voisins seront distincts : il suffit que la distance inter-rayons soit supérieure à  $t$ . Nous allons effectuer ce calcul en 2D en prenant en compte les rayons extrêmes (le dernier et l'avant dernier plus proche de l'angle limite), car l'écart apparaît plus tôt (problème de géométrie). Entre 2 rayons, la différence d'angle est  $\frac{1}{A}$ , et il faut



(a) bonne discrétisation angulaire de la source



(b) mauvaise discrétisation angulaire de la source

FIG. 4.12 – Dans des conditions réelles, la source de lumière se trouve physiquement à quelques dizaines de centimètres de l'objet; elle est décrite en détails dans le [[Chapitre-2]]. Lors de la discrétisation, il est difficile de placer une source lumineuse à plusieurs centimètres, dans l'espace physique. En effet, si on a une source discrète, nous aurons besoin de nombreux rayons par unité d'angle solide pour avoir une impression de continuité si on se place loin de la source (a); si la discrétisation n'est pas suffisante, on la voit apparaître loin de la source (b). De plus, une forte densité de rayons par unité d'angle implique un très grand nombre de rayons, soit un *te* de calcul accru.

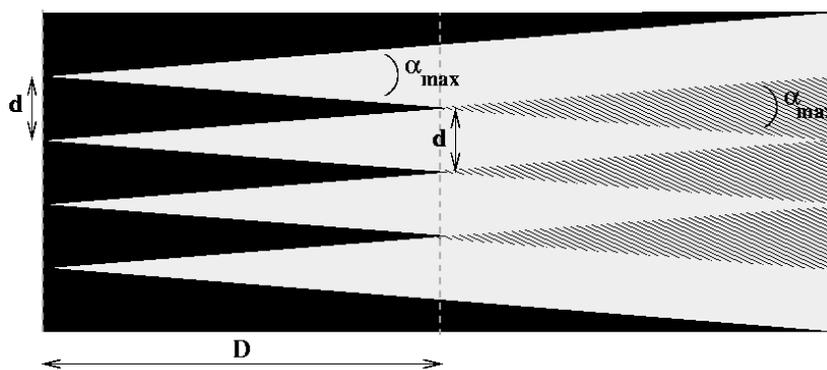
$d_{disc}(\tan \alpha_{max} - \tan(\alpha_{max} - \frac{1}{A})) < t$ . Avec  $t = 7.75 \text{ pix}$ ,  $A = 5 \text{ rayons.rad}^{-1}$  et  $\alpha_{max} = 0.1 \text{ rad}$ , on trouve  $d_{disc} \sim At \sim 38 \mu\text{m}$ .

Pour lutter contre un phénomène d'*aliasing*<sup>8</sup> qui apparaît lors de l'éclairage, nous permettons à chaque point de la source lumineuse de pouvoir :

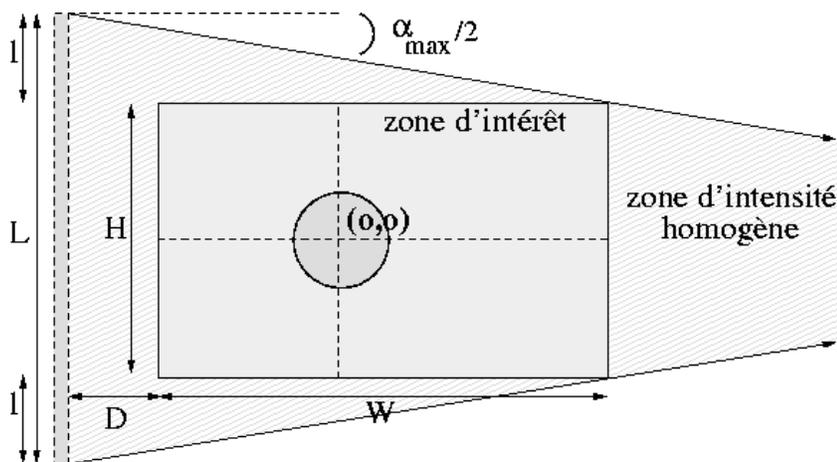
- se mouvoir selon l'axe  $z$  selon une toute petite distance, qui est calculée aléatoirement. Cela peut se justifier physiquement du fait que la source lumineuse réelle est épaisse, alors que la présente source modélisée était uniquement 2D (en XY). L'échelle de variation est de l'ordre de 0.25% ;
- faire varier leur intensité de l'ordre de 1% ; c'est aussi une variation aléatoire.

Grâce à ces variations, nous avons pu améliorer grandement la qualité des images calculées. Malheureusement, la totalité de l'*aliasing* n'est pas enlevé. De plus, les valeurs indiquées sont relativement faibles, car une trop grosse variation aura une influence néfaste sur l'*aliasing* de l'image.

8. Comprendre par là un effet de pixelisation dû à la discrétisation des sources.



(a) un déplacement de la source discrétisée entraîne sa diminution de taille



(b) si la zone d'intérêt est connue, on peut optimiser la taille de la source

FIG. 4.13 – Nous pouvons définir une source lumineuse optimale, en terme de calcul, tout en gardant le même résultat que la simulation de la source physique. Tout d'abord, nous pouvons limiter la discrétisation angulaire (voir Fig. 4.12) par le rapprochement de la source lumineuse le plus proche possible de l'objet (a) : dans ce cas-là, on obtient une source moins étendue et moins discrétisée angulairement qui est équivalente. Ensuite, il est possible de définir une taille optimale de source lumineuse si on connaît l'angle maximum  $\alpha_{max}$  et la zone d'intérêt, i.e. la zone qui sera prise en compte dans les étapes suivantes (b). Le zéro est défini au centre de l'objet.

**4.3.2.3.1 Restriction de la source lumineuse** Nous allons donc chercher à rapprocher la source lumineuse de l'objet de façon à diminuer le nombre de rayons à lancer, comme nous l'avons expliqué la partie précédente. Si nous conservons une source ponctuelle, il n'est pas possible d'obtenir le même résultat si on rapproche la source de l'objet : en effet, certaines fréquences spatiales sont perdues. Par contre, si on a une source suffisamment étendue, une source lointaine et très étendue est équivalente à une source plus proche et moins étendue. Cette assertion est illustrée sur la Fig. 4.13 (a) avec une source très discrétisée. Soit une source étendue composée de  $N$  points source distants de  $d$ , et présentant un angle maximal  $\alpha_{max}$  donné. A une distance  $D = \frac{d}{2 \tan \frac{\alpha_{max}}{2}}$ , nous pouvons recréer une source identique, mais avec  $N - 1$  points source. Si on suppose que l'énergie lumineuse émise est homogène, on peut facilement montrer que les  $N - 1$  points source secondaires sont de même intensité que les  $N$  points source initiaux. Si on choisit une distance  $d = 0.01 \mu m$ , un  $\alpha_{max} = 3.6^\circ$ , ce qui nous donne  $D = 0.16 \mu m$ . Une source initiale de 4000 points source située à  $600 \mu m$  de l'objet est équivalente une source de  $4000 - (600 - 6)/(D) = 3313$  points située à  $6 \mu m$  de l'objet. En calculant ces 2 images en format double précision, nous obtenons 2 images identiques<sup>9</sup>.

La taille de la source peut aussi être limitée : à partir d'une certaine taille, même si on augmente la taille de la source (voir la Fig. 4.13 (b)), il n'y a plus aucun nouveau rayon qui se retrouve présent dans l'image. Nous pouvons facilement estimer la taille de la source d'après une construction géométrique : connaissant l'angle  $\alpha_{max}$  et les caractéristiques de la zone d'intérêt (position par rapport à la source, taille), il est facile de trouver quelle doit être la dimension minimum de la source pour avoir un éclairage uniforme. Nous allons faire les calculs en 2D, mais ils se généralisent sans difficulté en 3D. En relation avec la Fig. 4.13 (b), on appelle  $D$  la position de la source lumineuse,  $H$  la hauteur de la zone d'intérêt et  $W$  sa largeur. La discrétisation horizontale (en  $z$ ) est de  $p_z$  et verticale (en  $x$ ) de  $p_{xy}$ . On montre que la source doit au minimum mesurer une taille  $L_{min}$  donnée par l'Eq. 4.2 :

$$\begin{aligned} L_{min} &= \frac{H}{p_{xy}} + 2.l \\ &= \frac{H}{p_{xy}} + 2 \frac{W+D}{p_z} \tan \frac{\alpha_{max}}{2} \end{aligned} \quad (4.2)$$

#### 4.3.2.4 Les interactions entre lumière et matière

Comme aucun observateur n'est défini avec précision, chaque rayon est donc lancé à partir de la source. Le rayon se propage en ligne droite s'il se trouve dans un milieu homogène, et subit une déviation si le milieu n'est plus homogène. Comme on l'a vu au

---

9. Voici un peu plus de détails sur la comparaison entre 2 images : chacune de ces images est sauvée dans un format brut. En mémoire, chaque valeur est en *double* (valeur stockée sur 8 octets), mais lors de la sauvegarde dans un fichier texte, les valeurs sont stockées en *float* (sur 4 octets). Les valeurs à comparer sont donc relativement précises, et la précision de la différence est estimée à  $10^{-3}$ .

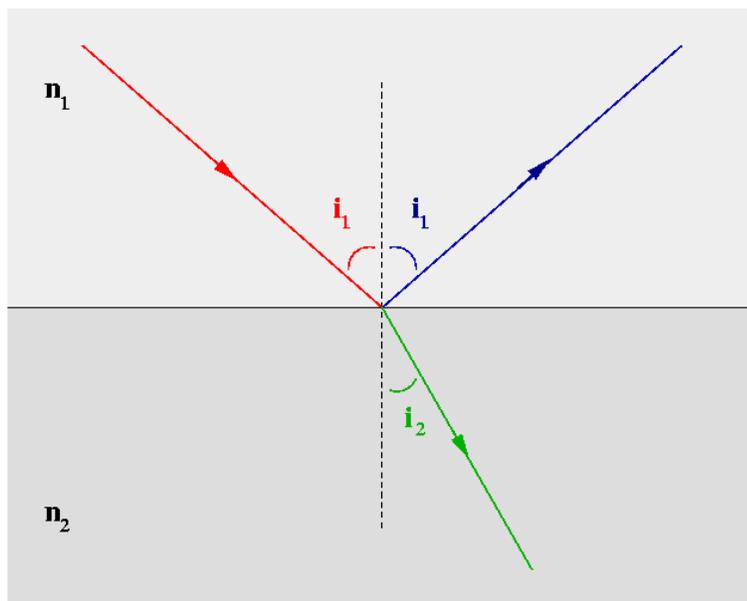


FIG. 4.14 – Illustration de la loi de Snell-Descartes : nous avons 2 milieux d'indices  $n_1$  et  $n_2$ . On s'intéresse à un rayon allant de  $n_1$  vers  $n_2$  (à gauche) qui fait un angle  $i_1$  avec la normale à la surface. Ce rayon est soit transmis (rayon réfracté, en bas) si  $|\sin i_1| \leq \frac{n_2}{n_1}$ , soit réfléchi (à droite) si  $|\sin i_1| > \frac{n_2}{n_1}$ . Dans ce dernier cas, l'angle du rayon réfléchi avec la normale à la surface vaut  $i_1$ .

chapitre 2, cette déviation est décrite par les lois (de l'optique géométrique) de Snell-Descartes qui sont les suivantes [Born 99] [Perez 95] :

$$\begin{aligned} n_1 \sin i_1 &= n_2 \sin i_2 \text{ si } |\sin i_1| \leq \frac{n_2}{n_1} \\ i_1 &= i_2 \quad \text{sinon} \end{aligned} \quad (4.3)$$

La Fig. 4.14 illustre plus en détails ces conditions. Un rayon lumineux dans un milieu  $n_1$  arrivant à une interface avec un milieu moins réfractant  $n_2 < n_1$  peut être réfléchi si son angle d'incidence ( $i_1$ ) est trop fort. Si son angle d'incidence n'est pas trop important, alors il est transmis, « réfracté ». Par contre, si  $n_2 > n_1$ , l'Eq. 4.3 montre qu'il ne peut y avoir réflexion totale d'un rayon, et que dans ce cas tous les rayons sont transmis.

Un rayon comme nous l'avons défini dans le code est en fait un enregistrement de rayons élémentaires. Nous avons défini un rayon élémentaire par un point origine  $(x, y, z)$  et un vecteur unitaire  $\hat{v}$  qui donne la direction de propagation. Cela définit et localise ce rayon élémentaire dans l'espace. Dès que le rayon est dévié en un point (réflexion, réfraction...), ce point devient le nouveau point source et sa nouvelle orientation définit le nouveau vecteur direction. Nous modifions donc les coordonnées du point origine, la valeur du vecteur direction, mais nous conservons aussi un enregistrement du rayon précédent. Lorsque nous décidons de la terminaison de la propagation du rayon, le rayon global est construit et nous pouvons recommencer avec un autre.

Nous pouvons réécrire un rayon  $(x, y, z, \hat{v})$  comme un vecteur  $\vec{v}$  qui n'est plus unitaire et qui est défini entre le point source et le point courant. En utilisant ces notations et en les injectant dans l'Eq. 4.3, nous pouvons écrire de manière plus élégante l'algorithme [Jähne 99, Vol. 1, Ch. 4] sans pour autant faire des simplifications.

$$\begin{aligned}\vec{v}_t &= a \cdot \vec{v}_i + b \cdot \hat{n} && \text{pour un rayon transmis} \\ \vec{v}_r &= \vec{v}_i - 2 \cdot (\vec{v}_i \cdot \hat{n}) \cdot \hat{n} && \text{pour un rayon réfléchi}\end{aligned}$$

avec  $a = \frac{n_1}{n_2}$  et  $b = \frac{n_1}{n_2} - \vec{v}_i \cdot \hat{n} - \sqrt{1 - \left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \cdot [1 - (\vec{v}_i \cdot \hat{n})^2]}$ . Nous avons noté  $\vec{v}_i$  le rayon incident,  $\vec{v}_t$  le rayon transmis et  $\vec{v}_r$  le rayon réfléchi. Au point d'impact, la normale à la surface est représentée par le vecteur unitaire  $\hat{n}$ , dirigé vers l'extérieur de la surface.

**4.3.2.4.1 Milieu absorbant et intensité du rayon** Chaque rayon est aussi défini par son intensité, qui lui est propre. Cette intensité représente l'énergie du rayon, et elle est strictement positive. L'intensité globale d'une zone de l'image dépend non seulement de la valeur de l'intensité de chaque rayon, mais aussi du nombre de rayons.

L'intensité d'un rayon ne peut que décroître, et cela se passe lorsqu'il traverse un milieu absorbant : en fonction de la distance que le rayon parcourt dans ce milieu, il est plus ou moins absorbé et son absorption est décrite par la formule  $I_2 = I_1 e^{-\kappa L}$  où  $\kappa$  est le coefficient d'absorption (de l'ordre de  $10^{-5} m^{-1}$  pour un matériau translucide) et  $L$  la distance parcourue. Un rayon peut donc *a priori* posséder une intensité différente en tout point. Dans la partie suivante, nous expliquons qu'il suffit de garder une seule valeur de l'intensité.

**4.3.2.4.2 Les rayons à prendre en compte** Dans la réalité, l'espace objet éclairé est un espace 3D dans lequel en tout point on a pu définir une intensité. Même si l'objet observé est opaque (voir Fig. 4.7), de l'intensité lumineuse arrive de la source jusqu'à sa surface de gauche. Mais par contre, tous les rayons qui frappent ne se propageront pas plus loin, et ne pourront en aucun cas frapper la surface d'un instrument d'optique! Ils ne nous intéressent donc pas pour modéliser la formation de l'image, et ne sont plus pris en compte dans la définition de l'espace objet éclairé.

Afin de généraliser cette notion, tout rayon absorbé (intensité finale nulle) ou bien dévié de façon à ne pas frapper le côté droit de la zone d'intérêt (voir Fig. 4.13 (b)) ne sera pas tracé dans l'espace objet éclairé. De même, un rayon d'intensité initiale  $I_0$  et d'intensité finale (*i.e.* à la sortie de la zone d'intérêt)  $I_f < I_0$  sera tracé comme un rayon d'intensité constante  $I_f$  sur tout son parcours. Il faut cependant noter que même si cette nouvelle modélisation va être visible dans l'espace éclairé, le calcul de la propagation des rayons se

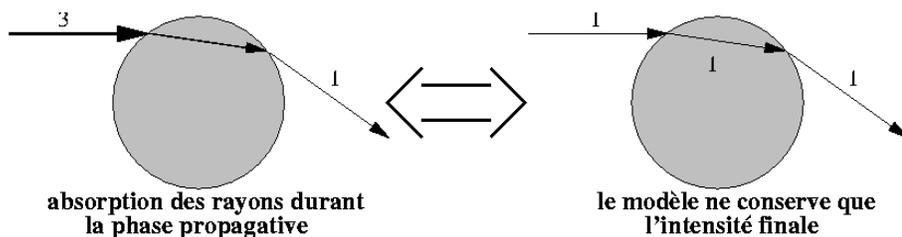


FIG. 4.15 – Modélisation de l’absorption d’un rayon. Durant la phase propagative, le rayon se voit affecté une intensité qui va diminuer en fonction de l’absorption du milieu rencontré. Nous étudions ici le cas d’une sphère translucide (elle est réfractante et absorbante). Sur la figure de gauche, l’intensité du rayon (arbitraire ici, pour illustrer) est de 3 avant la sphère, passe ensuite continuellement de 3 à 1 dans la sphère, puis est de 1 en sortie. Dans notre modèle, cela est équivalent à un rayon suivant le même chemin optique, mais possédant tout au long de sa propagation la même intensité (figure de droite). Pour plus de détails sur l’implémentation de l’absorption, voir la partie 4.3.2.4.1.

fait toujours de façon identique à ce qui est expliqué dans la partie 4.3.2.4. Nous explicitons plus en détails cette modélisation de l’absorption sur la Fig. 4.15.

### 4.3.3 Simulation de la diffusion

La diffusion est un phénomène important [v.d. Hulst 81] que nous n’avons pas inclus de manière rigoureuse dans notre modèle. C’est un phénomène ondulatoire qui va influencer la direction des faisceaux lumineux, qui sont sensés se diriger en ligne droite : même si le rayon est réfracté (transmis), une certaine partie de l’énergie va être **diffusée**, c’est-à-dire non-transmise et envoyée dans toutes les directions. C’est donc de la lumière qui n’atteindra jamais l’observateur (défini dans le chapitre 4). Nous allons donc supposer que **tout se passe comme si** cette énergie était **absorbée** et non pas **diffusée**. Ce coefficient d’absorption équivalent, que nous allons noter  $\xi$ , a été estimé à  $0.007 \mu\text{m}^{-1}$  pour une sphère microscopique d’une vingtaine de microns.

Nous l’avons calculé sur plusieurs images de spécimens du même type pour en avoir une idée précise. Cela permet d’avoir des simulations d’images d’objets translucides qui se rapprochent encore plus précisément des images réelles, comme nous le verrons dans le chapitre 5.

### 4.3.4 Conclusion et perspectives

Nous avons proposé un modèle de propagation de la lumière à travers un objet translucide. C’est un modèle de lumière qui répond aux lois de l’optique géométrique, et nous avons montré que la réfraction est un phénomène important qui perturbe l’espace objet : en effet, la répartition lumineuse est le résultat de la réfraction de la lumière à travers le spécimen. On ne retrouve pas aisément la surface de l’objet lui-même (comme dans le cas

d'un objet opaque) ; on ne localise pas non plus facilement l'objet (comme pour un objet luminescent). En d'autres termes, sur les coupes  $XZ$  de la Fig. 4.10, on ne retrouve pas un cercle parfait qui correspondrait à la bille (le cercle qui existe n'est présent que pour faire ressortir les contours de l'objet). La figure obtenue ressemble plus à une goutte d'eau qui serait allongée le long de l'axe optique. Si nous voulions faire de la reconstruction, il ne serait donc pas évident de retrouver la surface et la forme d'un objet translucide. La réfraction à l'intérieur du spécimen fait naître des phénomènes qui ne permettent pas de discriminer facilement la surface du spécimen translucide, à la différence d'un objet opaque. On peut donc déjà voir que la phase de propagation de la lumière dans un espace contenant un objet opaque va perturber les observations.

Une perspective intéressante, qui permettrait de traiter des objets plus petits, serait d'aller vers une prise en compte des phénomènes ondulatoires. Il faudrait alors abandonner notre approche géométrique, et passer à une approche complètement ondulatoire pour la phase de création de l'espace objet éclairé. Pour cela, les travaux de Kagalwala et *al.* [Kagalwala 98] [Kagalwala 99a] [Kagalwala 00b] proposent justement un modèle de ray tracing qui prennent en compte la polarisation de la lumière (voir le chapitre 3).

## 4.4 Troisième étape : la modélisation du système optique

L'introduction d'un système optique nous permet d'observer les phénomènes qui se produisent à l'échelle du spécimen, sans perturber de manière physique l'espace objet. Mais ce système optique introduit tout de même des perturbations, car comme nous l'avons dit dans la partie 4.1.1.4, nous passons d'un espace 3D à un espace 2D ; il y a donc une notion sous-jacente de projection, de perte d'information. Cette perte d'information entre l'espace objet éclairé et l'espace image va se traduire essentiellement par l'apparition d'un phénomène de flou. On a vu dans le chapitre 2 qu'un objet 3D épais devant la profondeur de champ d'un système optique ne va pas apparaître entièrement net. Dans cette partie, on suppose que l'espace objet éclairé existe, mais dans notre modèle, cette dernière étape de la formation de l'image et l'étape de création de l'espace objet éclairé sont indépendants. D'ailleurs, le modèle de système optique pour la création de l'image calculée (résultat) est basé sur un modèle complètement ondulatoire, comme nous allons le voir. Nous allons tout d'abord présenter la théorie pour un modèle continu, puis nous expliciterons la théorie pour un modèle discret. Tout au long de cette analyse, nous supposons que le système optique est un microscope ; ces appareils sont généralement corrigés contre la plupart des aberrations chromatiques et géométriques [Born 99, Chapitre VI].

#### 4.4.1 Présentation

On peut trouver dans [Born 99] le principe général de formation de l'image dans le cas d'un microscope. Il existe aussi des descriptions plus spécifiques pour des objets opaques [Nayar 94] ou luminescents (fluorescence) [Agard 84a] [Agard 89]. Nous en parlons plus précisément dans la partie bibliographie, au chapitre 3.

Nous faisons comme hypothèse que l'espace objet (éclairé) est défini comme étant continu :

- chaque point  $P$  de cet espace 3D, localisé en  $(x, y, z)$ , a comme intensité  $o(x, y, z)$  ;
- $o(x, y, z_0)$  désigne la répartition en intensité du plan focalisé par le système optique : nous l'appelons le plan-focus, ou plus simplement le **focus** ;
- $h(x, y, z)$  est la PSF 3D du microscope ;
- la distance d'un plan  $o(x, y, Z)$  ( $z$  fixé) quelconque au plan-focus s'appelle la défocalisation ; elle se note  $\varepsilon = z - z_0$ .

Nous avons expliqué le principe en détails dans le chapitre 2 et nous pouvons le résumer ainsi : chaque partie de l'espace objet éclairé est convoluée par un noyau 3-D correspondant à la PSF du système imageur. L'Eq. 4.4 formalise bien ce que nous venons de dire :

$$I(x, y)|_{z_0} = \int_{\text{espace } z} o(x, y, z) * h(x, y, z - z_0) dz \quad (4.4)$$

Nous pouvons noter que l'intégrale est une intégrale simple, les 2 autres dimensions de l'espace se trouvent dans la convolution, dénotée par le signe  $*$ .

A cause de la profondeur de champ finie d'un système optique réel, chaque partie de l'objet non focalisée est floue. Tout système optique introduit des effets de flou car il a une ouverture finie qui implique une profondeur de champ finie (voir [Pentland 87] [Sheppard 88] [Young 93]). Si on ne considère qu'un seul plan 2D, positionné en  $z_1$  et défocalisé d'une distance  $\varepsilon = z_1 - z_0$ , son image est le résultat de sa convolution par la PSF du système défocalisée  $h$  (Eq. 4.5) :

$$i(x, y)|_{z_1/z_0} = o(x, y, z_1) * h(x, y, z_1 - z_0) \quad (4.5)$$

Si on généralise à tout l'espace, chaque partie de cet objet va contribuer à la formation de l'image. Nous appellerons **imagerie** le résultat, indépendant des autres, de la convolution d'un plan image indicé  $z$  avec la PSF 2D défocalisée correspondante. Dans un espace 3D, l'Eq. 4.5 est l'équation d'une imagerie positionnée en  $z_1$ , relativement à  $z_0$ . L'image finale  $I(x, y)|_{z_0}$  est donc l'addition des imageries, correspondant à chaque plan objet lumineux de l'espace objet éclairé, soit (Eq. 4.6) :

$$I(x, y)|_{z_0} = \int_{\text{espace } z} i(x, y)|_{z/z_0} dz \quad (4.6)$$

Pour obtenir un modèle exploitable en pratique, nous allons éliminer l'intégrale de cette équation en proposant un modèle discret dans la partie 4.4.3. Mais avant tout, nous avons besoin de modéliser la PSF du système, c'est-à-dire le flou.

#### 4.4.2 Le modèle de flou

Nous avons discuté des différents modèles de « flou » dans le chapitre 3. Le modèle de flou le plus commun en vision par ordinateur est le modèle de flou gaussien. Après avoir étudié le modèle presque exact de Stokseth, nous en dériverons un modèle de flou gaussien et nous l'étudierons. Nous allons voir que bien que ces deux modèles soient assez proches « à l'œil », il peut exister au sens des moindres carrés une erreur importante entre eux. Nous verrons pourquoi nous abandonnons le modèle gaussien.

##### 4.4.2.1 Le modèle de Stokseth

Nous allons reprendre les commentaires sur la formulation de l'OTF de Stokseth qui est plus détaillée dans les chapitres 2 et 3. Contrairement à ce que nous avons annoncé jusqu'à présent, nous allons travailler directement avec l'OTF<sup>10</sup>  $H(u, v, \varepsilon)$  et non avec la PSF<sup>11</sup>  $h(x, y, \varepsilon)$ . Ces fonctions sont équivalentes à une transformation de Fourier près, et il est plus aisé d'établir l'équation de l'OTF [Castleman 96] [Stokseth 69] :

$$H(q, \varepsilon) = \left(1 - 1.38 \left(\frac{q}{f_c}\right) + 0.0304 \left(\frac{q}{f_c}\right)^2 + 0.344 \left(\frac{q}{f_c}\right)^3\right) Jinc \left(4k w(\varepsilon) \left(1 - \frac{q}{f_c}\right) \frac{q}{f_c}\right) \quad (4.7)$$

où  $q = \sqrt{x^2 + y^2}$ ,  $Jinc(x) = 2 \frac{J_1(x)}{x}$  avec  $J_1$  le premier ordre de la fonction de Bessel,  $f_c = \frac{2A}{\lambda d_f}$  est la fréquence de coupure et  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ . Stokseth note  $w(\varepsilon) = -d_i - \Delta z(\varepsilon) \cos \alpha + \sqrt{d_i^2 + 2d_i \Delta z(\varepsilon) + (\Delta z(\varepsilon) \cos \alpha)^2}$  où  $\alpha = \arctan\left(\frac{A}{d_i}\right)$  et  $\Delta z(\varepsilon) = d_i - \frac{f(d_f + \varepsilon)}{d_f + \varepsilon - f}$  pour un microscope.

L'avantage de cette formulation est qu'elle simplifie et corrige celle de Hopkins [Hopkins 55]. Elle permet de modéliser l'OTF du système par une fonction ne dépendant que des variables d'espace, et seulement 5 paramètres du système optique. Ce sont :

- le grossissement  $G$  : c'est uniquement le grossissement de l'objectif, pas celui de l'oculaire ;
- la longueur d'onde  $\lambda$  utilisée ;
- la longueur optique du tube  $d_i$  : en microscopie, la distance  $d_i$  est fixée par la *longueur optique* du tube. La *distance mécanique* du tube (distance physique) est généralement de 160mm. Cela nous donne une *longueur optique* comprise entre 190 et 210mm. Cela dépend du fabricant ;

10. *Optical Transfer Function* : Fonction de Transfert Optique en français.

11. *Point Spread Function* : Réponse Impulsionnelle, Transformée de Fourier de l'OTF.

- l'ouverture numérique  $ON$  ;
- l'indice  $n_0$  du milieu entre le spécimen et la première lentille du microscope : si le microscope est à immersion, cet indice est celui de l'huile utilisée pour réaliser l'immersion. Sinon, cet indice est celui de l'air.

Le modèle de Stokseth est le modèle le plus proche de la réalité [[cite]] pour de grandes comme pour de petites défocalisations. Mais il semble complexe (fonction de Bessel) et on rencontre très souvent en vision par ordinateur un modèle de flou gaussien. Nous allons en dériver un du modèle de Stokseth pour vérifier s'il peut effectivement simplifier le modèle.

#### 4.4.2.2 Le modèle gaussien

Nous avons développé un modèle de flou gaussien pour le confronter au modèle de Stokseth et vérifier s'il peut le remplacer dans une bonne approximation. La plupart des travaux en vision par ordinateur [Nayar 94] [Tomczak 98] (voir le chapitre 3) qui traitent du flou utilisent un flou gaussien basé sur les travaux de Pentland [Pentland 87]. Afin de rester proche des travaux effectués en vision par ordinateur, il peut être intéressant de travailler avec un modèle gaussien.

Nous avons présenté [Dey 01] un modèle d'OTF qui dérive du modèle de Stokseth (Eq. 4.7) ; nous allons approximer la fonction de Bessel par une gaussienne. On peut trouver des généralités intéressantes sur les fonctions de Bessel dans [Num.Rec. 93, Ch.6]. 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 l'Eq. 4.8 :

$$J_n(x) = \sum_{m=0}^{\infty} \frac{(-1)^m \left(\frac{x}{2}\right)^{n+2m}}{m!(m+n)!} \quad (4.8)$$

Pour un  $J_{inc}(x) = 2 \frac{J_1(x)}{x}$ , cela donne  $J_{inc}(x) = 1 - \frac{x^2}{8} + \frac{x^4}{192} - \frac{x^6}{9216} + \dots$ . L'expression générale du développement en séries de Taylor pour une gaussienne  $G(x) = e^{-\alpha^2 x^2}$  est donnée par l'Eq. 4.9 :

$$G(x) = \sum_{m=0}^{\infty} \frac{(-1)^m (\alpha x)^{2m}}{m!} \quad (4.9)$$

ce qui donne  $G(x) = 1 - \frac{x^2}{8} + \frac{x^4}{64} - \frac{x^6}{512} + \dots$  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  $e^{-\frac{x^2}{8}}$  ce qui transforme l'Eq. 4.7 en :

$$H(q, \varepsilon) = \left(1 - 1.38 \left(\frac{q}{f_c}\right) + 0.0304 \left(\frac{q}{f_c}\right)^2 + 0.344 \left(\frac{q}{f_c}\right)^3\right) e^{\frac{(4k w(\varepsilon) \left(1 - \frac{q}{f_c}\right) \frac{q}{f_c})^2}{8}} \quad (4.10)$$

Sur la Fig. 4.16, nous avons représenté l'OTF de Stokseth et son approximation gaussienne pour 2 valeurs de défocalisation. Nous avons fait tous ces développements pour  $x \ll 1$ ,

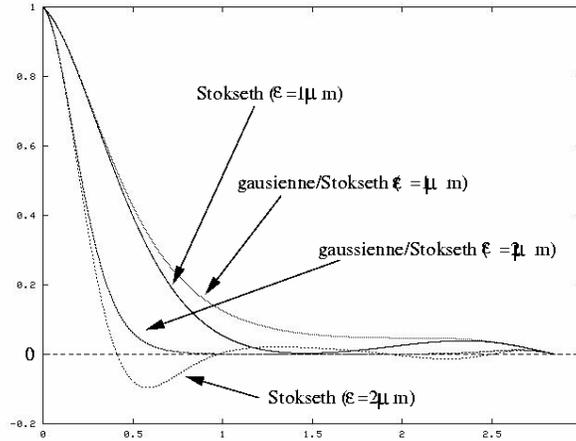


FIG. 4.16 – Coupes à 1D des 2 types d'OTF : l'OTF de Stokseth et son approximation par une gaussienne. Il y a 2 paires de courbes : les 2 courbes supérieures sont défocalisées de  $1 \mu\text{m}$  et les courbes du bas de  $2 \mu\text{m}$ .

mais sachant que ces fonctions décroissent toutes les deux vers 0, l'erreur pour les grandes valeurs de  $x$  n'est pas divergente.

Nous pouvons étudier l'erreur entre le modèle de Stokseth et le modèle gaussien en fonction de la défocalisation. Cette erreur est une erreur **cumulée** au sens des moindres carrés. Nous avons tracé cette erreur en fonction de la défocalisation sur la Fig. 4.17 (a). Elle est maximale à  $\pm 1.6 \mu\text{m}$ . Il ne faut pas oublier qu'une grande partie de l'erreur provient du fait que le modèle gaussien est positif, tandis que le modèle de Stokseth peut devenir négatif. Le modèle gaussien annule donc l'effet d'inversion de contraste (OTF négative) dont on a parlé dans le chapitre 2. De plus, une différence entre 2 OTF induit une différence dans l'énergie qui va pouvoir passer. Sur la Fig. 4.17 (b) nous voyons que l'approximation gaussienne peut laisser passer plus d'énergie que l'OTF de Stokseth, et il faut investiguer plus en avant.

L'OTF d'un système est en quelque sorte un filtre qui laisse ou non passer de l'énergie. L'énergie qui passe est proportionnelle à la surface située sous cette courbe (voir Fig. 4.18 (a)). Entre deux courbes, on peut considérer qu'il y a plus d'énergie qui passe si la surface d'intégration est supérieure et vice-versa. Sur la Fig. 4.18, nous avons représenté en pourcentages la variation relative de surface du modèle d'OTF de Stokseth par rapport à son approximation par une gaussienne. Ces calculs sont effectués pour des intervalles de défocalisation de  $[-30; 30] \mu\text{m}$  (Fig. 4.18 (b)) et sur la portion la plus proche de la profondeur de champ, dans l'intervalle  $[-5; 5] \mu\text{m}$  (Fig. 4.18 (c)). Nous voyons des variations relatives de  $\pm 20\%$  ce qui est très important.

De plus, un calcul de vitesse d'algorithme sur un PC Linux équipé d'un processeur Pentium III cadencé à 850 MHz et de 128 Mo de mémoire vive donne une moyenne

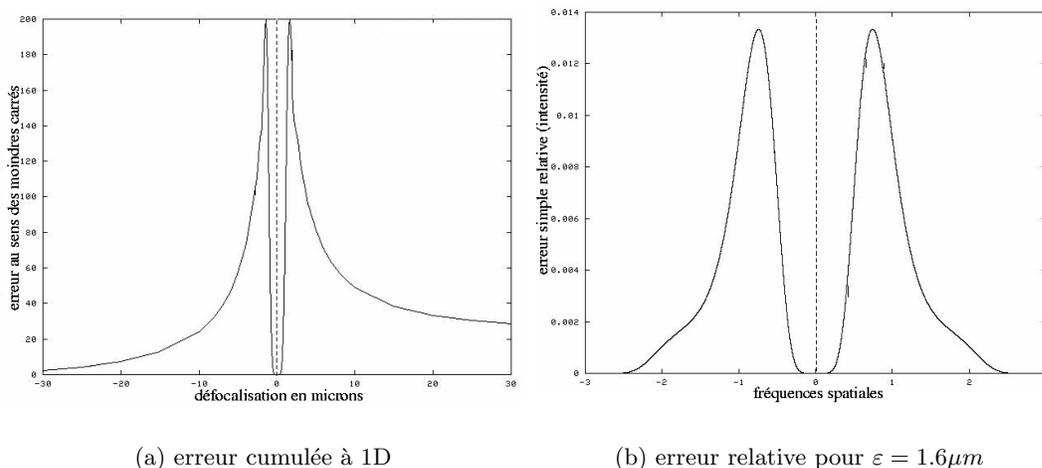


FIG. 4.17 – *Différence entre le modèle de Stokseth et le modèle à base de gaussienne. (a) Nous avons tracé la courbe de l'erreur **cumulée** (au sens des moindres carrés) en fonction de la défocalisation. Les calculs ont été fait à 1D sur toute la zone de variation des modèles d'OTF (pour une fréquence absolue inférieure à la fréquence de coupure) en prenant un échantillonnage fin de  $10^4$  points par micron. Le grand nombre de points explique que les valeurs culminantes des erreurs soient également très fortes (199.5 au maximum). Si on divise par 10 le nombre de points, cela revient aussi à diviser par 10 cette valeur maximale. (b) Etude plus détaillée de la différence relative entre l'OTF de Sokseth et son approximation gaussienne pour un des pic de l'erreur cumulée (on a choisi  $\varepsilon = 1.6 \mu\text{m}$ ). Sur cette sous-figure, nous voyons donc que les valeurs prises par la gaussienne sont supérieures à celle de l'OTF de Stokseth.*

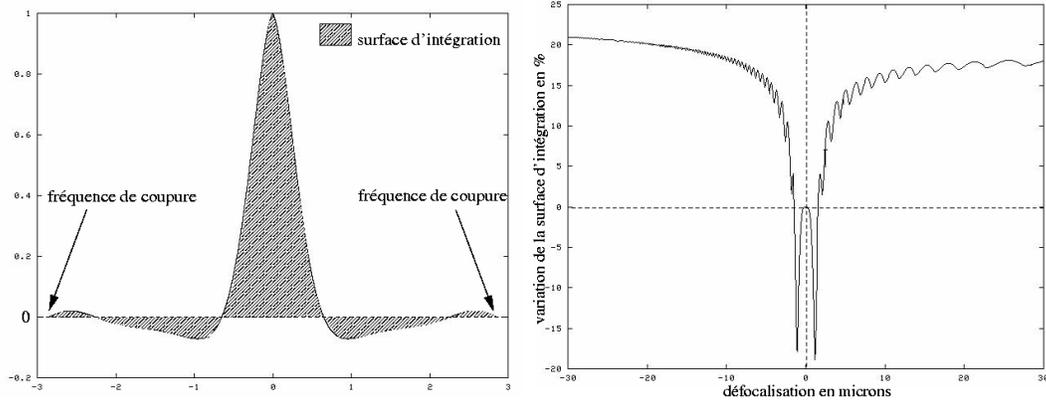
de 6.89s pour le modèle de Stokseth et de 6.31s pour son approximation gaussienne (100000 points par pixel, défocalisation de  $3 \mu\text{m}$ ). Le gain en vitesse est intéressant mais pas révolutionnaire, puisqu'il se situe aux alentours de 10%.

En conclusion, toutes ces raisons font que nous ne nous intéressons pas à un modèle d'OTF gaussien et que nous conservons celui de Stokseth.

5), en utilisant le flou gaussien, la simulation est satisfaisante. Le problème inverse visant à enlever le flou présent dans une séquence d'images réelles est alors réalisable en utilisant les méthodes de déconvolution gaussiennes comme celle de Haar [t. Haar Romeny 94] (voir chapitre 3 pour plus de détails bibliographiques).

#### 4.4.3 Le modèle proposé

Revenons à un espace objet éclairé discret, comme il se doit d'exister dans le présent modèle. Pour simuler la formation d'une image 2D à partir de l'espace objet éclairé, nous proposons un modèle discret inspiré de l'Eq. 4.4. En effet, l'espace objet éclairé est un espace discret selon ses 3 dimensions. En remplaçant la somme continue par une somme



(a) surface d'intégration de l'énergie transmise

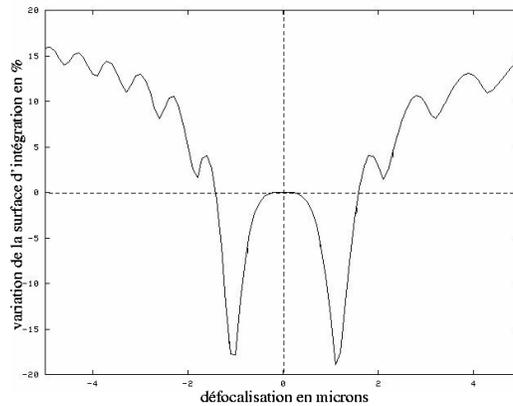
(b) défocalisations entre  $-30$  et  $30\mu\text{m}$ (c) défocalisations entre  $-5$  et  $5\mu\text{m}$ 

FIG. 4.18 – Nous fixons la défocalisation à  $1.6\mu\text{m}$ . (a) Cette figure représente la surface que l'on intègre : les zones situées en-dessous et au-dessus sont comptées positivement. (b) Représente la différence de surface entre le modèle d'OTF de Stokseth et son approximation gaussienne en fonction de la défocalisation. Cette différence est rapportée à la surface initiale de l'OTF de Stokseth pour avoir des valeurs relatives. (c) Même courbe que précédemment en insistant sur des petites valeurs de la défocalisation. Noter que l'échelle verticale dans les cas (b) et (c) s'étend entre  $-20$  et  $+20\%$ .

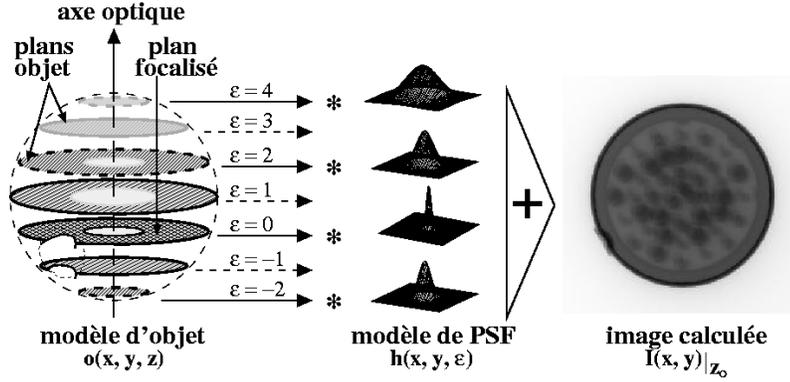


FIG. 4.19 – Nous avons représenté le schéma de principe du montage, dans le cas d'un objet modélisé un peu plus complexe (à gauche, représenté sous la forme de plans objet). Pour calculer une image, on applique notre modèle de flou 3-D à chaque plan-objet, le focus définissant la valeur  $\varepsilon = 0$ . Alors, chaque plan objet est convolué avec le masque 2D de la PSF qui lui est propre (au centre), pour former une imagerie. La PSF  $h$  est une fonction 3-D qui dépend de la défocalisation  $\varepsilon$  comme nous l'avons vu plus tôt : rappelons que cette PSF est en fait la TF du modèle d'OTF de Stokseth (voir la partie 4.4.2). Plus  $\varepsilon$  est grand et plus le flou est important. Nous n'avons pas représenté ici le modèle de flou pour tout  $\varepsilon$ . L'addition « pixel à pixel » de toutes ces imageries nous donne l'image calculée (à droite).

discrète, nous obtenons l'Eq. 4.11 :

$$I(x, y)|_{z_0} = \sum_{z_n \in \text{espace objet}} o(x, y, z_n) * h(x, y, \varepsilon) \quad (4.11)$$

où la convolution est, elle aussi, discrète. Les dimensions  $X$  et  $Y$  sont discrètes, et la convolution se définit comme  $\sum_x \sum_y o(x, y, z).h(x - x_0, y - y_0, z - z_0)$  pour des variables  $x$  et  $y$  appartenant à l'espace objet.

Comme nous l'avons fait dans la partie 4.4.1, nous pouvons redéfinir les notations dans le cas de l'espace discret. 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. 4.19) :

- un **plan-objet** est le plan  $o(x, y, z_n)$  de l'espace objet éclairé avec  $z_n$  constant ;
- si  $z_0$  est le plan-objet focalisé, on appellera **focus** le plan  $o(x, y, z_0)$  ;
- n'importe quel autre plan  $z_n$  est défocalisé de  $\varepsilon = z_n - z_0$  ;
- une **imagerie**  $i_n(x, y)$  est l'image floue d'un plan-objet ;
- finalement, l'**image calculée** est la somme de toutes les imageries à un focus  $z_0$ .

Nous proposons donc comme modèle l'algorithme de l'Eq. 4.11. Il est représenté à la Fig. 4.19. Pour calculer une image, nous choisissons d'abord un focus dans l'espace objet défini pour fixer la valeur  $\varepsilon = 0$ . Ensuite, chaque plan-objet, défocalisé de  $\varepsilon$ , est convolué avec

le masque 2D tiré de la PSF 3D : pour un  $\varepsilon$  fixé, nous obtenons le masque  $h(x, y, \varepsilon)$ . Nous obtenons une imagerie par plan objet. L'addition de toutes ces imageries nous permet d'obtenir l'image calculée finale. Dans le cas d'un objet épais, nous pouvons calculer une série d'images et ainsi avoir l'impression d'un espace image 3D (voir la partie 4.4.3.1).

#### 4.4.3.1 L'espace image 3D

Comme nous l'avons dit dans la partie 4.1.1.3, nous allons souvent travailler dans un espace image 3D, alors que jusqu'ici, nous avons toujours insisté sur le fait que l'espace image est 2D. L'espace image tel que nous l'utiliserons pour illustrer des coupes latérales dans le chapitre 5 sera 3D : ce sera l'empilement numérique et ordonné de plusieurs images calculées pour des focus différents. Cependant, afin d'obtenir un espace cohérent, le focus entre chaque image sera incrémenté par une valeur **constante** pour la séquence.

Dès que l'espace objet est discrétisé, nous devons imposer une correspondance entre distances physiques (en  $\mu m$  en général) et les pixels. Pour simuler des images précises, la façon la plus judicieuse de procéder est de choisir la même échelle pour les 3 dimensions  $x$ ,  $y$  et  $z$ . Mais ensuite, nous ne voudrions pas nécessairement calculer une image par plan objet : nous pouvons faire varier le focus par des pas supérieurs à la discrétisation (en  $z$ ) de l'espace objet. Le passage à l'espace image 3D est en quelque sorte un rééchantillonnage de l'espace objet éclairé.

#### 4.4.4 Détails sur l'implémentation

Dans cette partie, nous allons voir plus en détails l'implémentation de cette partie du modèle. Nous allons parler du grossissement, de l'algorithme de convolution, des masques de convolution et de comment les effets de bord sont traités.

##### 4.4.4.1 Le grossissement

Le grossissement est une propriété intrinsèque aux objectifs, surtout lorsqu'il s'agit d'objectifs de microscope. Nous avons modélisé le grossissement comme étant une dilatation<sup>12</sup> de l'espace objet éclairé ; cette dilatation dépend de l'objectif utilisé, et les valeurs numériques utilisées sont calculées dans la partie 5.1.3. Nous pouvons les voir dans les fichiers de configuration de l'annexe B.

Le grossissement dépend bien évidemment du type d'objectif, mais dans les calculs que nous effectuons, il intervient durant la phase d'interaction de la lumière avec le spécimen. C'est par commodité de calcul, mais il serait nécessaire de le changer pour le côté « rigoureux » du problème ; ce n'est pas judicieux de séparer ainsi le grossissement de cette dernière étape qui est la simulation du système optique.

---

12. Plus exactement, puisqu'il s'agit de calculs numériques, il s'agirait plutôt d'une rétraction, pour conserver un maximum de détails pour simuler de fort grossissements.

Nous allons parler de grossissement en terme de « voir un objet plus ou moins gros » et non en terme de paramètre qui intervient dans la formule de l'OTF. En résumé, au lieu de générer un espace objet éclairé ayant comme échelle le micron<sup>13</sup> et de produire une image à l'aide d'un modèle prenant compte du grossissement, nous générons un espace objet éclairé qui tient en compte du grossissement<sup>14</sup> et nous produisons une image sans tenir compte du grossissement. Mais à part être un problème conceptuel, cela en revient au même finalement.

#### 4.4.4.2 Le calcul des masques de convolution

Un autre avantage de l'espace de Fourier est que nous pouvons fixer la taille du support du masque de convolution : il y existe une fréquence de coupure qui dépend de la taille de la pupille d'entrée de l'instrument. Nous pouvons donc fixer une taille en pixel pour tous les masques de l'OTF. De fait, nous pouvons aussi fixer la taille pour les TFs<sup>15</sup> des plans objet et ce, toujours à cause de la fréquence de coupure : nous savons quelles sont les plus grandes fréquences spatiales qui vont contribuer<sup>16</sup>. Nous avons représenté sur la Fig. 4.20 plusieurs coupes de la fonction 4.7  $H(q, \varepsilon)$  de l'Eq. 4.7 pour des valeurs différentes de  $\varepsilon$ . Les autres paramètres sont fixés, et leur valeurs sont rappelées dans la légende de la figure.

#### 4.4.4.3 La convolution

Pour une seule image, il y a un grand nombre de convolutions à exécuter, et pour des images avec des tailles de l'ordre de plusieurs centaines de pixels. Les masques de convolution sont eux aussi de grande taille (environ 256x256 pixels). Nous avons donc opté pour une convolution qui s'exécute dans l'espace dual des fréquences : l'espace de Fourier. Nous l'avons décrit dans le chapitre 2 ainsi que les opérations les plus courantes. En effet la convolution directe est en général beaucoup plus lente qu'une double TF, une TF inverse et une multiplication d'image. De plus, nous travaillons avec l'OTF, qui appartient à l'espace des fréquences, ce qui réduit les opérations à une TF, une TF inverse et une multiplication d'image. La Fig. 4.21 illustre ce que nous venons de dire.

La TF discrète que nous avons implémentée est tirée de la FFT présentée dans le livre [Num.Rec. 93, Ch.12]<sup>17</sup>. Nous rappelons que les expressions continues à deux dimensions de la TF sont données dans le chapitre 2. Considérons une image  $N_1 \times N_2$ . On appelle  $n_1$  et  $n_2$  les indices directs,  $k_1$  et  $k_2$  les indices de Fourier. En s'inspirant de [Num.Rec. 93,

13. Bien-sûr, ce serait un espace numérique de toute façon, pour des raisons de stockage de résultats ; mais l'échelle entre pixels et microns pourrait alors être **fixe**.

14. Alors que le grossissement devrait intervenir uniquement dans le modèle de système optique.

15. Transformée de Fourier ; voir le chapitre 2.

16. Dans le plan direct, le problème de fixer une correspondance entre nombre de pixels et taille physique en micromètres est accru : la PSF n'est plus à support bornée puisque sa TF l'est [Goodman 68], et on ne sait donc pas quelle taille va devoir avoir une coupe  $XY$  de l'espace objet éclairé.

17. Site officiel : <http://www.nr.com>

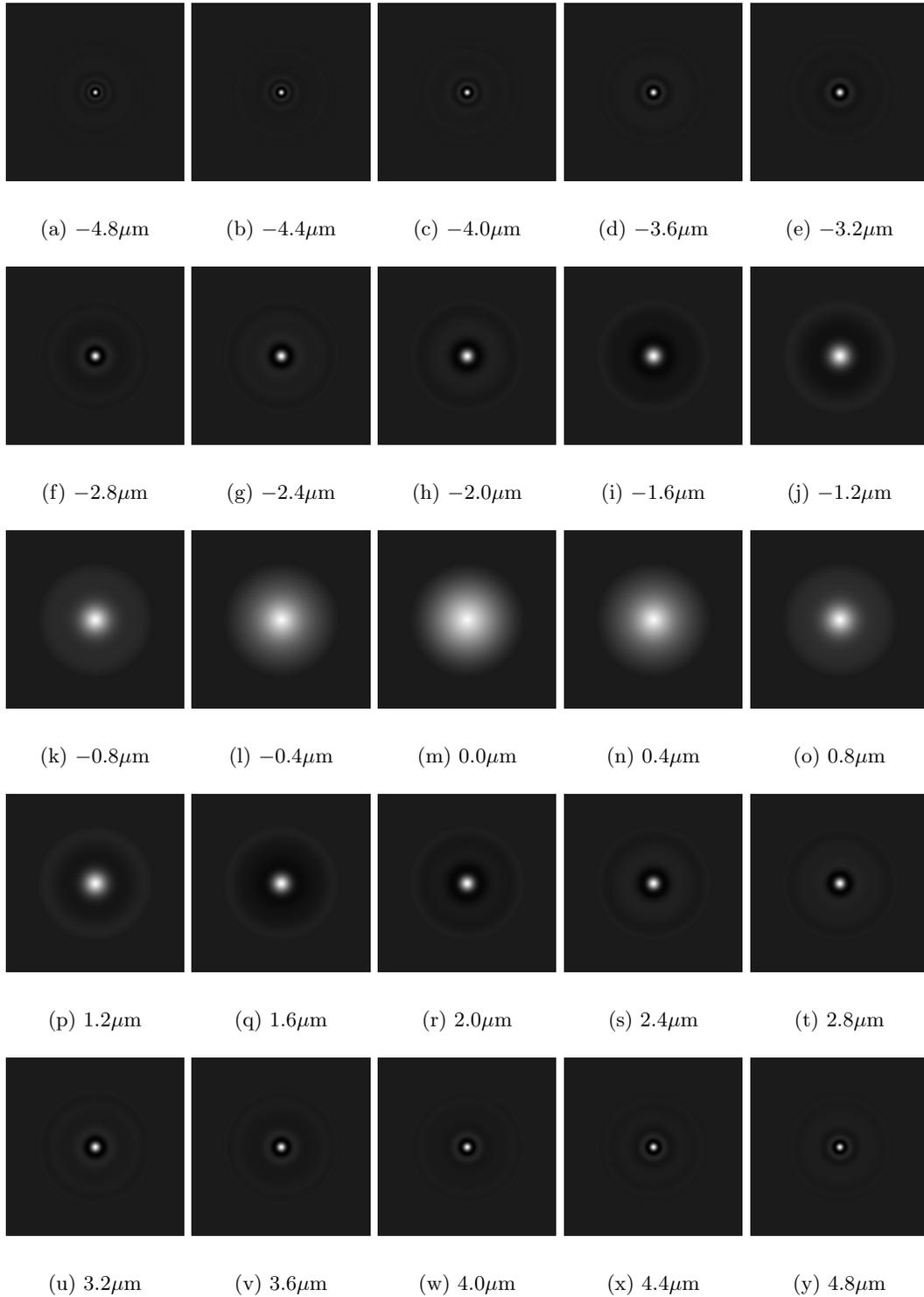


FIG. 4.20 – Quelques masques du modèle d'OTF de Stokseth pour des défocalisations  $\varepsilon$  allant de  $-4.8\mu\text{m}$  à  $4.8\mu\text{m}$ ; entre 2 images successives, il y a ici  $0.4\mu\text{m}$ . Les paramètres physiques du microscope sont fixés aux valeurs suivantes:  $G = 60X$ ,  $d_i = 200\text{mm}$ ,  $n_0 = 1.0$ ,  $ON = 0.8$ ,  $\lambda = 0.55\mu\text{m}$ .

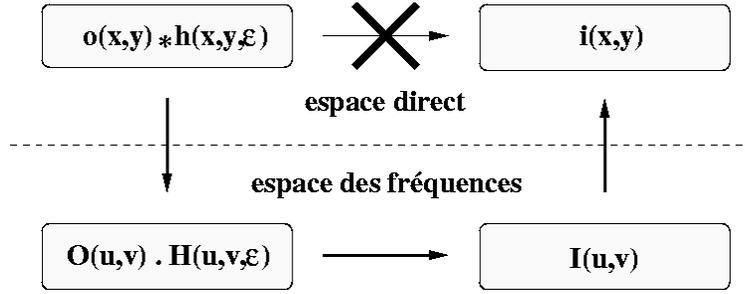


FIG. 4.21 – Dans l’algorithme proposé pour modéliser la dernière étape de la formation de l’image, il y a de nombreuses convolutions à calculer (voir la partie 4.4.3). Comme nous avons défini l’OTF dans l’espace des fréquences et aussi afin d’accélérer les calculs, nous allons effectuer les calculs dans l’espace des fréquences ; nous prenons la TF de chaque plan objet, le multiplions par l’OTF correspondante, puis prenons la TF inverse du résultat. Les TF et TF inverses sont effectuées en utilisant l’algorithme FFT.

Ch.12] mais en gardant une certaine symétrie dans les notations (*i.e.* que le facteur de normalisation en  $1/\sqrt{N_1 N_2}$  est présent dans les 2 définitions, plutôt qu’un facteur  $\frac{1}{N_1 N_2}$  dans une seule des 2 définitions), nous avons (Eq. 4.12 et 4.13) :

$$\hat{f}(n_1, n_2) = \frac{1}{\sqrt{N_1 N_2}} \sum_{k_1=0}^{N_1-1} \sum_{k_2=0}^{N_2-1} f(k_1, k_2) \cdot e^{-2i\pi k_1 \frac{n_1}{N_1}} \cdot e^{-2i\pi k_2 \frac{n_2}{N_2}} \quad (4.12)$$

$$f(k_1, k_2) = \frac{1}{\sqrt{N_1 N_2}} \sum_{n_1=0}^{N_1-1} \sum_{n_2=0}^{N_2-1} \hat{f}(n_1, n_2) \cdot e^{2i\pi k_1 \frac{n_1}{N_1}} \cdot e^{2i\pi k_2 \frac{n_2}{N_2}} \quad (4.13)$$

pour respectivement la TF directe et la TF inverse.

Cette notation permet d’avoir une conservation de l’énergie à chaque transformation de Fourier (dans le sens direct ou inverse). L’Eq. 4.14 donne le théorème de Parseval pour les notations discrètes (voir le chapitre 2) :

$$\sum_{n_1=0}^{N_1-1} \sum_{n_2=0}^{N_2-1} |f(n_1, n_2)|^2 = \frac{1}{N_1 N_2} \sum_{k_1=0}^{N_1-1} \sum_{k_2=0}^{N_2-1} |\hat{f}(k_1, k_2)|^2 \quad (4.14)$$

Une petite précision quant à l’implémentation : afin de faire des calculs cohérents, lors de la phase d’implémentation nous avons fait attention à bien faire correspondre la TF de l’espace direct et l’espace de Fourier dans lequel est définis l’OTF. En effet, les échelles ne sont pas nécessairement les mêmes ; le résultat de l’opération de convolution via l’espace des fréquences serait faux.

#### 4.4.4.4 Les imagettes particulières

Il existe un certain nombre de cas particuliers qui peuvent être traités à part pour accélérer les calculs. Nous avons vu dans le chapitre 2 que la convolution d’un plan uniforme

par une autre fonction donne aussi une répartition uniforme (Eq. 4.15) :

$$(f * g)(x, y) = f(x, y) * g(x, y) = C^{ste} \text{ si } f \text{ ou } g \text{ constant} \quad (4.15)$$

Il est possible de définir un seuil  $s$  de variation d'intensité en-dessous duquel un plan objet sera considéré comme uniforme. C'est un simple algorithme qui calcule la différence  $\Delta$  entre les valeurs des intensités minimum et maximum d'un plan image, Si  $\Delta \leq s$ , alors le plan objet sera considéré comme uniforme, et traité comme ayant une valeur moyenne d'intensité égale à  $\frac{\Delta}{2}$ . Or l'imagerie correspondant à un plan uniforme est elle aussi **uniforme** ; si elle est non nulle, elle contribue de manière énergétique à l'image finale sans introduire de variation. Il est donc possible d'ajouter une valeur globale à l'énergie totale sans effectuer de calcul de convolution.

C'est la même chose dans le cas où la défocalisation est très importante. Nous avons vu dans la partie 4.4.4.2 qu'au-delà d'une certaine défocalisation, l'OTF ressemble à une petite gaussienne centrée, d'écart-type  $\sigma \ll 1$ . Cela signifie qu'à partir d'une certaine valeur de la défocalisation  $\varepsilon$ , il n'y a plus aucune haute fréquence qui est transmise. L'imagerie obtenue en résultat est alors **uniformément nulle**. Dans l'espace direct, cette fonction correspond, par transformée de Fourier inverse, à une PSF gaussienne avec un écart-type  $\frac{1}{\sigma} \gg 1$ , donc un masque de convolution très aplati et à large support dans l'espace direct.

Une fois ces optimisations intégrées au code, nous avons pu vérifier que les résultats sont identiques, mais les calculs sont de l'ordre de 30 fois plus rapides. Au final, nous nous apercevons que l'OTF est non négligeable dans l'intervalle de défocalisation (majoré pour limiter les erreurs)  $[-7 \mu\text{m}, +9 \mu\text{m}]$ .

#### 4.4.4.5 Effets de bord

Nous n'avons pas un espace objet infini selon la direction  $z$ . Lorsque l'on veut former une image correspondant à un focus placé sur les plans objet extrêmes, il faut tout de même tenir compte d'un certain nombre de plans objet. Mais certains n'existent pas, car ils n'ont pas été définis. Il existe 2 manières de traiter ce problème :

- la première consiste à restreindre le focus à une certaine zone, dans laquelle toutes les imageries pourront être définies (Fig. 4.22 (a)) ;
- la seconde va être de créer un espace objet peut être plus grand en  $z$ , mais surtout suffisamment étendu pour que les coupes sur les extrémités ne varient plus trop de l'une à l'autre ; dans ces conditions, en supposant que l'on simule une focalisation sur la coupe la plus extrême, nous nous servons de coupes « fantômes ». Celles-ci sont les copies conformes de la coupe extrême (Fig. 4.22 (b)).

Dans le premier cas, il n'y a pas d'erreur introduite car on va se restreindre à une zone où tous les plans objet seront définis. Dans le second cas, il y aura une petite erreur introduite

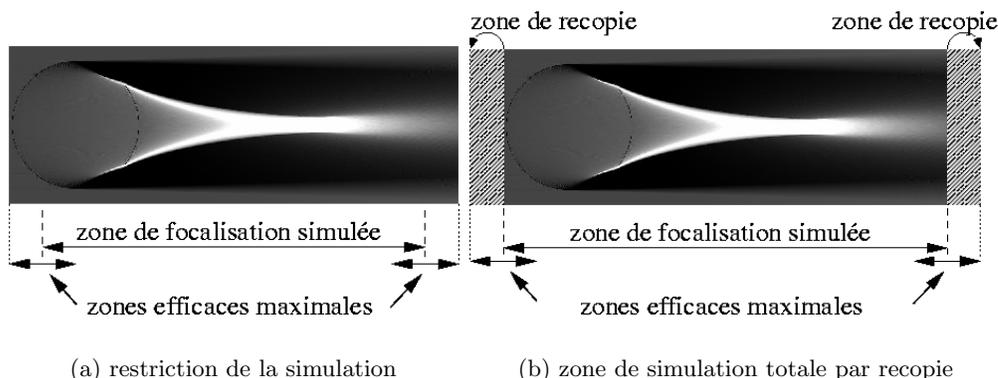


FIG. 4.22 – *Traitement des effets de bord pour le calcul de l'espace image 3D à partir de l'espace objet 3D. Nous avons représenté une coupe XZ de l'espace objet éclairé sur chacune des 2 figures. Ce que nous appelons « zone efficace maximale » correspond à la zone de l'espace objet éclairé qui va servir à la simulation de la formation de l'image. (a) Une façon d'éviter les effets de bord est de faire en sorte que l'on n'ait jamais à traiter un plan objet situé en dehors (en  $z$ ) de l'espace objet éclairé. Dans ce cas, l'espace image aura une dimension en  $z$  plus petite que l'espace objet éclairé. (b) La méthode que nous utilisons est la suivante: en prenant un espace objet éclairé suffisamment grand, les plan extrêmes (premier et dernier) sont quasiment homogènes, car situés loin de la perturbation. Dès que la simulation requière un plan objet situé en-dehors de l'espace objet, nous choisissons à sa place une recopie du plan extrême le plus proche. Dans ce cas, espace image et espace objet éclairé ont la même taille en  $z$ .*

du fait de la recopie de certaines zones, mais si l'espace objet initial s'étend suffisamment loin pour que les plans objet soient uniformes, on pourra considérer cette erreur comme négligeable.

#### 4.4.5 La visualisation et la saturation du capteur

Comme nous l'avons déjà dit, le résultat du calcul complet de la formation de l'image est stocké sous la forme d'un tableau de nombres réels. Ces nombres correspondent à une intensité lumineuse, et c'est à partir de la quantification de ces valeurs que nous aurons une image.

Dans la réalité, c'est le capteur CCD situé en bout de chaîne optique qui va jouer ce rôle de générateur d'image numérique. Or, un capteur CCD peut être saturé par une intensité lumineuse, si elle est trop forte. Dans le cas d'objets translucides comme une microbille de verre (voir Fig. 5.11 parexemple), l'intensité près du point focal est tellement intense que le capteur est presque toujours saturé. Nous avons opté pour 3 méthodes possibles de

visualisations pour simuler cette saturation du capteur :

- utilisation du format d’image HDRI<sup>18</sup> : c’est un format d’image qui permet de stocker « toute » la dynamique de l’image, en la stockant sous forme de nombre réels. La quantification est variable et dépendra du programme de visualisation : on peut voir les détails d’une très forte intensité comme ceux d’une très faible intensité. L’équivalent physique pour un image réelle est de baisser ou d’augmenter l’intensité lumineuse de la source du microscope ;
- simulation de la saturation par troncature : nous allons fixer un seuil d’intensité  $s$  dans l’image calculée. Au-delà de ce seuil, les valeurs d’intensité sont tronquées et ramenées à  $s$ . C’est un peu équivalent au point précédant, sans avoir de programme dédié ;
- quantification relative pour une séquence d’images calculées : dans ce cas, nous allons quantifier le tableau de réels relativement aux autres images de la séquence. Cela a toujours une signification physique, puisque c’est l’équivalent de la détermination du meilleur éclairage pour un spécimen ; cette détermination peut être différente d’un spécimen à l’autre.

Nous utilisons essentiellement la dernière méthode pour traiter des séquences d’images, bien que les 2 autres soient pratique pour traiter une image isolée. Il faut remarquer que pour des images calculées, il s’agit d’un post-traitement : l’image existe déjà, et elle est un peu modifiée. Bien qu’il semble que pour un montage réel ce traitement soit en amont (on règle l’intensité lumineuse pour que l’image soit acceptable), c’est bien le capteur qui intervient à la fin qui produit cet effet : l’image réelle existe déjà, et c’est le capteur sensé la rendre visible qui introduit cet effet.

#### 4.4.6 Conclusion

Dans cette partie, nous avons présenté la dernière étape de notre modèle : l’étape d’interaction entre l’espace objet éclairé et le modèle de système optique. Cette dernière étape est une projection d’un espace 3D (espace objet éclairé) vers un espace 2D (espace image). Une image (qui correspond à une focalisation donnée) contient à travers le flou généré par cette projection, des informations 3D. Nous pouvons aussi générer un espace image « 3D » en stockant dans l’ordre chaque image correspondant à une focalisation donnée. Cela revient à une sorte de filtrage spécial de l’espace objet éclairé.

Nous avons vu dans le chapitre 3 qu’il est possible dans certaines conditions de remonter à cette information 3D, grâce à une séquence d’images et la connaissance de l’OTF du système optique. Malheureusement, dans le cas d’un objet translucide, les phénomènes de

---

18. *High Dynamic Range Image* : image possédant une grande dynamique de niveaux de quantification.

réfraction rendent quasi impossible ce genre de traitement car ils perturbent énormément la structure de l'objet lui-même. Nous en parlons dans la partie 4.3.

## 4.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté un modèle global de la formation de l'image qui est notre principale contribution au problème présenté en introduction (chapitre 1). Tout d'abord, nous avons introduit des notions importantes comme les espaces de travail : l'espace objet physique, où le spécimen de synthèse est décrit ; l'espace objet éclairé, dans lequel nous calculons les interactions entre l'objet physique et la lumière, grâce à un modèle de lancer de rayons ; et enfin, l'espace image où nous décrivons le résultat des interaction entre l'espace précédant et le modèle de système optique. Le modèle de système optique est décrit par une fonction 3D importante : l'OTF, que nous avons aussi appelée fonction de flou. C'est en effet par elle que le système optique « s'exprime ». Nous avons voulu la simplifier par un modèle gaussien ; ce dernier donne de bon résultats visuels (voir le chapitre 5), mais nous avons démontré qu'il était peu précis pour nos calculs. Nous nous sommes aussi attachés à démontrer que ce qui perturberait grandement une éventuelle volonté de reconstruction n'est pas tant le flou en lui-même, que la réfraction qui intervient dans le cas d'un spécimen translucide. Nous avons aussi présenté le maximum de détails sur l'implémentation qui a été réalisée, quand cela était possible. C'est ce modèle que nous allons valider dans le chapitre 5 par des calculs de séquences d'images. Nous les validerons par rapport à des images réelles.

# Chapitre 5

## Résultats

Nous abordons ici le chapitre le plus important de ce manuscrit, car il concerne les résultats du modèle décrit dans le chapitre 4. Une partie de ces résultats est présentée dans les articles de Dey *et al.* [Dey 01] [Dey 02a] [Dey 02b]. La première partie (partie 5.1) présente le matériel d’acquisition des images, et décrit la préparation des spécimens, et dans la partie 5.2, nous effectuons des normalisations sur l’éclairage. La présentation des résultats commence dès la partie 5.3 dans laquelle nous appliquons notre modèle à un objet 2D ; ensuite, c’est à un objet 3D, mais opaque que nous nous intéressons (partie 5.4), avant de tester des cas plus complexes d’objets 3D translucides (partie 5.5). La partie 5.6 concerne un objet encore plus prospectif, car beaucoup plus complexe et beaucoup moins connu physiquement : un grain de pollen. Nous concluons ce chapitre avec la partie 5.7.

### 5.1 Matériel et méthodes

Dans cette partie, nous décrivons tout l’appareillage que nous avons utilisé pour l’acquisition d’images. Nous donnons aussi la marche à suivre pour préparer les échantillons qui ont été observés avec le microscope (partie 5.1.1). Nous avons travaillé avec des grains de pollen, des microbilles et d’autres objets microscopiques comme des diaphragmes (2D) ou bien des billes opaques (3D). Dans la partie 5.1.2, nous présentons le matériel optique utilisé : le microscope, la caméra CCD et la table à déplacements micrométriques. Nous établissons ensuite (partie 5.1.3) une échelle de correspondance entre le monde réel et les images numérisées, en fonction du grossissement. Nous invitons le lecteur intéressé à se reporter à l’annexe A pour en savoir plus sur les grains de pollens. Précisons que le L.A.S.M.E.A.<sup>1</sup> de Clermont Ferrand a prêté le microscope et le système d’acquisition des images, et a fourni tout ce qui se rapporte aux grains de pollen. Le LTE<sup>2</sup> de l’université de

---

1. Laboratoire des Sciences et Matériaux pour l’ Electronique et l’Automatique ; URL : <http://www.lasmea.univ-bpclermont.fr/>

2. Laboratoire de Thermodynamique Expérimentale, dirigé par M. J.-D. Sylvain.

Nice - Sophia Antipolis a gracieusement fourni tous les autres types d'objets (diaphragme, microbilles de verre, *etc.*).

### 5.1.1 Préparation des lames microscopiques

Dans cette partie, nous décrivons la préparation des lames microscopiques ou des spécimens que nous allons étudier. Nous présentons d'abord la préparation d'une lame de pollen, telle qu'elle a été réalisée (récolte, préparation). Ensuite, nous parlons de la préparation des autres spécimens que nous avons observé (billes de verres microscopiques, objets fins).

#### 5.1.1.1 Préparation des grains de pollens

La préparation des lames contenant des pollen se fait selon la méthode utilisée par les palynologues<sup>3</sup> de Cordoue<sup>4</sup> (Espagne). Dans le cadre du projet européen A.S.T.H.M.A.<sup>5</sup> [ASTHMA 98] dans lequel s'inscrivaient nos travaux, la préparation a été normalisée au niveau de la préparation du colorant utilisé.

Un pollen est la cellule reproductrice mâle qui sert à la reproduction des végétaux. Les grains de pollen sont produits par les fleurs et pour assurer la reproduction de la plante, il doit être dispersés. Il y a plusieurs types de dispersion possibles [Reille 90] (par les insectes, par l'eau ou par le vent), et seule la dispersion par le vent va nous intéresser. Pour plus de détails sur les grains de pollen, voir l'annexe A. Précisons tout de même qu'un grain de pollen est un objet 3D.

**5.1.1.1.1 Récolte** Comme nous l'avons dit, nous nous sommes intéressés aux pollens qui ont un potentiel allergéniques, c'est-à-dire ceux qui sont dispersés dans l'air. Un peu partout en France (Fig. 5.1 (a)) et en Europe, les scientifiques ont disposé des capteurs polliniques (Fig. 5.1 (b)) qui sont en fait des buses d'aspiration qui aspirent l'air ambiant. Un scotch collant disposé sur un tambour qui tourne en fonction du te récupère les particules présentes dans l'air. Ce filtre est relevé de te en te par les palynologues avant d'être préparé pour être observé avec un microscope optique.

Cette méthode de récolte possède l'inconvénient de ne pas récupérer que les pollens, mais aussi les poussières et les moisissures présentes dans l'air [Tomczak 99a]. Une autre méthode de récolte qui permet de n'avoir presque que des grains de pollen consiste à secouer des fleurs directement au-dessus d'une lame.

---

3. Le palynologue est un spécialiste des pollens, capable de reconnaître un très grand nombre de variétés différentes.

4. Leur sit Web est disponible à l'adresse : <http://www.uco.es/rea/>

5. *Advanced System of Teledetection for Healthcare Management of Asthma* : système avancé de télédétection pour la prévention de l'asthme.

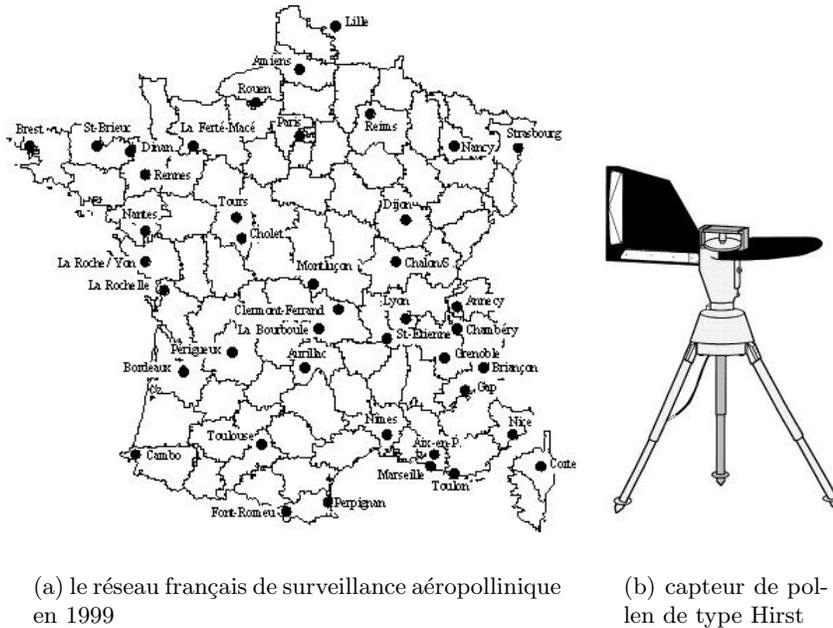


FIG. 5.1 – *Les capteurs polliniques en France. Le nombre de capteurs présents en France en 1999 (a) se restreint à 1 capteur par département (chaque point noir sur la carte représente un capteur). Un capteur pollinique (b) est composé d'ailerons qui lui permettent de s'orienter dans le sens du vent, et d'une buse d'aspiration. Celle-ci aspire l'air, et un filtre (sorte de tambour muni d'un scotch collant [Dey 99]) récupère pollens et particules présents dans l'air.*

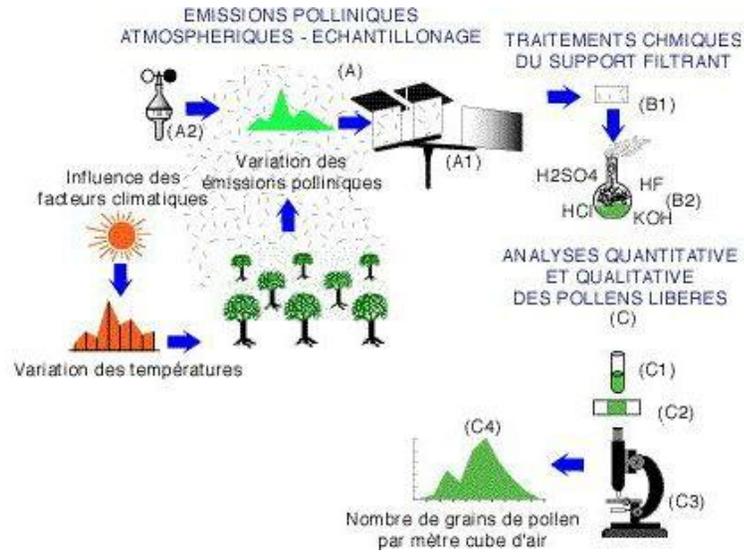
**5.1.1.1.2 Coloration et observation** Une fois les pollens sur le scotch, il faut les colorer pour pouvoir les voir. Un pollen non traité apparaît trop translucide pour être étudié avec précision. Il sont traités avec une préparation normalisée [ASTHMA 98] de fuschine (Fig. 5.2 (b)) ; c'est un colorant de couleur rose qui se présente sous forme de gélatine à température ambiante, et sous forme de liquide si on la chauffe vers 50°C. Elle va être plus ou moins absorbé par les pollens.

Cette préparation va être étalée sur une lame microscopique (Fig. 5.2 (c)) avant d'être observée avec un microscope optique.

### 5.1.1.2 Microbilles

Les lames contenant les microbilles sont préparées très facilement :

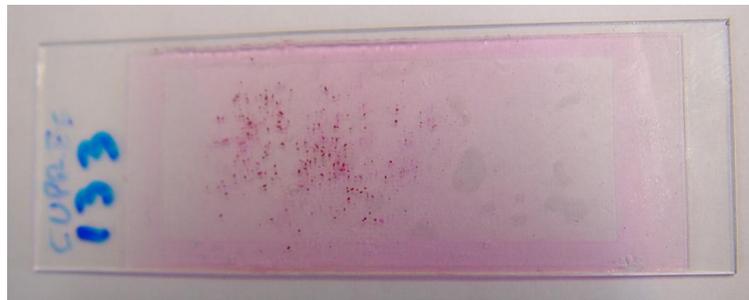
- pour les microbilles qui sont observées à l'air, elles sont saupoudrées sur une lame vierge et observées directement, sans lamelle pour les recouvrir. C'est pour cela qu'il est impossible, si l'on bouge la lame entre deux acquisitions, de retrouver la bonne position de la bille qui nous intéresse : le fait de prendre la lame, de l'incliner ou



(a) la dissémination et le comptage des pollens



(b) flacon de fuchine



(c) échantillons de pollens teintés

FIG. 5.2 – Schéma explicatif de la préparation des grains de pollen, depuis la récolte jusqu'à l'observation. La coloration se fait avec de la fuschine (b) ; on prépare une lame avec les pollens (c).

de souffler dessus font se mouvoir les billes. Par contre, une fois la lame positionnée sous le microscope, les mouvements des 3 axes (de quelques microns à chaque fois) sont suffisamment faibles pour que les billes ne bougent pas ;

- pour les microbilles dans de la fuchsine, nous versons de la fuchsine (chauffée pour en augmenter sa fluidité) sur une lame neuve et nous la saupoudrons de billes avant de rajouter une lamelle. Il faut laisser refroidir le mélange avant de l'utiliser, car les mouvements de convection de la fuchsine liquide suffisent à faire bouger les billes.

### 5.1.1.3 Les autres objets microscopiques

Les images de diaphragmes microscopiques (2D) ne nécessitent pas de vraiment de traitement préalable. Il suffit de les dépoussiérer à l'aide d'un souffleur à air sec et de les placer sous le microscope.

### 5.1.2 Acquisition image

L'appareillage, représenté à la Fig. 5.3, est composé des éléments suivants [Tomczak 99a] :

- un microscope à lumière transmise équipé d'un objectif corrigé de grossissement 20x, 40x ou 60x, similaire à celui utilisé par les palynologues.
- une caméra CCD couleur reliée à une carte d'acquisition.
- une table à déplacements micrométriques.
- un micro-ordinateur de type PC permettant à l'utilisateur un contrôle des déplacements, de la mise au point et ensuite de l'acquisition de séries d'images.

Il faut noter que la mise au point du microscope ne se fait pas en pilotant la mise au point du microscope, mais en pilotant la table à déplacement micrométrique : ce n'est pas l'optique du microscope qui se déplace verticalement au-dessus de la lame, mais la lame qui se déplace verticalement sous l'objectif du microscope.

#### 5.1.2.1 Le microscope

Le microscope utilisé est un microscope optique à lumière transmise Zeiss Axiolab équipé d'objectifs corrigés de 20x, 40x ou 60x. Les valeurs numériques des objectifs utilisés dans notre cas sont les suivantes (Eq. 5.1) :

$$\begin{aligned}
 G = 60x \quad G = 40x \quad G = 20x \\
 \text{ON} = 0.8 \quad \text{ON} = 0.65 \quad \text{ON} = 0.4 \\
 n = 1.0 \\
 d_i = 160 \text{ mm} \\
 \lambda = 0.6 \mu\text{m}
 \end{aligned}
 \tag{5.1}$$

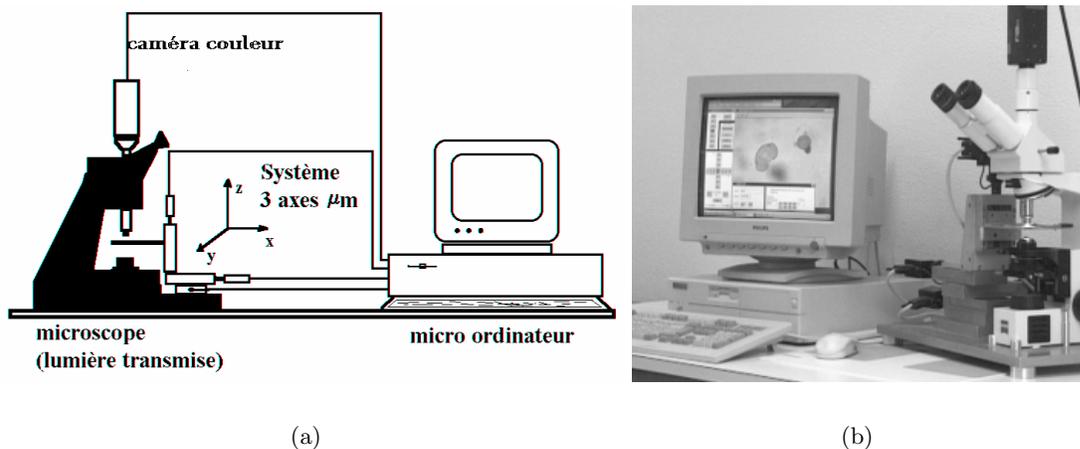


FIG. 5.3 – (a) Schéma représentant le principe de fonctionnement de la station d'acquisition, et (b) photo de la station elle-même.

### 5.1.2.2 La caméra CCD

La caméra CCD est une caméra couleur matricielle mono-CCD Sony XC711, à laquelle est couplée une carte d'acquisition Matrox *Meteor*, pour l'acquisition des images numériques.

### 5.1.2.3 La table à déplacements micrométriques

C'est une table à déplacements micrométriques Physik Instrumente 3 axes :

- 2 axes en  $X$  et en  $Y$ , avec une course de 50 mm, une vitesse de  $0.25 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , et une précision de  $0.25 \mu\text{m}$  par pas ;
- 1 axe en  $Z$ , avec une course de 25 mm, une vitesse de  $1.5 \text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ , et une précision de  $0.0084 \mu\text{m}$  par pas.

Les axes  $X$  et  $Y$  sont utilisés pour le déplacement et l'axe  $Z$  est utilisé pour la mise au point des spécimens.

### 5.1.3 Normalisation des distances de l'espace image réel

Nous avons travaillé avec 3 objectifs de microscopes différents : un 20x/0.4, un 40x/0.65 et un 60x/0.8. La valeur après le / est l'ouverture numérique. Afin de calculer la correspondance entre « pixels et microns », nous avons fait l'acquisition d'images de trous (diaphragmes) de dimensions connues (voir la Fig. 5.4). Nous estimons à 2 pixels l'erreur commise sur la mesure du diamètre du trou.

Les résultats sont les suivants :

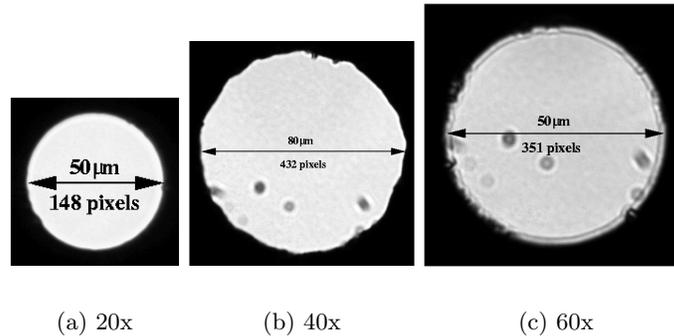


FIG. 5.4 – Détermination de la correspondance entre nombre de pixels et dimensions en microns dans le plan  $XY$ . (a) un trou de  $50 \mu\text{m}$  est observé en  $20x$ , (b) un trou de  $80 \mu\text{m}$  observé en  $40x$  et (c) un trou à nouveau de  $50 \mu\text{m}$  observé en  $60x$ .

objectif	$1 \mu\text{m}$ correspond à...	erreur relative
60x/0.8	7.02 pixels	0.05 pixel
40x/0.65	5.40 pixels	0.03 pixel
20x/0.4	2.96 pixels	0.05 pixel

Nous aurons besoin de ces valeurs par la suite.

## 5.2 Normalisation de la lumière

Nous avons vu dans le chapitre 4 que la lumière qui éclaire le spécimen joue directement sur l'observation. Les grandeurs importants à connaître sont l'angle maximal d'éclairage  $\alpha_{max}$  et l'intensité moyenne de l'éclairage.

### 5.2.1 Détermination de l'angle maximal d'éclairage

Nous avons défini dans le chapitre précédent à quoi correspond l'angle maximal d'éclairage (voir la partie 4.3.2.2.2). Nous allons maintenant le calculer. Nous appelons  $\alpha_{max}$  l'angle maximal d'éclairage qui peut arriver dans l'objectif du microscope (voir la Fig. 5.5). On a représenté sur la Fig. 5.5 un montage simple composé (Fig. 5.5) :

- d'une source lumineuse, à gauche ;
- d'un diaphragme de diamètre  $d$  (au centre).

On note  $D$  la distance entre le diaphragme et le point estimé le plus loin et le plus lumineux. Le diamètre du trou vaut  $d = 50 \mu\text{m}$  avec une grande précision. Avec ces

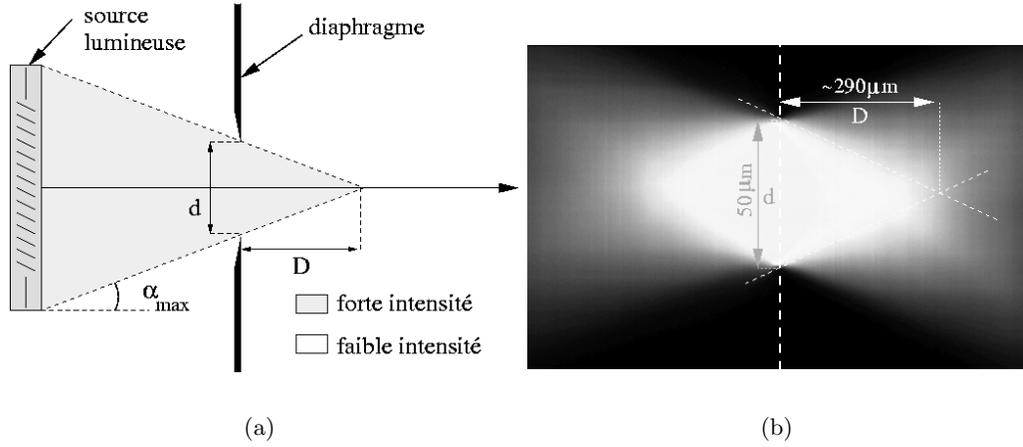


FIG. 5.5 – Détermination de l’angle d’éclairage à l’aide d’un trou (diaphragme) circulaire parfait. (a) En optique géométrique, on peut facilement déterminer la zone dans laquelle l’intensité est maximale (zone centrale, en forme de triangle) en fonction de l’angle maximal d’éclairage  $\alpha_{max}$ . Ce schéma existe dans l’espace objet éclairé, contrairement à (b) et (c) qui sont dans l’espace image. (b) Image latérale réelle du trou de  $50 \mu\text{m}$  utilisé : c’est une coupe  $XZ$  sur laquelle nous avons représenté le plan du diaphragme en pointillés verticaux. La source de lumière est à gauche de la figure.

notations, on peut exprimer l’angle maximal  $\alpha_{max}$  comme

$$\tan \alpha_{max} = \frac{1}{2} \left( \frac{d}{D} \right) \quad (5.2)$$

soit

$$\alpha_{max} = \arctan \left[ \frac{1}{2} \left( \frac{d}{D} \right) \right] \quad (5.3)$$

Par la suite, nous allons nous intéresser à la variation de la focalisation de la lentille, c’est-à-dire à la variation de la distance  $D$ . Si on étudie l’erreur sur la tangente, cela donne :

$$\frac{\Delta(\tan \alpha_{max})}{\tan \alpha_{max}} = \frac{\Delta(d)}{d} + \frac{\Delta(D)}{D} \quad (5.4)$$

$$\simeq \frac{\Delta(D)}{D}$$

car on suppose que dans ce cas, le diamètre  $d = 50 \mu\text{m}$  est parfaitement déterminés. On mesure  $D = (290 \pm 10) \mu\text{m}$  sur la Fig. 5.5 (b).

Cela donne  $\alpha_{max} = (8.6 \pm 0.3) \cdot 10^{-2}$  rad soit  $\alpha_{max} = (4.93 \pm 0.17)^\circ \ll 90^\circ$ . Nous ne sommes donc pas dans une partie où la tangente subit de fortes variations. De fait, la perturbation  $\frac{\Delta(D)}{D} \sim 10^{-2}$  est trop petite pour faire varier significativement l’angle  $\alpha_{max}$ .

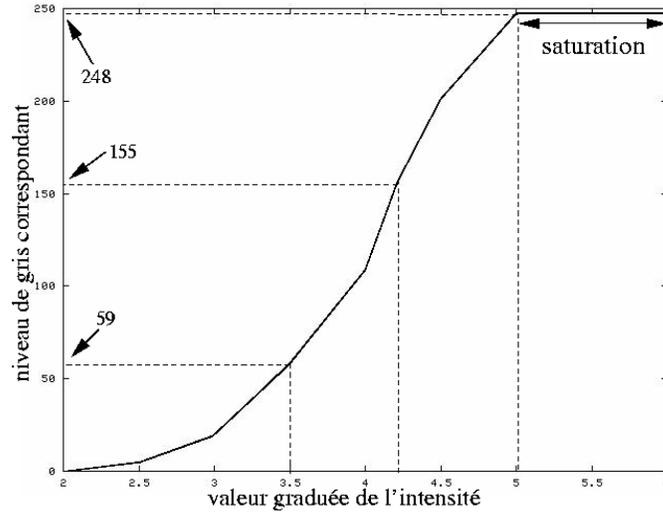


FIG. 5.6 – Pour l’objectif 20  $x/0.4$ . Pour les objectifs 40  $x/$  et 60  $x/$ , nous n’avons utilisé qu’une seule graduation de lumière (4.2). Le niveau de gris correspondant est 155 (air). En utilisant la même méthode, nous déterminons que l’éclairage pour l’objectif 40  $x/$  correspond à un niveau de gris de 127 (air), et pour l’objectif 60  $x/$  à un niveau de gris de 194 (avec de la fuchsine).

### 5.2.2 Calcul de l’intensité moyenne

Afin de pouvoir comparer les séquences d’images calculées des séquences d’images réelles, nous avons fait correspondre les niveaux de gris aux intensités d’éclairage de la source lumineuse du microscope. Le réglage de l’intensité lumineuse s’effectue par une molette qui possède une échelle absolue (graduée de 2 à 6), et non linéaire.

Pour chaque acquisition, nous avons noté à quelle intensité lumineuse nous travaillions. Nous avons déterminé puis utilisé un éclairage optimal pour la plupart des acquisitions réelles autour de 4.2 graduations. D’autres acquisitions ont été effectuées pour des intensités plus faibles, à 3.5 graduations.

Pour déterminer la correspondance avec les niveaux de gris des images, nous avons procédé ainsi : nous fixons une graduation, et nous réalisons une séquence d’images d’une plaque de verre **sans aucun spécimen**. Les images sont de taille 256 x 256 pixels, et sont au nombre de 10 par séquence, de façon à réduire le bruit de fond. Nous calculons alors le niveau de gris moyen pour chaque pixel de chacune des images, et nous réalisons alors une moyenne sur les 10 images. L’erreur sur les niveaux de gris est estimée à 1 niveau de gris, ce qui est très acceptable. Il n’y a pas d’erreur pour les valeurs extrêmes (niveaux de gris 0 et 248).

Au-delà de la graduation 5, les capteurs de la caméra CCD sont saturés.

### 5.3 Etude d'un objet 2D : diaphragme

Pour commencer, nous allons valider notre modèle sur un objet 2D : un diaphragme circulaire microscopique. Après tout, un objet 2D est un objet 3D fin, donc il n'y a aucune incompatibilité.

#### 5.3.1 Vocabulaire de description des résultats

Nous allons préciser quelques termes de description que nous allons utiliser dans la présente partie et les parties qui suivent :

- la **coupe centrale** d'une série d'images correspond à une focalisation parfaite du microscope au **centre** de l'objet ;
- les **coupes latérales** seront, par opposition, les images éloignées du centre ;
- sur une coupe XZ, la **droite** se traduit plus précisément par le côté le plus éloigné de la lumière (après l'objet), et la **gauche** par celui le plus proche de la lumière (avant l'objet).

En ce qui concerne la comparaison de manière quantitative des résultats, nous avons choisi la différence d'images, points à points. En effet, les seules données réelles que nous avons sont les images réelles en niveaux de gris. Les résultats des simulations d'images qui sont calculées avec notre modèle se présentent sous la forme de tableaux de nombres réels la plupart du temps. Mais nous ne pouvons pas comparer des chiffres directement à des images ; nous transformons donc linéairement ces valeurs numériques en niveaux de gris, en faisant correspondre la valeur numérique du fond à la valeur en niveau de gris du fond de l'image réelle.

#### 5.3.2 Calculs des images

Nous modélisons l'observation d'un trou de  $50 \mu\text{m}$  de diamètre avec un objectif de 20x (Fig. 5.7 (c)). Cela représente un volume de 500 images de taille  $256 \times 256$  pixels, en 256 niveaux de gris. La distance entre 2 images consécutives est de  $2 \mu\text{m}$  en  $z$ , et en  $(x, y)$ , 3 pixels représentent  $1 \mu\text{m}$ . Dans l'annexe B, nous avons inclus le fichier de configuration de l'objet.

#### 5.3.3 Commentaires sur les résultats

Les résultats sont représentés sur la Fig. 5.7. L'espace objet éclairé (a) est calculé par lancé de rayons ; en lui appliquant le modèle de formation de l'image, nous obtenons la Fig. 5.7 (b) qui est à comparer aux images réelles sur la Fig. 5.7 (c). Comparons maintenant les résultats de la Fig. 5.7 (b) et (c) :

- sur les coupes XZ réelles et calculées, la forme générale est la même : c'est un losange

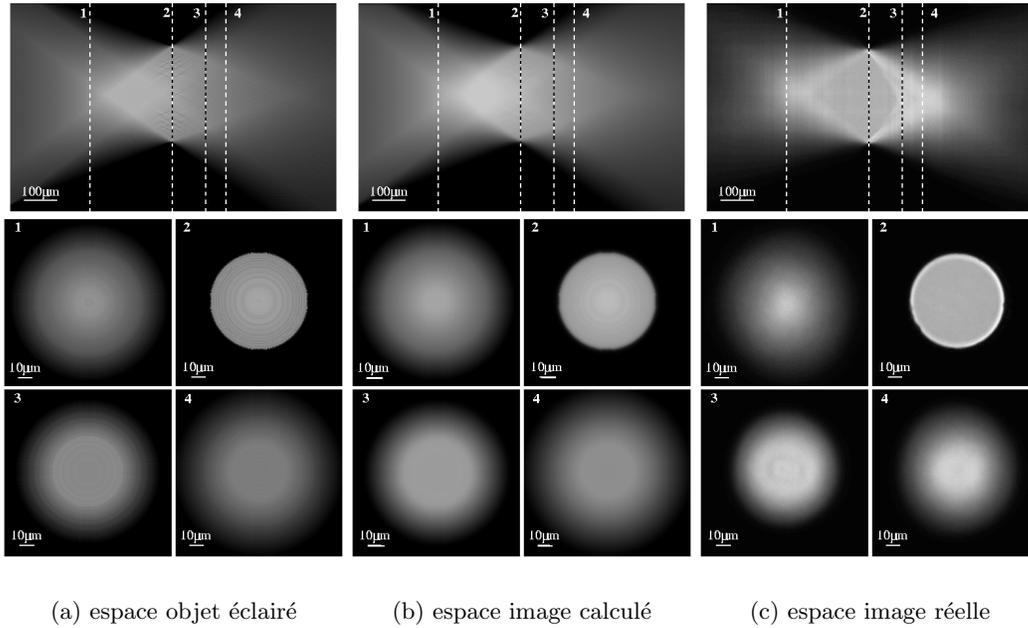
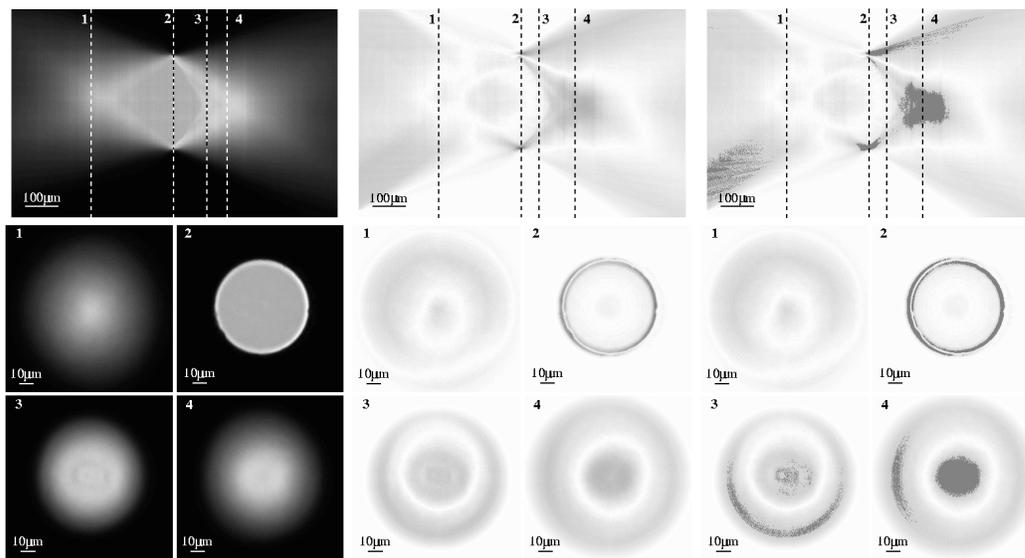


FIG. 5.7 – Différentes étapes de la modélisation et vues réelles du diaphragme de  $50 \mu\text{m}$ . (a) espace objet éclairé de synthèse, (b) espace image correspondant et (c) images réelles. Chacune des images (a), (b) ou (c) comportent une vue XZ (position supérieure) et 4 vues XY correspondant à des traits pointillés.

duquel partent des cônes de lumières de part et d'autres. L'image XZ réelle présente en plus un côté (le droit) plus lumineux à cause de la diffraction.

- les coupes XY correspondent aussi fort bien : la coupe centrale (numéro 2) est la plus nette et les coupes plus éloignées du centre sont plus floues.
- les phénomènes de diffraction induisent sur les images réelles un anneau lumineux sur les bords du diaphragme (coupe 2 de la Fig. 5.7 (c)) et une luminosité accrue sur les images après la traversée du diaphragme (coupes 3 et 4 de la Fig. 5.7 (c)).

Nous avons représenté sur la Fig. 5.8 les cartes de différences (*i.e.* les différences image à image en valeur absolue) entre la Fig. 5.7 (b) et (c). Les zones blanches correspondent à des valeurs nulles, et les zones grisées à des erreurs croissantes. La Fig. 5.8 (a) est étalée entre 0 et 143 niveaux de gris de différence. Afin de voir l'impact de la diffraction (qui n'a pas été modélisée, rappelons-le) sur notre modèle de formation de l'image, nous avons effectué un seuillage à 50 niveaux de gris de différence sur la Fig. 5.8 (b) : les effets de la diffraction sont très localisés (après le passage du diaphragme et en bordure de diaphragme).



(a) espace image réelle

(b) différence sans seuillage

(c) avec seuillage

FIG. 5.8 – Différence image à image entre les images réelles (a) et les image calculées de la Fig. 5.7 (b). (b) différence brute et (c) différence seuillée pour mettre en évidence les perturbations dues à la diffraction.

### 5.3.4 Conclusion

Sur un objet 2D, notre modèle produit une simulation relativement précise ; nous avons vu qu'à la diffraction près, les images calculées et les images réelles n'étaient que très peu différentes : au plus 50 niveaux de gris de différence. Il faut garder en mémoire que le résultat de la simulation possède une incertitude dès le départ, lors de la modélisation de l'objet : plus l'objet est compliqué à modéliser, et plus nous avons une erreur incompressible. Dans la partie suivante, nous allons étudier les résultats de notre modèle sur un objet 3D opaque.

## 5.4 Etude d'un objet 3D opaque

Après avoir testé le modèle sur un objet 2D et avant de le tester sur un objet 3D translucide, nous allons étudier le cas d'un objet 3D opaque.

### 5.4.1 Calculs des images

Nous allons valider le modèle sur des objets opaques dans cette partie : nous allons utiliser une microbille opaque. Même si le modèle a été créé pour des objets 3D translucides, les objets 3D opaques (*i.e.* objets 3D translucides très absorbants) doivent répondre à la

définition. Le diamètre de la bille opaque est de  $4.1 \mu\text{m}$  et elle est observée avec l'objectif de 40x. Nous avons représenté les images réelles sur la Fig. 5.9 (c). La Fig. 5.9 (a) représente l'espace objet éclairé, et la Fig. 5.9 (b) l'espace image. Comme toujours, le fichier de configuration de l'étape de modélisation de l'objet se trouve en annexe B.

### 5.4.2 Commentaires sur les résultats

Nous allons comparer entre elles les images (b) et (c) de la Fig. 5.9. Nous pouvons tout d'abord constater que l'objet réel ressemble à une sphère, sans en être une rigoureusement. De plus, le fond des images réelles est légèrement variable, à la différence des images calculées dans lesquelles le fond est continu. Sur la coupe XZ réelle (Fig. 5.9 (c)) nous pouvons remarquer que la localisation de la bille opaque est difficile : nous ne voyons pas une particule pseudo-sphérique bien localisée, mais au contraire un étalement sombre (selon l'axe optique) qui correspond à 25 ou 30  $\mu\text{m}$ . Cet étalement présente 2 cônes sombres têtes-bêches, à partir de la coupe centrale. Au-delà de cet étalement, le fond lumineux commence à diluer les zones sombres pour les faire quasiment disparaître à une distance de 30 à 35  $\mu\text{m}$ . Nous voyons apparaître à la limite de la zone sombre une zone plus claire qui correspond à la diffraction de la lumière.

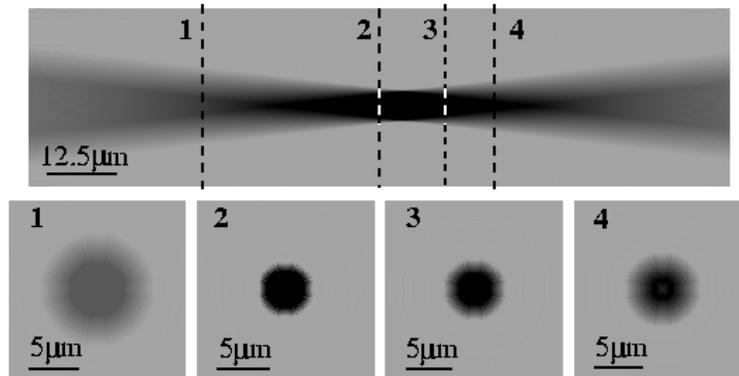
C'est bien ce que nous retrouvons sur la coupe XZ calculée : une zone sombre conique, un étalement de 25 ou 30  $\mu\text{m}$ , et une disparition de la zone sombre à une trentaine de microns. Par contre, il semble que l'étalement vertical (en X donc, sur la coupe XZ) dû au flou soit trop important dans notre modèle par rapport à la réalité : à travers les images calculées, la particule semble un peu plus épaisse que dans la réalité. De plus, nous n'avons pas non plus les zones plus claires correspondant à la diffraction.

Afin de quantifier les différences entre les images réelles et les images calculées, nous avons calculé, comme dans la partie 5.3, des cartes des différences points à points entre les images réelles et les images calculées (XY ou XZ). Elles sont représentées sur la Fig. 5.10.

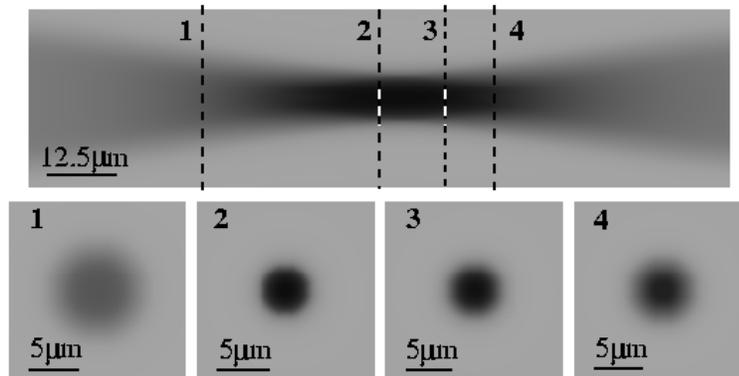
Sur la coupe XZ de la Fig. 5.10 (a) (image du haut) l'erreur maximale est de 136 niveaux de gris, mais elle est très localisée : un seuillage à 50 niveaux de gris (Fig. 5.10 (a)) montre que c'est encore aux endroits où la diffraction est présente. On voit aussi que les erreurs proviennent du trop gros étalement en XY du flou (image 1 de la Fig. 5.10 (a)).

### 5.4.3 Conclusion

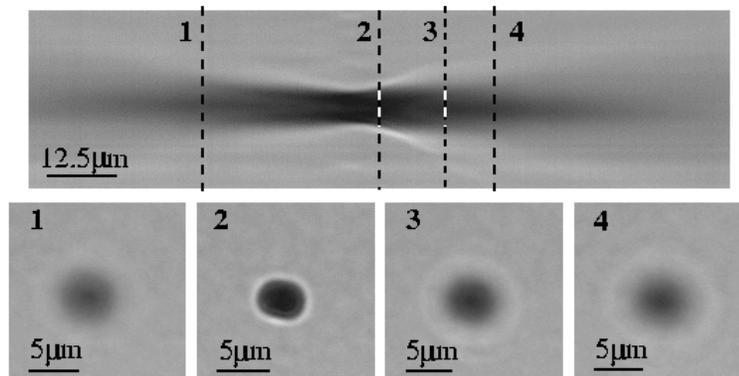
Les résultats de la simulation sur des objets 3D microscopiques et opaques sont relativement corrects puisque nous retrouvons bien les caractéristiques des images réelles sur les images calculées. Les écarts à la réalité ont plusieurs sources : la première est sans doute la modélisation de l'objet par une sphère, alors que l'objet réel n'est pas une sphère parfaite semble-t-il (Fig. 5.9 (c) sur l'image 2) ; de plus, le fond n'est pas continu, contrairement à notre modélisation, mais les écarts sont de l'ordre de 15 niveaux de gris. Ensuite viennent



(a) espace objet éclairé

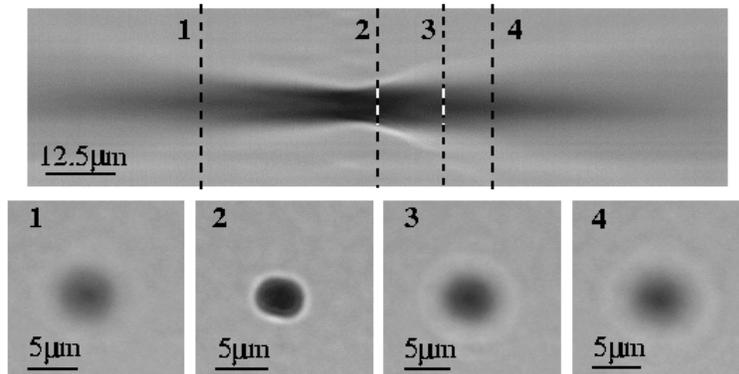


(b) espace image calculé

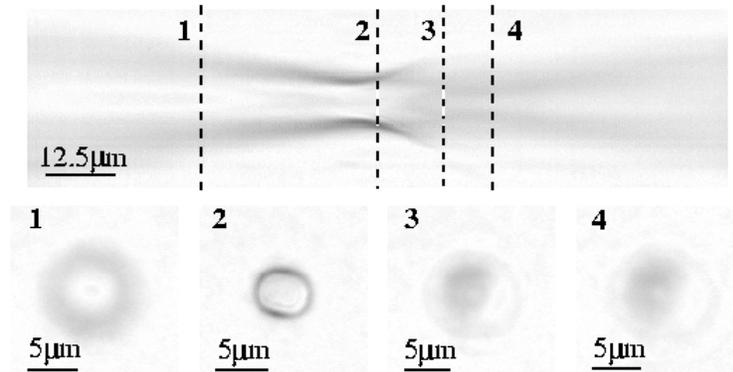


(c) espace image réel

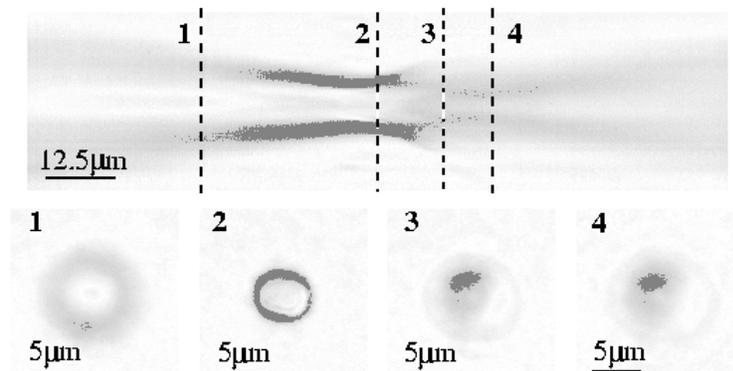
FIG. 5.9 – Résultats concernant une bille opaque : (a) espace objet éclairé, (b) espace image calculé et (c) espace image réel. Sur chaque groupe d'images, l'image du haut est une coupe XZ et les 4 en-dessous des images XY.



(a) espace image réelle



(b) différence sans seuillage



(c) différence avec seuillage

FIG. 5.10 – Toujours pour la bille opaque, nous avons (a) l'espace image réel, (b) la différence brute entre les différentes images et (c) la différence avec un seuillage pour localiser les zones de plus grande erreurs.

des écarts qui sont plutôt dus à la conception du modèle : nous n'avons pas modélisé la diffraction, bien qu'elle soit présente sur les images réelles. Elle produit de gros écarts (plus de 130 niveaux de gris), mais elle reste très localisée et donc ne gêne pas beaucoup la simulation d'images.

## 5.5 Etude d'objets 3D : micro-billes de verre

Après avoir étudié des objets 2D et des objets 3D opaques, nous allons maintenant valider le modèle pour le cas le plus compliqué : les objets 3D translucides. Dans cette partie, nous présentons les résultats obtenus avec notre modèle sur plusieurs billes de verre de différentes taille et dans différents milieux. Ce sont donc des objets translucides, microscopiques et tridimensionnels que nous étudions. Nous nous sommes servis de microbilles de verre de plusieurs diamètres, soit placées dans l'air (pas de solvant) comme pour la partie 5.5.1, soit dans de la fuchsine pour avoir un milieu d'indice plus fort dans la partie 5.5.3.

Très souvent, nous essayons de donner un aperçu du *te* de calcul pour l'espace objet éclairé et l'espace image calculé. Ces calculs sont effectués sur un ordinateur équipé d'un processeur Intel *PIV* cadencé à 1.2 GHz avec 512 Mo de RAM.

### 5.5.1 Air verre - « grosse » bille

Les premiers objets qui nous servent à valider le modèle pour un objet 3D translucide sont des micro-billes de verre (d'indice  $n_v = 1.52$ ) à l'air libre (indice  $n_0 = 1.0003$ ). Nous avons étudié des billes de différents diamètres (de 40 à 100  $\mu\text{m}$ ), et nous allons commencer par présenter les résultats sur une bille de  $(63 \pm 2)\mu\text{m}$  de diamètre.

Nous avons donc simulé cette bille translucide par une sphère de  $(63 \pm 2)\mu\text{m}$  de diamètre, d'indice 1.52 et de diffusion équivalente à une absorption de  $0.007 \mu\text{m}^{-1}$ . Pour la phase d'éclairage, le fichier de configuration est en annexe B, et le *te* de calcul est d'un peu plus de 13 heures. Sur la Fig. 5.11, nous avons représenté l'espace objet calculé, et les espaces images réel et calculés.

En comparant l'espace image calculé (Fig. 5.11 (b)) à l'espace image réel (Fig. 5.11 (c)), nous avons des comparaisons entre les distances caractéristiques : par exemple, si on regarde les coupes XZ, le point d'intensité maximal (image numéro 3 sur chaque figure) est située exactement à  $(53 \pm 2) \mu\text{m}$  du centre sur l'image réelle (image numéro 2 la Fig. 5.11 (c)), et à  $(55 \pm 1) \mu\text{m}$  (petite erreur d'estimation sur la position exacte de la bille calculée) sur la Fig. 5.11 (a). L'objet calculé correspond au micron près à l'image réelle, en ce qui concerne la focale de la bille. En ce qui concerne le cône d'ombre (à droite), les résultats sont aussi excellents, car nous retrouvons presque la même pente : pour l'image réelle, on trouve une pente de  $(0.198 \pm 0.013) \text{ pix} \cdot \mu\text{m}^{-1}$  ( $0.202 \pm 0.013) \text{ pix} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ .

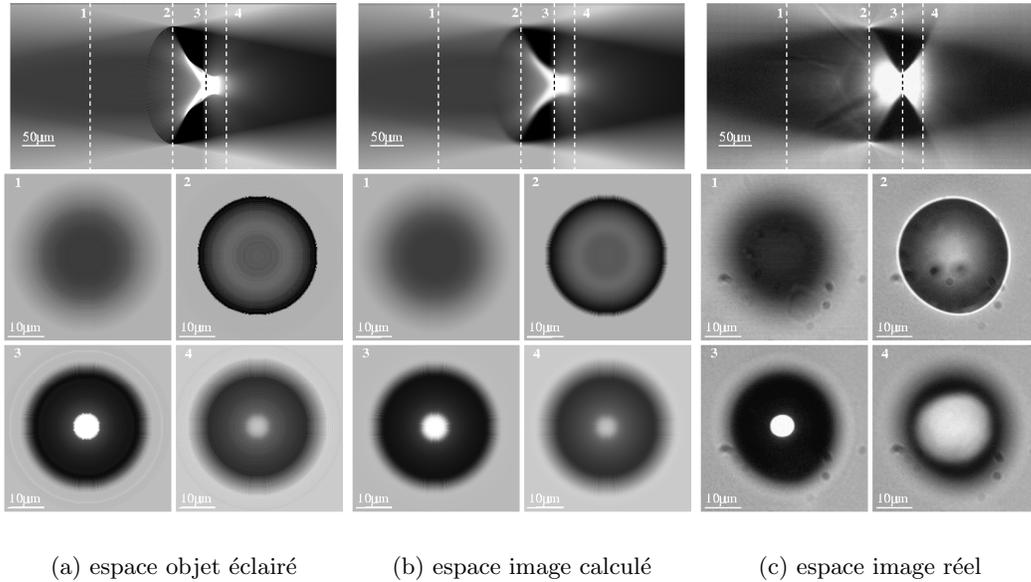


FIG. 5.11 – Les résultats pour une bille de verre de diamètre  $(63 \pm 2)\mu\text{m}$ , dans l'air. (a) espace objet calculé (avec prise en compte de la diffusion), (b) espace image calculé et (c) espace image réel. Nous pouvons remarquer sur l'image 2 (c) que la bille n'a pas une section circulaire.

Sur les images calculées, la caustique qui apparaît (voir la coupe XZ) est plus localisée et moins étalée que dans la réalité. En effet, une bille réelle est loin d'être parfaite, contrairement à la sphère du modèle ; une surface non sphérique rigoureusement entraînera un étalement de la caustique. Le point le plus lumineux de la caustique (point focal) correspond bien au point focal réel. Nous pouvons remarquer toujours le même effet de la diffraction sur la coupe centrale de la séquence réelle : il y a un anneau brillant autour de la bille, qui n'apparaît évidemment pas sur l'image calculée, faute de modélisation.

La Fig. 5.12 représente la carte des différences des niveaux de gris des images réelles et calculées. Les écarts les plus importants se situent bien là où nous les attendions : aux endroits où les effets de la diffraction se font sentir, et aux endroits où la caustique fait défaut, sur notre modèle. Sur la Fig. 5.12 (b), nous avons seuillé les erreurs à 50 niveaux de gris pour faire ressortir les zones dans lesquelles les écarts sont les plus importants.

Sur les Fig. 5.12 (a) et (b), on peut voir que les images réelles correspondent assez bien aux résultats de l'espace objet éclairé. L'extérieur de l'objet est identique au bruit de fond près, et la diffraction (images (a) 2 et (b) 2) est la plus forte erreur. La plupart des images ont une erreur maximale moindre dans l'espace image modélisée que dans l'espace objet éclairé : dans notre modèle, l'étape de création de l'espace image (système optique) diminue l'écart par rapport à des images réelles. Nous avons représenté les erreurs maximales pour toute la séquence sur la Fig. 5.13. Les courbes montrent la différence maximale (en niveau

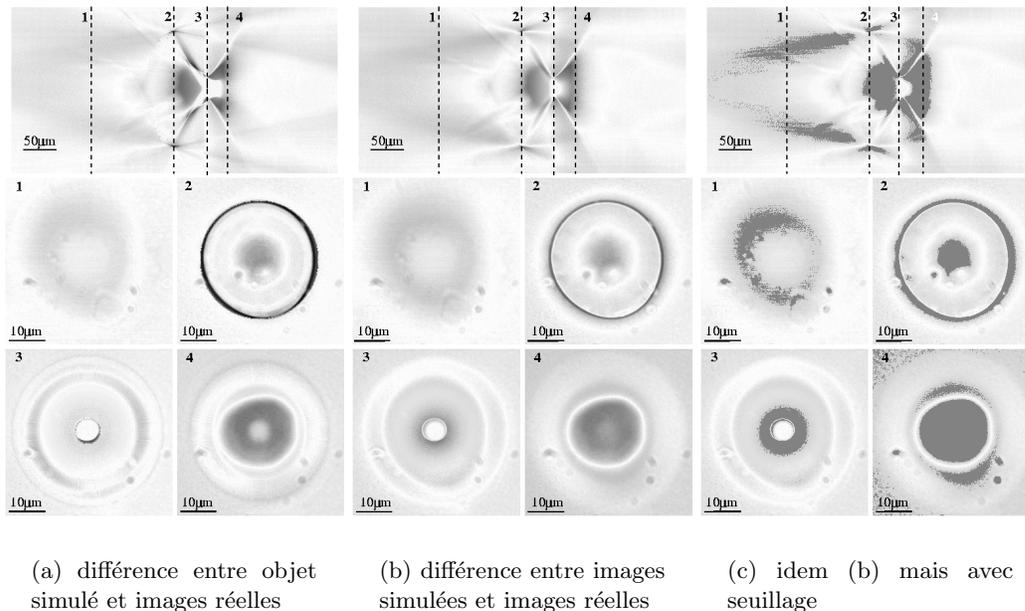


FIG. 5.12 – Images résultantes de différences image à image entre l'espace image réel et (a) l'espace objet éclairé, (b) et (c) avec l'espace image calculé. La figure (c) se différencie de la (b) par un seuillage à 50 niveaux de gris pour mettre en évidence les zones où l'erreur est la plus forte. Plus le niveau de gris est fort sur les images (a) et (b) et plus l'erreur est importante. (a) Le maximum d'erreur est 232 niveaux de gris pour la coupe XZ, de 71 pour l'image 1, 248 pour la 2, 191 pour la 3 et 144 pour la 4. Les maxima d'erreur pour la figure (b) sont respectivement de 162 (XZ), 80 (1), 160 (2), 131 (3) et 139 (4). Ils sont tous très inférieurs aux valeurs de la figure (a), sauf la dernière image (image 4).

de gris) entre les images réelles et :

- les images de l'espace objet éclairé (courbe (a)) ;
- les images calculées (courbe (b)).

Nous voyons que la dernière étape du modèle de formation de l'image est nécessaire et réduit de beaucoup l'erreur. dans les zones dans lesquelles se trouve l'objet. Au delà, l'erreur est sensiblement la même.

### 5.5.2 Air Verre - petite bille

Nous recommençons rigoureusement la même procédure que dans la partie 5.5.1 mais avec une bille plus petite : c'est une bille de  $(26.6 \pm 0.5)\mu\text{m}$  de diamètre. Les images réelles de la bille sont prises avec un objectif de 20x/0.4 et sont représentées sur la Fig. 5.14 (c) selon la procédure maintenant établie. Le volume d'images réelles est de 500 images 256x256 en 256 niveaux de gris. Le pas d'acquisition est de  $0.25 \mu\text{m}$  entre 2 images. L'espace

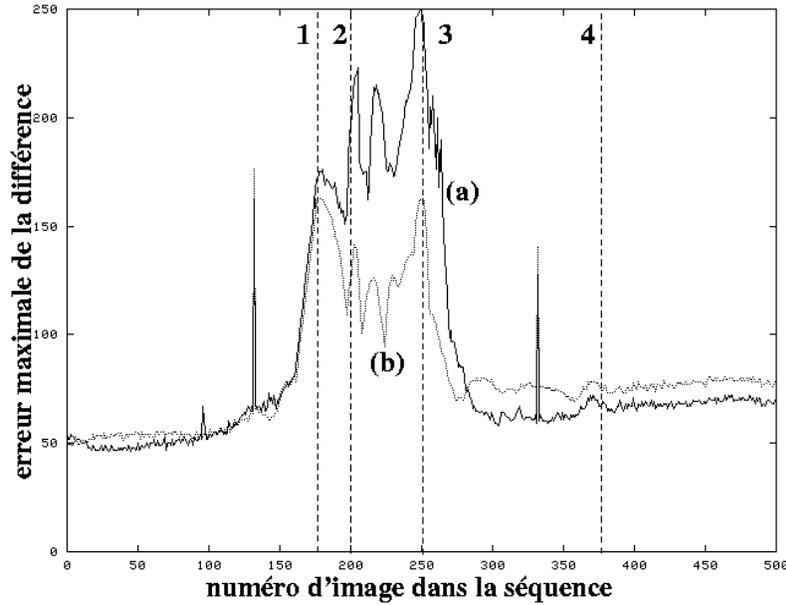


FIG. 5.13 – Ce graphe représente les erreurs maximales pour chaque différence entre images. Il faut comprendre par là que sur une image obtenue par différence pixel à pixel, nous retenons le pixel qui a le niveau de gris (valeur de 255 au plus) le plus élevé (erreur maximale) sur cette image. L'abscisse donne le numéro d'image, l'ordonnée la valeur maximale de l'erreur en niveau de gris (minimum : 0 et maximum : 255). La courbe (a) représente la différence image par image entre les espaces image réel et objet éclairé, et (b) image réel et image calculé. Nous avons fait figurer en pointillés verticaux les images que nous avons représentées sur la Fig. 5.12.

objet modélisé est représenté sur la Fig. 5.14 (a) (fichier de configuration en annexe A) et l'espace image calculé est représenté sur la Fig. 5.14 (b). Le temps de calcul du volume d'images de l'espace objet éclairé a été de 17 heures sur la machine de référence, et de 6 heures pour l'étape de calcul de l'espace image.

Les différences les plus importantes entre les espaces image calculé et réel sont les suivantes : tout d'abord, la diffraction est encore plus importante et crée une « fourche » lumineuse (image du haut de la Fig. 5.14 (c)). Ensuite, la caustique que nous avons calculée est un peu plus étendue en  $z$  que la caustique réelle, mais elle est surtout plus épaisse (en XY) au centre de la bille modélisée (image 2 de la Fig. 5.14 (b)).

La Fig. 5.16 donne la variation de l'erreur maximale entre les images réelles et celles de l'espace objets éclairé (a) ou celles de l'espace image calculé (b). Bien que les images calculées soient plus proches des images réelles, les 2 courbes sont relativement proches sur tout leur domaine de variation. De plus, il y a toujours un pic d'erreur au niveau de l'objet, ce qui montre qu'il faut le modéliser avec plus de précision.



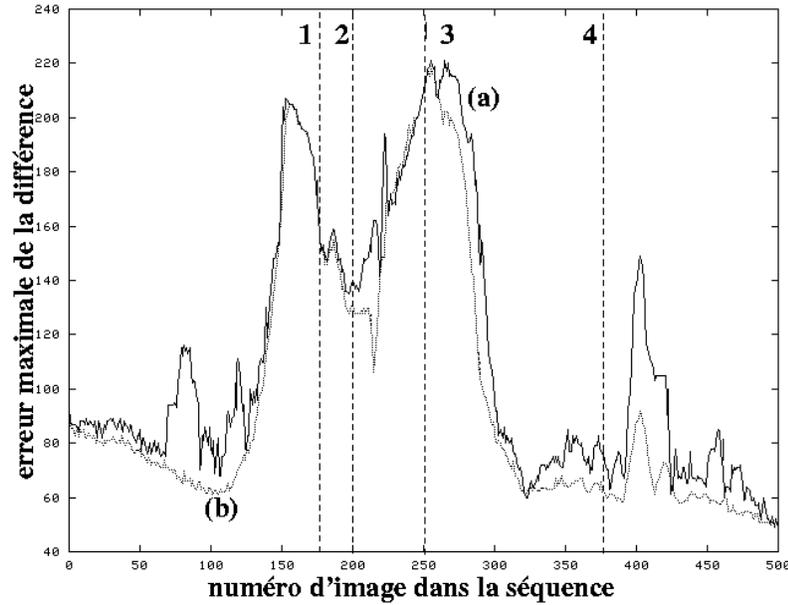


FIG. 5.16 – La courbe (a) représente la différence image par image entre les espaces image réel et objet éclairé, et (b) image réel et image calculé. En pointillés verticaux, nous avons les images représentées sur la Fig. 5.15. (Pour plus d'explication, se reporter à la Fig. 5.13.)

### 5.5.3 Fuchsine verre

Pour changer de médium dans lequel baignent les billes, nous étudions maintenant le modèle dans le cas d'une bille de verre plongée dans de la fuchsine, le colorant rose utilisé pour marquer les grains de pollen. Son diamètre est encore plus petit ( $16.8 \mu\text{m}$ ), et le microscope a ici un grossissement de  $60\times/0.8$ . Le pas en  $z$  entre 2 images successives est de  $0.5 \mu\text{m}$  et nous avons un volume de 500 images réelles  $256\times 256$  en 256 niveaux de gris. Quelques unes sont représentées sur la Fig. 5.17 (c). Le calcul de l'espace objet éclairé (à partir du fichier de configuration que l'on peut trouver en annexe B) a duré 8 heures sur la machine de référence. Les résultats sont illustrés sur la Fig. 5.17 (a). L'étape de création d'un volume d'image a duré environ 7 heures 30 sur la même machine, et les résultats sont visibles sur la Fig. 5.17 (b).

Les résultats sont toujours approximativement les mêmes : bonne correspondance en moyenne, mais sous-estimation de la largeur (XY) de la caustique et effets de diffractions encore plus importants ; en effet, les effets de la diffraction augmentent avec la diminution de la taille de l'objet. La Fig. 5.18 illustre ces résultats par des différences entre images. La Fig. 5.19 représente de manière quantitative l'évolution de l'erreur maximale. Nous constatons que les résultats sont meilleurs avec l'espace image calculé, mais les erreurs demeurent importantes.

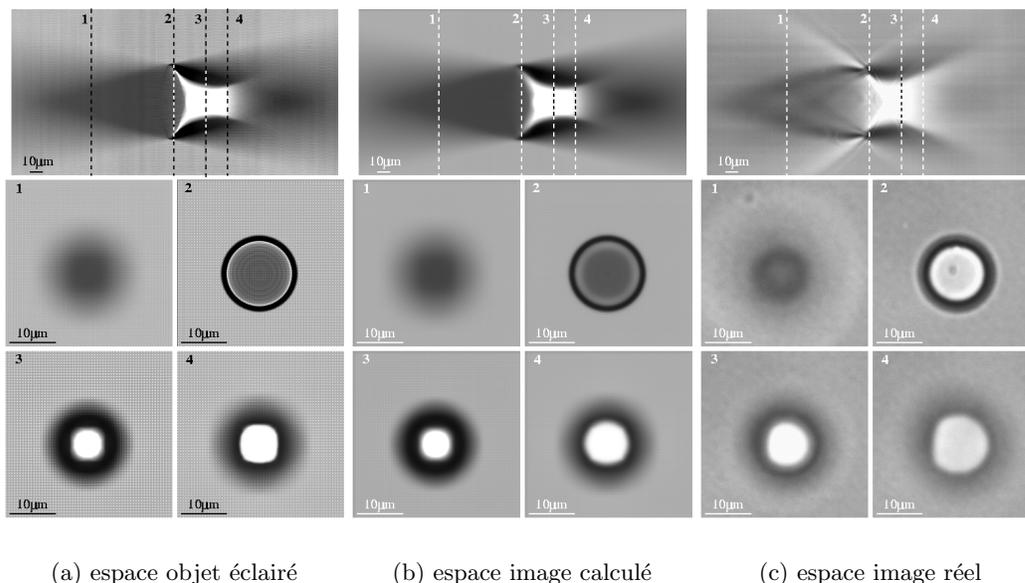


FIG. 5.17 – Les résultats pour la bille de verre dans la fuchsine. Son diamètre est de  $16.8 \mu\text{m}$ : (a) espace objet éclairé que nous avons calculé, (b) espace image calculé et (c) espace image réel.

#### 5.5.4 Conclusion

Nous venons de présenter les résultats que nous obtenons sur des objets translucides (billes de verre), produits avec le modèle introduit dans le chapitre 4. Ce modèle de bons résultats pour des billes assez grosses (diamètre de l'ordre de la cinquantaine de microns) et des résultats un peu plus éloignés de ce que l'on observe en réalité dès que la bille devient trop petite (diamètre de l'ordre d'une vingtaine de microns, et en-dessous). Le modèle ne tient pas compte de la diffraction, il est donc limité par la taille des objets observés. Une expérience intéressante serait d'évaluer la taille limite des objets donnant des résultats acceptables, jusqu'à ce que ces objets soient trop petits pour être simulés.

Nous avons vu que dans l'espace objet éclairé, il y avait toujours de l'*aliasing*. Il faudrait chercher puis utiliser des techniques qui luttent contre cet *aliasing* en 3D. Heureusement, le passage à l'espace image calculé ayant un effet passe-bas, il n'est pas à l'origine de trop grosses erreurs et disparaît presque.

La sous-estimation de la largeur (XY) de la caustique est aussi à travailler: il est probable que celle-ci provienne du fait que les objets réels ne sont pas rigoureusement symétriques, comme nous l'avons montré en 5.5.1.

Dans la partie suivante, nous allons nous intéresser à des objets plus complexes qui ont initié ces travaux: des grains de pollen.

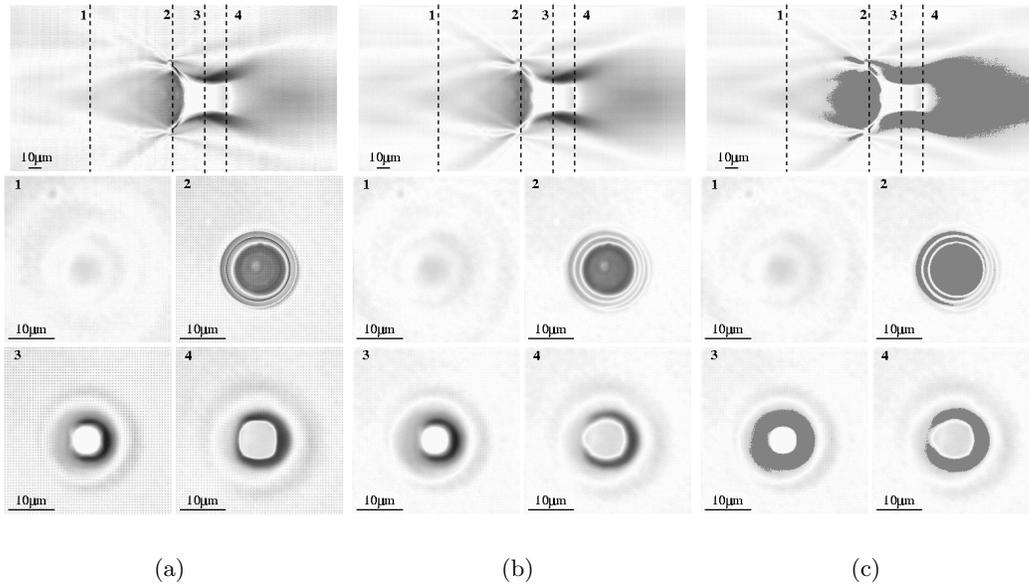


FIG. 5.18 – Mise en évidence des erreurs par différences d’images (a) entre l’espace objet éclairé et l’espace image réel, (b) entre l’espace image calculé et l’espace image réel, et (c) la même chose avec en plus un seuillage à 50 niveaux de gris. Il n’y a pas trop d’erreur sur l’image 1 (c), mais le seuillage n’est pas très exploitable sur les autres images. Sur l’image 2 (c), nous voyons l’importance des effets de la diffraction par l’apparition d’anneaux concentriques.

## 5.6 Modélisation d’objets complexes 3D

Ce sont des objets beaucoup plus complexes, avec des indices très proches de celui de la fuchsine dans laquelle ils baignent. La différence d’indice n’est donc pas très importante, mais elle existe tout de même. Une bonne approximation a été de traiter un pollen comme non réfractant et partiellement absorbant (partie 5.6.1). Nous avons déjà présenté ces résultats dans un article précédant [Dey 01]. Nous allons ensuite étudier un objet plus compliqué en introduisant la réfraction en plus de l’absorption (partie 5.6.2).

### 5.6.1 Modélisation sans réfraction

Les premiers résultats que nous présentons sont calculés sans utiliser la totalité du modèle : la réfraction n’intervient pas. En fait, plutôt que de modéliser un objet, et de simuler son éclairage, la phase de modélisation se passe directement dans l’espace objet éclairé. Il ne reste plus ensuite qu’à transformer cet espace en espace image à l’aide de notre modèle de flou.

Nous présentons les résultats pour des focus correspondants à plusieurs plans  $(x, y)$  à

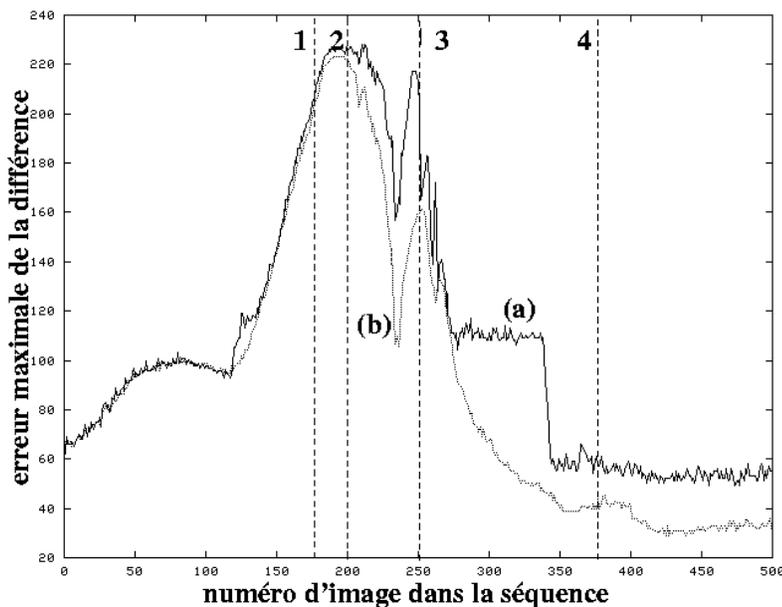


FIG. 5.19 – Ce graphique représente les erreurs maximales pour chaque différences entre images comme sur la Fig. 5.13. (a) différence entre les espaces image réel et objet éclairé ; (b) différence entre les espaces image réel et image calculé. (Pour plus d'explication, se reporter à la Fig. 5.13)

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. 5.20. Cet objet est une sphère proche de l'objet représenté sur la Fig. 4.9, avec un rayon de  $20 \mu\text{m}$  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 dans le chapitre 4. Les données en sortie (images calculées) sont représentées sur la première colonne de la Fig. 5.20. Elles sont à comparer avec la deuxième colonne, qui représente les images floues réelles d'un grain de pollen réel.

### 5.6.1.1 Pour une séquence d'images

Etudions d'abord la séquence réelle de la Fig. 5.20 (colonne de droite) : on remarque que les images extrêmes (f) et (j) sont les plus floues, et que le flou décroît lorsqu'on focalise vers le centre du grain. L'image centrale (h) est celle qui a ses contours les moins flous. La séquence calculée avec l'OTF de Stokseth (colonne de gauche) est composée des images (a) à (e). L'image centrale (c) a ses contours les moins flous par rapports aux autres images de la séquence, et des images extrêmes ((a) et (e)) qui sont les plus floues de la séquence. Le modèle d'OTF est satisfaisant, bien que l'on remarque une disparition trop rapide du

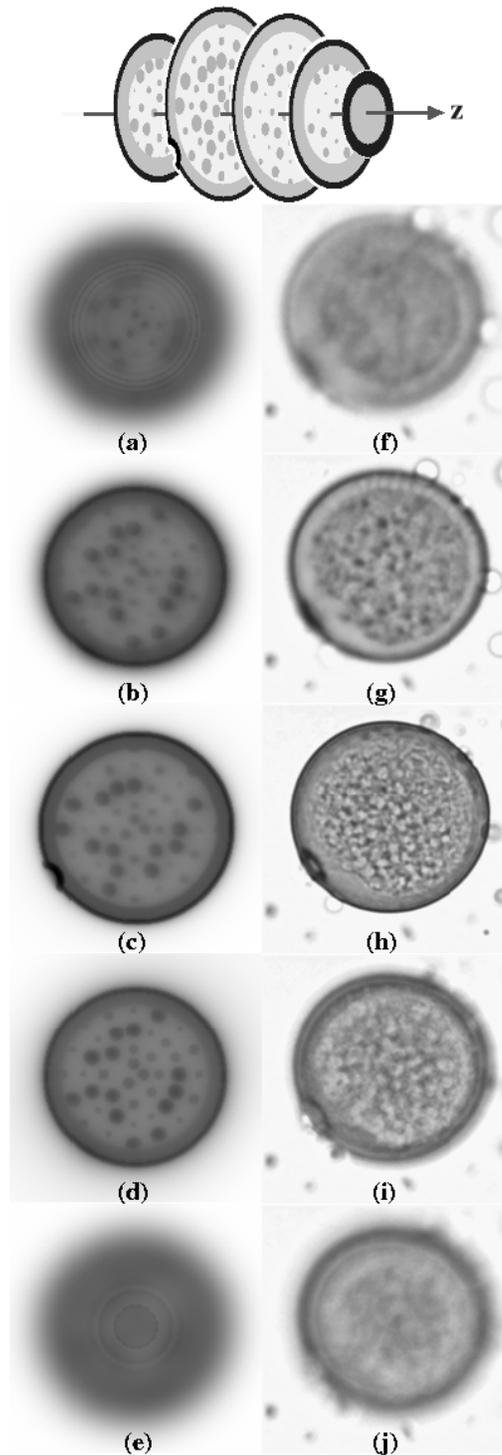


FIG. 5.20 – On a représenté en haut de la figure, cinq plans-objet du pollen modélisé. Ce sont des plans-objet nets, avant qu'on ne leur applique notre modèle de formation de l'image. Dans la colonne de gauche, les 5 images (a)-(e) sont calculées à l'aide de l'OTF de Stokseth. Les images (f)-(j) représentent une série d'images réelles d'un grain de pollen : un Poaceae. Dans les 2 colonnes, toutes les images correspondent à des focalisations à l'intérieur du grain de pollen.

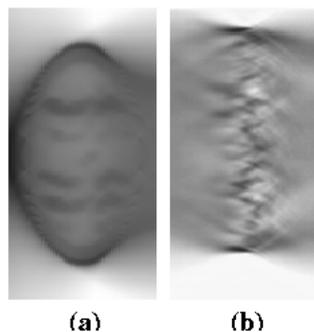


FIG. 5.21 – Images latérales (dans le plan  $XZ$ ) de dimensions  $200 \times 100 \mu\text{m}$ . (a) Images calculées en utilisant le modèle d'OTF de Stokseth. (b) Image réelle d'un grain de pollen de Poaceae. Il faut bien remarquer que ces images ne correspondent pas à la réalité physique, ce ne sont que des représentations numériques.

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 la coupe extrême (e) de la séquence calculée.

### 5.6.1.2 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  $XZ$ . 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  $200 \times 200$  en  $(x, y)$ . Si on les empile numériquement, on obtient un volume  $200 \times 200 \times 100$ . Maintenant, si on coupe ce volume perpendiculairement à l'axe  $y$ , on obtient une série d'images  $200 \times 100$  dans le plan  $XZ$ . Nous avons comparé les résultats d'une seule de ces images latérales (celle correspondant au milieu du grain de pollen). La Fig. 5.21 (a) montre l'image calculée avec le modèle de flou de Stokseth et (b) l'image réelle. 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.

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 elloïde, 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. 5.21 (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.

### 5.6.1.3 Conclusion

Les points blancs à l'intérieur du pollen sur les images réelles de la Fig. 5.20 sont probablement dus à des phénomènes de réfraction. Cette première approximation qui ne tient compte que de l'absorption et du flou donne donc de bons résultats, mais nous allons maintenant prendre en compte la réfraction.

## 5.6.2 Avec la réfraction

Nous allons maintenant appliquer le modèle complet sur un modèle de pollen de graminée, identique au précédent. Nous allons en plus simuler la réfraction dans l'objet, en plus de l'absorption.

Dans la partie 5.6.1, la difficulté majeure dans la représentation de l'objet était l'absence de données physiques quant à l'absorption d'un grain de pollen. Nous avons réussi à trouver un encadrement raisonnable pour l'absorption, et maintenant nous devons faire de même pour la réfraction. Dans [Wiersma '00], Wiersma indique que pour des spécimens biologiques contenant de l'eau, on peut prendre un indice de réfraction de l'ordre de 1.33. Un pollen (voir annexe A) est une cellule, qui répond donc à cette définition. Plus précisément, dans [Cushing 97], on trouve que l'indice de réfraction d'une exine de pollen varie entre 1.55 et 1.60. En ce qui concerne la glycérine, son indice (de 1.47) est supérieur ou de l'ordre à celui de la fuchsine, toujours d'après [Cushing 97].

### 5.6.2.1 Présentation de l'objet

Nous avons reproduit le pollen de *Poaceae* de la partie précédente, mais sans inclure les taches sombres au centre. Le modèle d'objet est donc composé de 2 sphères non concentriques qui ont été créées à l'aide des images du pollen réel. Le pore est représenté à l'aide de 2 sphères lui aussi. Sur la Fig. 5.22 sont représentées quelques coupes XZ du grain de pollen modélisé à partir d'images réelles de *Poaceae*.

- l'intérieur du pollen (le **cytoplasme**) est peu absorbant ;
- la croûte externe du pollen (l'**exine**) est plus absorbante.

L'objet de référence est représenté sur la Fig. 5.20, colonne de droite.

A l'aide de ces données, nous avons simulé le trajet de la lumière dans le pollen (espace objet éclairé) avant d'appliquer le modèle de flou. Le temps de calcul a été de 4 heures et 20 minutes pour un volume de 200x200x100 images en 256 niveaux de gris (voir l'annexe B pour le fichier de configuration). Pour l'étape de simulation du système optique, le temps de calcul a été de presque 2 heures. Les résultats se trouvent sur la Fig. 5.23 ; sur la

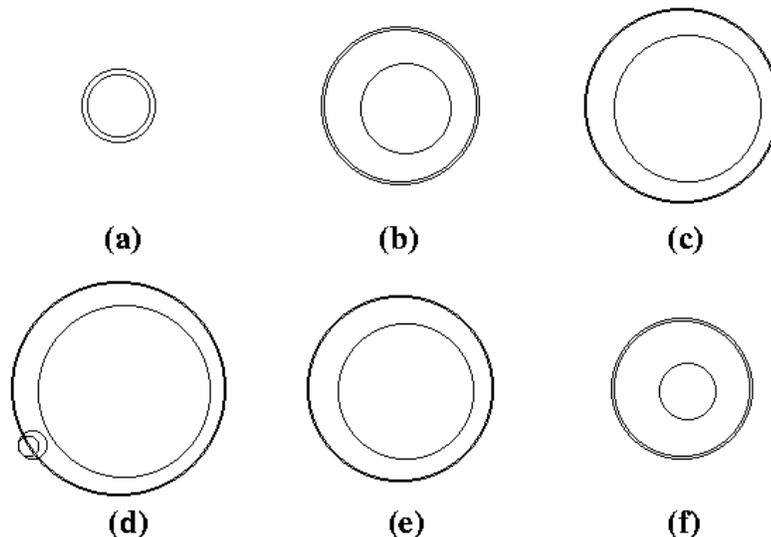


FIG. 5.22 – Quelques coupes  $XY$  de l'objet modélisé 3D. A chaque compartiment créé par les sphères on associe un indice complexe de réfraction (absorption et réfraction). La coupe centrale (avec le pore visible) est représentée sur l'image (d).

colonne de gauche, nous avons répété les résultats de la Fig. 5.20 qui donne les résultats pour un pollen uniquement absorbant. La colonne centrale donne les résultats obtenus avec le modèle prenant en compte la réfraction, et la colonne de droite présente l'objet de référence.

### 5.6.2.2 Pour une séquence d'images

Les résultats présentés dans la colonne centrale de la Fig. 5.23 sont bien meilleurs que ceux de la colonne de gauche. Nous avons résolu le problème de forte diminution de la taille du pollen sur les image (f) et (j) et nous conservons une taille moyenne approximativement constante quelle que soit l'image de la séquence. L'image centrale (h) est la plus nette de la séquence, et on voit apparaître le pore sur presque toutes les images, comme sur les image réelles (k) à (o). Sur les images (i) et (j), la réfraction apparaît comme sur les images (n) et (o) : c'est une zone plus clair qui encercle le cytoplasme du pollen. Sur les images (i) et (j), l'effet de la réfraction est beaucoup plus intense que sur les images (n) et (o) ; ceci est toujours dû au fait que nous travaillons avec des sphères parfaites, exemptes de granules en leur centre qui ont comme effet d'étaler la caustique. A l'extérieur des images du pollen modélisé, le fond est un peu plus grisé qu'en réalité, *i.e.* moins intense.

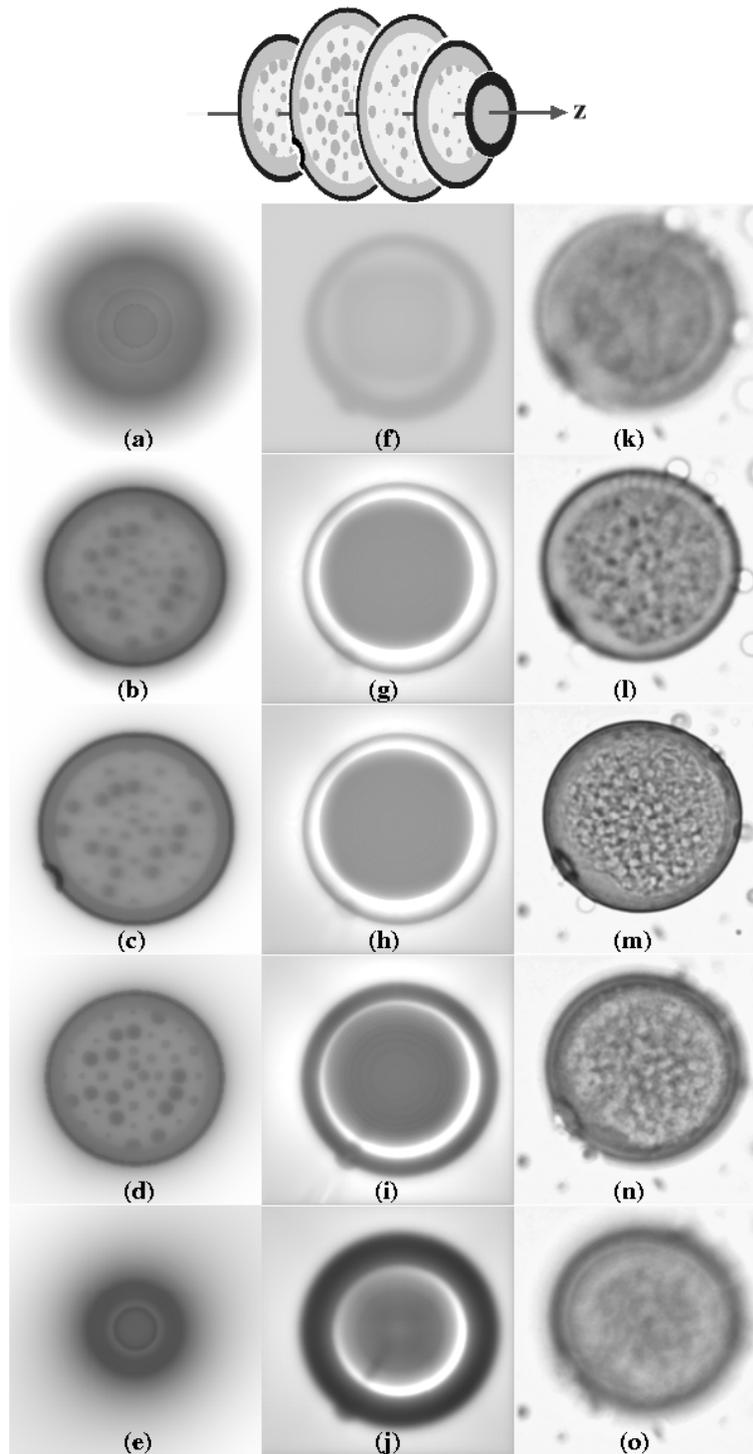


FIG. 5.23 – Les résultats pour le pollen de graminée dans la fuchsine. Son diamètre est de 22  $\mu\text{m}$ . La colonne de gauche représente l'espace image calculé avec le modèle absorbant uniquement (voir Fig. 5.20), la colonne du centre l'espace image calculé avec le modèle prenant en compte la réfraction et la colonne de droite l'espace image réel de référence.

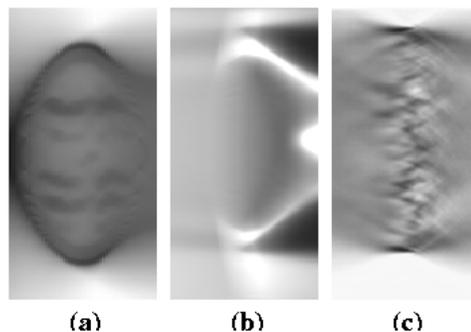


FIG. 5.24 – Résultats de la simulation d'un pollen de graminée vus selon des coupes latérales (XZ). Nous présentons les résultats obtenus (a) en modélisant seulement l'absorption (voir Fig. 5.21), et (b) en modélisant en plus la réfraction. (c) représente la coupe XZ réelle (pollen de Poaceae).

### 5.6.2.3 Sur les vues de côté

Les résultats sur les coupes XZ sont représentés sur la Fig. 5.24. Nous comparons les résultats du modèle complet (avec réfraction, figure (b) au centre) aux résultats du modèle ne prenant pas en compte la réfraction (figure (a)) et aux images réelles (figure (c)). Nous allons uniquement discuter des résultats du modèle complet ; nous retrouvons toujours ce que nous cherchions dans la partie 5.6.1.2, c'est-à-dire une localisation difficile du grain de pollen, des zones sombres aux extrémités du pollen (en haut et en bas sur les images de la Fig. 5.24), et des cônes d'ombre de part et d'autre ; celui qui devait partir sur la gauche a malheureusement disparu, mais sur la droite de la figure (b), nous retrouvons en plus la croix lumineuse qui est due à la réfraction. La pente est la même sur l'image XZ réelle ( $(0.57 \pm 0.20)$  en échelle absolue) que sur l'image XZ calculée ( $(0.62 \pm 0.22)$  en échelle absolue), mais la caustique présente sur la figure (b) est beaucoup plus intense.

### 5.6.2.4 Conclusion

L'introduction du modèle prenant en compte la réfraction améliore de beaucoup les résultats. Le pollen calculé garde une taille constante tout au long de la séquence, et le cytoplasme est plus visible. De plus, la caustique apparaît maintenant sur les images calculées comme en réalité. Elle est peut-être un peu trop intense et nécessiterait une atténuation, par un modèle d'objet moins sphériquement parfait et présentant des granules à l'intérieur. Ceux-ci, absents de la Fig. 5.24 (b), devraient faire apparaître les zones claires puis sombres de la Fig. 5.24 (c).

## 5.7 Conclusion

Nous avons présenté les résultats de notre modèle sur plusieurs types d'objets ; à chaque fois, les images que nous avons calculées sont comparées à des séquences d'images réelles. Nous avons tout d'abord choisi des objets simples, plus faciles à modéliser (partie 5.3), pour terminer avec des objets complexes (partie 5.6), très difficiles à modéliser précisément.

Le modèle dans son ensemble donne de bons résultats, puisque nous simulons avec précisions la réfraction, le flou, et l'étalement latéral de l'objet. Les écarts à la réalité les plus importants apparaissent pour les objets translucides (microbilles et objets complexes). Pour les objets complexes, la simulation est très bonne puisque nous retrouvons sur les images calculées beaucoup de points de comparaison avec les images réelles.

Qualitativement, les résultats semblent excellents, mais quantitativement nous avons noté quelques points à améliorer. Les quelques écarts à la réalité proviennent tout d'abord de l'erreur de modélisation, qui s'accroît avec la complexité de l'objet que nous voulons simuler ; puis le second est dû à la diffraction, que nous n'avons pas modélisée, et qui reste la principale source d'erreur.

Les temps de calculs demeurent assez longs, puisqu'il faut compter en moyenne une dizaine d'heures pour l'étape de ray tracing, et environ la moitié moins pour l'étape de convolution avec le modèle de flou. Ces durées sont valables pour un volume de 256x256x256 pixels et 256 niveaux de gris, avec 1.8 milliards de rayons lumineux en moyenne pour la première phase, et une moyenne estimée à 15 à 20000 convolutions 256x256 pour la seconde phase. La machine de référence est un PC sous Red Hat Linux release 6.1 (Cartman) Kernel 2.4.17, avec un processeur cadencé à 1.2 GHz et 512 Mo de mémoire vive.



## Chapitre 6

# Conclusion générale et perspectives

VOICI le chapitre de conclusion de notre travail. Nous allons tout d'abord conclure de manière générale et présenter les points positifs et les points à améliorer dans notre travail (partie 6.1), puis nous abordons la partie 6.2 qui présente les perspectives d'évolution et d'utilisation de tout ce qui a été présenté dans cette thèse.

### 6.1 Conclusion générale

Dans cet ouvrage, nous avons présenté un nouveau modèle de la formation de l'image pour un objet 3D translucide. C'est un nouveau modèle, car à notre connaissance (voir chapitre 3), il n'y avait aucun travail relatif aux objets translucides ; des travaux traitaient d'objets opaques (voir par exemple la partie 3.4.1) ou bien fluorescents (voir la partie 3.4.4.2).

Ce problème nous a intéressé pour comprendre la formation de l'image dans des objets microscopiques translucides complexes, tels des grains de pollen (voir l'annexe A). Si nos travaux permettent une meilleure compréhension des artefacts présents sur des images de pollens (entre autres), la vision par ordinateur et la reconnaissance sauront se servir des ces données pour parfaire les méthodes de traitement et de comptage automatiques (voir la partie 3.4.2).

Bien-sûr, il reste des points à améliorer pour obtenir un modèle encore plus proche de la réalité, mais un pas certain sera franchi dès que nous arriverons à modéliser facilement des objets plus complexes et non plus composés d'éléments géométriques parfaits. En effet, nous avons vu dans la partie 5.5 que même les microbilles de verre, objets les plus simples et sensés être sphériques, présentaient de forts écarts à la sphéricité. Un écart à la modélisation influence déjà les résultats.

Sur des objets simples, nous simulons avec précision la formation de l'image en prenant

physiquement en compte la réfraction, l'absorption (s'il y a lieu) et le flou. Notre modèle, appliqué à un objet complexe nous a permis de voir que la réfraction de la lumière joue un rôle prépondérant dans la formation de l'image des grains de pollen (partie 5.6.2).

L'objet, lui, est défini de manière physique par des grandeurs comme sa taille, sa répartition d'indices de réfraction et d'absorption. Les interactions de la lumière avec l'objet (réfraction, réflexion, absorption) sont simulées à l'aide de méthodes empruntées au lancer de rayons et plus précisément au *photon mapping*, que nous avons découvert trop tardivement. Le flou est simulé précisément à l'aide d'un modèle d'OTF<sup>1</sup> qui prend comme paramètres des données physiques relatives au système optique à ouverture circulaire. De nombreux systèmes optiques, pas seulement des microscopes, peuvent ainsi être modélisés. La diffraction n'est pas modélisée, et c'est un problème lorsque nous avons des objets trop petits à modéliser : de nombreux écarts à la réalité apparaissent alors. En ce qui concerne la diffusion, nous avons proposé une solution équivalente pour la prendre en compte de manière simple (voir la partie 4.3.3) qui donne de très bons résultats.

Ces travaux seront utilisés dans un projet en vision par ordinateur<sup>2</sup> : les objets seront de fines gouttelettes d'huile en suspension dans un liquide avec lequel elles sont non miscibles. Le sujet s'intéresse à relever en 3D la position et la vitesse de ces particules de taille variable, pour étudier leur répartition volumétrique dans le temps et l'espace. Il faut aussi tenir compte du fait que 2 gouttelettes d'huile qui se percutent se lient pour en créer une plus grosse. Pour cela, la position du point le plus intense de la caustique et la connaissance de la formation de l'image pourront nous donner des critères importants pour le repérage.

## 6.2 Perspectives

Nous proposons maintenant des améliorations au modèle que nous avons présenté. Nous avons proposé plusieurs perspectives en fin des différents chapitres, et nous allons en reprendre quelques unes ici. Ces améliorations peuvent donc concerner différents niveaux du modèle : l'amélioration de la modélisation des objets pour créer plus facilement des objets plus complexes est traitée dans la partie 6.2.1 ; le modèle de création de l'espace objet éclairé en tenant compte de la diffraction ou de la diffusion de manière plus rigoureuse est présenté dans la partie 6.2.2. Pour avoir un modèle de flou plus précis vis-à-vis du microscope, nous proposons finalement dans la partie 6.2.3, une mesure de la PSF plutôt qu'un modèle analytique.

---

1. *Optical Transfer Function* ou Fonction de Transfert Optique en français.

2. Projet commun au Laboratoire de Thermodynamique Expérimentale de l'université de Nice et à l'Agence Spatiale Européenne (E.S.A.).

### 6.2.1 La modélisation d'objets complexes :

Un problème que nous avons rencontré au niveau de la modélisation des objets est que les objets étaient uniquement créés à partir d'objets simples comme des sphères, des cubes ou des plans. Il n'y a aucun moyen de les retoucher après leur création, pour les rendre plus compliqués par exemple. Et s'ils sont plus compliqués, ils sont aussi plus réels. L'idéal serait de récupérer ou de coder une interface de description de scène pouvant exporter des objets décrits dans un langage standard (VRML par exemple), et aussi savoir réexploiter ces données. Ce n'était cependant pas le but de cette thèse, et c'est pour cela que cette idée se retrouve ici, dans les perspectives.

Cette thèse était incluse dans un projet Européen qui s'intéressait aux grains de pollen (voir annexe A) ; nous retrouvons d'ailleurs des résultats sur des grains de pollens dans le chapitre 5. Des travaux très intéressants concernant la modélisation complexe de grains de pollen ont été menés par Boero [Boero 95], au C.E.M.B.R.E.U.<sup>3</sup>. Ils sont représentés sur la Fig. 6.1 : il y a déjà une grande collection de pollens, construite à partir d'images prises au MEB<sup>4</sup>. Il ne resterait plus qu'à décrire ces modèles en termes d'indices complexes de réfraction et d'appliquer notre modèle de lancer de rayons.

### 6.2.2 Modéliser d'autres phénomènes physiques

C'est à ce niveau qu'il faut introduire un modèle de propagation de la lumière plus « ondulatoire » (voir [Kagalwala 00b] par exemple), c'est-à-dire prenant en compte des phénomènes comme la diffraction de la lumière. Pour faire un modèle qui soit physiquement très précis, on peut modéliser plusieurs phénomènes que nous avons modélisé très approximativement (diffusion) ou que nous n'avons pas encore pris en compte (diffraction). Bien sûr, plus le modèle devient compliqué et plus les temps de calcul sont importants, donc on ne peut pas non plus tout implémenter sans conséquence sur les temps de calcul.

#### 6.2.2.1 Modélisation de la diffusion

Dans le chapitre 5, nous avons essayé de modéliser la diffusion de façon détournée, sans passer par les lois de la physique qui auraient nécessité de revoir une grande partie du modèle et qui auraient probablement alourdi les calculs. Nous avons effectivement modélisé la diffusion de la lumière (une perte de lumière) par une absorption équivalente. Dans l'ouvrage de Van de Hulst [v.d. Hulst 81], on trouve l'explication physique de la diffusion de la lumière par des particules<sup>5</sup>, translucides ou non. La théorie de Mie permet effectivement de calculer la diffusion de la lumière pour des particules de l'ordre du micron

---

3. C'est le Centre Européen Médical Bioclimatique de Recherche et d'Enseignement Universitaire. Pour trouver le C.E.M.B.R.E.U. sur l'Internet : [http://cembreu.free.fr/index\\_fr/index\\_fr.html](http://cembreu.free.fr/index_fr/index_fr.html)

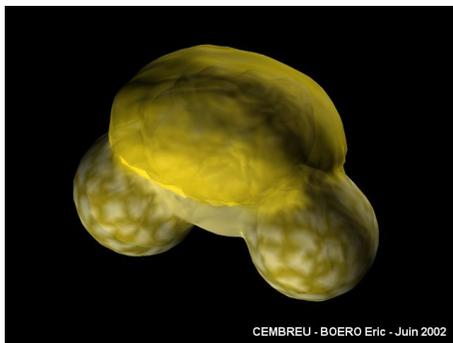
4. Le MEB est le Microscope Electronique à Balayage.

5. Elle est surtout connue par la théorie de Mie.

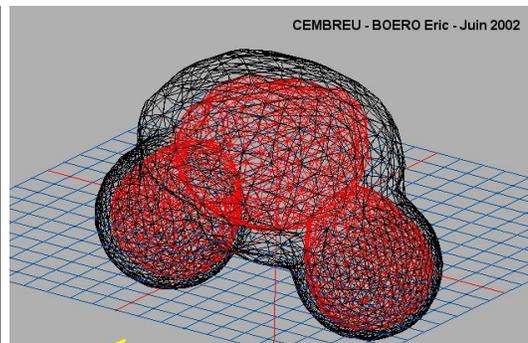
### Pollens Modélisés en 3D



(a) les différents pollens modélisés par le C.E.M.B.R.E.U.



(b) pollen de pin texturé



(c) pollen de pin en fils de fer

FIG. 6.1 – (a) Les pollens modélisés au C.E.M.B.R.E.U. à la fin du printe 2002. Il y a déjà de nombreux grains de pollens différents. (b) Détails d'un pollen de pin avec texture et le même (c) en fils de fer.

ou sub-microniques [Hervé 01]. Pour améliorer notre modèle, il faudrait tenir compte de la diffusion d'une manière plus précise en implémentant une modèle physique.

### 6.2.2.2 Prise en compte de la diffraction

En synthèse d'images, il existe des travaux relatifs à la prise en compte de la diffraction [Aveneau 99] [Tsingos 01]. Aveneau et Mérieux [Aveneau 99] tiennent compte de la diffraction pour faire des rendus de scènes composées de polygones. Ils utilisent une théorie géométrique de la diffraction. Tsingos *et al.* [Tsingos 01] modélisent la diffraction à partir d'une théorie plus élaborée (théorie uniforme de la diffraction), mais ils appliquent leurs travaux à des ondes sonores qui rencontrent des obstacles matériels et anguleux. Ils cherchent à retrouver la source sonore dans un espace 3D présentant des obstacles. En un point, même si la source est géométriquement occultée, l'effet de la diffraction est de permettre la présence de sons. C'est encore une piste qui pourrait être suivie pour rendre le modèle encore plus précis.

### 6.2.3 Mesure de la PSF

Plutôt que de calculer la PSF ou l'OTF, comme nous le faisons ici, il y aurait moyen de la mesurer directement sur le microscope pour la connaître avec plus de précision. La méthode la plus intuitive est de trouver un objet qui simule un point source idéal (représenté par un Dirac) pour ne mesurer que la PSF du microscope. Nous avons pensé à trouver un trou (ou un cache opaque) micrométrique qui puisse être considéré comme ponctuel, mais cela s'est avéré difficile : en partant de l'hypothèse qu'un trou est vu comme « ponctuel » si son diamètre est inférieur à un pixel dans l'image, pour un microscope 20x/0.4, il faudrait que le trou soit de diamètre inférieur à  $0.3 \mu\text{m}$ . Cela pourrait encore sembler possible, mais pour un objectif de 60x/0.8 il faudrait que le trou soit percé avec précision avec un diamètre de  $0.14 \mu\text{m}$  ! Cela est très difficile à réaliser, et les diaphragmes les plus petits que nous avons trouvés ont des diamètres de l'ordre de  $1 \mu\text{m}$ .

Il existe cependant d'autres méthodes [Marchand 64] [Sibarita 92] pour mesurer la PSF : c'est la mesure de la LSF (« *Line Spread Function* », l'équivalent de la PSF à 1D). Elle est calculable relativement facilement dans le cas d'une PSF à symétrie circulaire. Dans [Marchand 64], Marchand donne les techniques mathématiques nécessaires pour déduire la PSF de la LSF. Dans [Sibarita 92], Sibarita reprend clairement ces explications d'un point de vue plus orienté vers l'analyse du signal, et propose une méthode expérimentale pour calculer la LSF ou l'ESF (« *Edge Spread Function* », la fonction de bord, une autre fonction permettant de déduire la PSF). Pour calculer l'ESF, il faut un bord franc, ce qui est plus facile à trouver qu'un trou sub-micronique.

Nous pourrions donc appliquer ces méthodes à nos différents objectifs pour calculer plus précisément la PSF de notre modèle.

### 6.2.4 Le système optique

Les travaux récents de Grossberg et Nayar [Grossberg 01] s'intéressent à développer un modèle général de la formation de l'image qui puisse être utilisé pour représenter un système optique arbitraire. Les systèmes optiques peuvent être aussi variés que des systèmes à une seule caméra ou des systèmes de plusieurs caméras (*clusters*).

L'idée de la modélisation est la suivante : plutôt que de s'intéresser à la formation de l'image en étudiant la propagation de la lumière vers les détecteurs, ils vont étudier ce que voient les détecteurs au total. Un détecteur qui reçoit plusieurs rayons lumineux de différentes sources se voit attribué un équivalent en intensité, et en direction moyenne de propagation.

Cela définit de nouveaux éléments photosensibles **virtuels** qu'ils appellent les *raxels* (*ray elements*) ; ce sont des équivalents mathématiques abstraits aux *pixels* (*picture elements*) qui possèdent leurs propres caractéristiques physiques (luminosité, longueur d'onde) aussi bien que leurs propres propriétés optiques (*e.g.* la réponse impulsionnelle). Un système imageur peut alors être modélisé par un système de *raxels* sur une sphère virtuelle qui entoure le système optique physique.

Utilisant cette modélisation, ils sont capables de calculer les caustiques<sup>6</sup> des systèmes optiques [Swaminathan 01] ; c'est une étape importante dans leur modélisation puisqu'une caustique est le lieu des points de vue le plus adéquats : c'est le mieux adapté à la localisation des *raxels* du système équivalent. Une fois cette calibration effectuée (localisation des caustiques, détermination des *raxels*), ils obtiennent une modélisation précise du système optique. Ce peut être une voie de développement intéressante, puisque de plus, la définition des *raxels* du système et la détermination des caustiques s'apparente grandement avec les techniques de *photon mapping* (voir le paragraphe 3.3.1.2). Notre travail se rapprochant beaucoup lui-aussi de ces techniques, un tel développement aurait un intérêt certain.

### 6.2.5 Réfraction inverse

Après avoir réalisé ces travaux, nous en avons découvert que la séquence d'images d'un objet 3D translucide est très différente de l'objet lui-même. La réfraction qui s'est produite dans l'objet au moment de l'éclairage de l'objet, et le flou qui est apparu lors de l'observation de cet objet ont contribué à cet éloignement objet-image.

Nous avons vu dans la partie qui traitait de déconvolution (partie 3.4.4) que les méthodes pour enlever le flou des images ne manquent pas. Très souvent, en connaissant l'OTF du système il est possible de restaurer une image [Jalobeanu 01] ou une séquence d'images.

Dans le cas d'un objet translucide, le flou est très gênant, mais cela ne suffit pas à

---

6. Zone de l'espace dans laquelle l'intensité lumineuse est la plus forte.

remonter à l'objet, surtout dans le cas de microbilles : la caustique créée par la réfraction et l'absence de lumière dans certaines zones de l'espace objet perturbent encore plus l'observation. Après le flou, ce serait donc la réfraction qu'il faudrait supprimer des images.

Les algorithmes de déconvolution développés pour la microscopie en fluorescence ont été testés sur nos séquences d'images prises avec un microscope optique en lumière blanche. Nous avons pour cela utilisé XCOSM<sup>7</sup> de [Preza 92b] [Markham 01] développé par des biologistes pour enlever le flou d'images en fluorescence. Les résultats n'ont pas été suffisamment probants pour figurer ici. En effet, cette méthode s'intéresse à enlever le flou mais pas enlever les résidus de la réfraction.

Dans le cas général, la réfraction est un phénomène non-linéaire, que l'on ne peut donc pas représenter sous la forme d'une convolution. La façon « ondulatoire » de calculer la propagation d'une onde dans le vide ou à travers un système optique peut se faire à l'aide des formules de Fresnel ; celles-ci se présentent sous la forme d'équations intégrales et donnent l'expression d'une onde en tout points de l'espace.

Existe-t'il ou bien peut-on inventer des méthodes pour remonter à la forme d'un objet à partir de ses caustiques? D'un point de vue ondulatoire, le problème semble compliqué puisque il s'agit d'inverser un problème non-linéaire. D'un point de vue géométrique, cela ne semble pas plus facile étant donné que la caustique est le lieu des points où plusieurs rayons se croisent : il y a donc une grande dégénérescence dans la solution. La sismologie est un domaine de recherche qui doit probablement s'intéresser à ce problème, car les ondes sismiques se réfractent sur les milieux rocheux comme la lumière sur les matériaux translucides.

---

7. Le site Web de XCOSM est le suivant : <http://3dmicroscopy.wustl.edu/~xcosm/>



## Annexe A

# Les grains de pollen comme application

CETTE première annexe a pour but de présenter ce que sont les pollens et les moyens qui sont déployés pour lutter contre les allergies dues aux pollens [Casas 96] [Erdtman 69] [Pollinoses 79]. La science qui s'occupe des pollens est la palynologie. Une définition précise est donnée par Reille [Reille 90] :

*« La palynologie, étymologiquement étude de la poussière, est la science qui s'adresse plus précisément à la poussière végétale que constituent les spores et grains de pollen et vers cette discipline convergent tout un faisceau d'activités scientifiques et pratiques pouvant aller de la géologie et la botanique à la biologie générale et l'agronomie. »*

Les palynologues sont formés à reconnaître les différentes variétés de pollens afin de pouvoir les classer.

### Les grains de pollen

Les grains de pollen sont propres à chaque espèce de plante à fleurs et sont produits par les organes reproducteurs mâles de ces plantes : les étamines. Pour la reproduction, ils doivent être dispersés afin de pouvoir rencontrer l'organe femelle (le pistil) d'une plante de la même espèce. Il existe différents types de dispersion, mais celle qui donne des risques d'allergie est la dispersion par le vent.

### La dispersion des pollens

La dispersion peut se faire de plusieurs façons (via l'eau, l'air ou les insectes), mais on ne va présenter ici que la dispersion anémophile (via l'air), car c'est elle qui remplit l'atmosphère en pollens qui sont potentiellement allergènes ; au moment de la floraison,

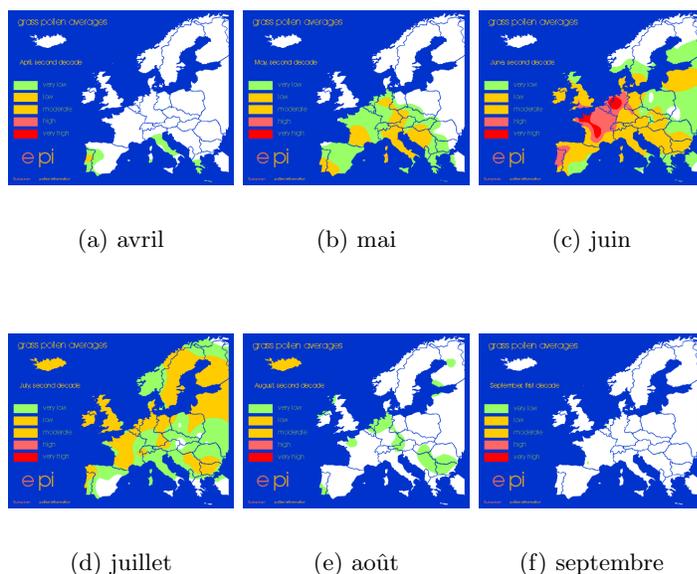


FIG. A.1 – Evolution du taux de pollen de graminées dans l'air.

l'arbre ou la plante produit abondamment des grains de pollen, qui sont destinés à être transportés par le vent. En ce qui concerne la fécondation d'une fleur distante, le caractère très aléatoire de la dispersion est compensé par la production abondante de grains de pollen. Et c'est aussi cette concentration anormale de pollens dans l'air qui va déclencher des allergies. La Fig. A.1 montre l'évolution sur 6 mois de la concentration de l'air en pollen de graminées<sup>1</sup>.

Il faut noter que les pollens les plus allergènes sont ceux des arbres (olivier, cyprès, ...) ou des herbes (pariétaire, graminées, ...). Ces pollens proviennent des fleurs de ces essences, fleurs qui sont généralement très petites. La Fig. A.2 montre un pariétaire<sup>2</sup>, une plante très courante dans le sud de la France mais aussi une des plus allergéniques. A première vue, cette plante ne ressemble qu'à une « mauvaise herbe » comme les autres, mais elle produit un des pollens les plus allergènes.

### La structure générale d'un pollen

Un grain de pollen est un objet tridimensionnel généralement ellipsoïdal en première approximation. Un pollen se compose essentiellement de deux parties distinctes : une carapace extérieure dure, l'**exine**, destinée à protéger le grain des dégradations extérieures (sécheresse, humidité, pollution...) et le cytoplasme, qui contient le matériel de reproduction. L'exine est épaisse de quelques micromètres au plus, sur un grain dont la taille varie de 20

1. Source : *European Pollen Information* (<http://www.cat.at/pollen>)

2. Figure tiré du site Web : <http://ltswww.epfl.ch/~auric/phyto/plantes/parietaire.html>



FIG. A.2 – Nous avons représenté plusieurs détails du pariétaire, dont les fleurs. Le pollen du pariétaire est représenté sur la Fig. A.6 (d).

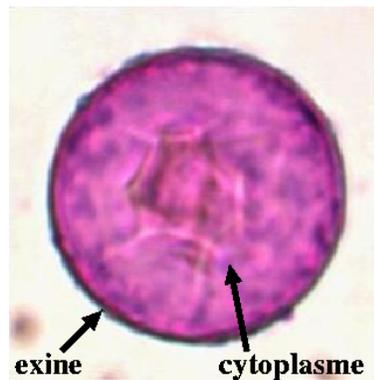


FIG. A.3 – Éléments constitutants principaux d'un grain de pollen (ici, un pollen de cyprès).

à  $60\ \mu\text{m}$ . Elle nous apparaît plus sombre quand on l'observe avec un microscope optique car elle est plus dense (voir Fig. A.3 et A.4).

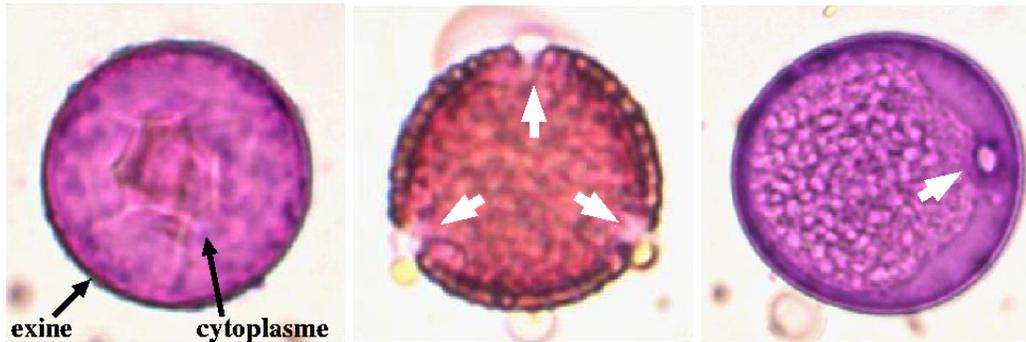
### Les ouvertures d'un grain de pollen

La classification d'un grain de pollen se base avant tout sur la présence ou l'absence d'**ouvertures** à sa surface. Une ouverture peut se présenter de deux façons : un **pore** qui est un trou plutôt circulaire à la surface de l'exine (semblable à un cratère) ou bien un **sillon**, qui est une tranchée creusée à sa surface et qui s'étend d'un pôle<sup>3</sup> à l'autre du pollen. On peut voir des ouvertures mises en évidence sur la Fig. A.4. Pour le pollen central, le pore est entouré d'un anneau sombre que l'on appelle « oncus ».

Si une espèce de pollen présente une ou plusieurs ouvertures, le pollen est dit « ouverturé » ; dans le cas contraire on parle de pollen « inouverturé ». Si le pollen est ouverturé, ses ouvertures (pores et/ou sillons) présentent nécessairement une certaine localisation et une certaine symétrie<sup>4</sup>.

3. On définit les pôles et l'équateur d'un pollen en fonction de ses ouvertures (voir [Reille 90]).

4. Pour une description plus générale des structures de pollen, se reporter à [Pollinoses 79] [Reille 90].

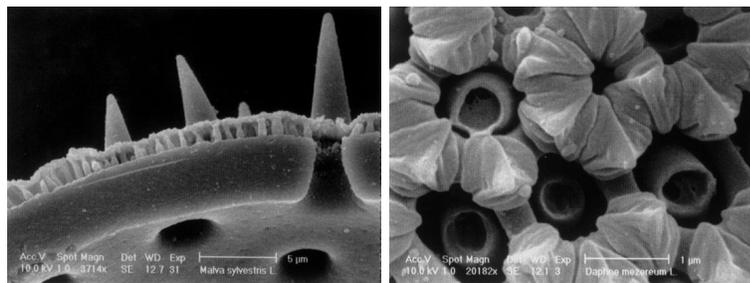


(a) pollen de cyprès - noter le cytoplasme bien visible.

(b) pollen de graminée - le pore est mis en évidence

(c) pollen d'olivier - noter les 3 sillons vus en coupe.

FIG. A.4 – Pollens vus avec un microscope optique ; nous avons mis en évidence plusieurs caractéristiques qui aident les palynologues dans leur tâche de reconnaissance.



(a) coupe de l'exine (on voit la texture en pointe)

(b) détails d'un autre type de texture

FIG. A.5 – Quelques textures de pollen vues au Microscope à Balayage Electronique. Noter leur complexité, extrêmement dure à reproduire pour modéliser un pollen.

### La texture du pollen

Si on s'intéresse de plus près à la surface de l'exine, on s'aperçoit qu'elle est plus ou moins rugueuse et présente une structure fine, propre à chaque espèce : c'est la texture du pollen. Elle présente des détails de l'ordre du micromètre et peut être utilisée pour discriminer les pollens [Cushing 97]. La Fig. A.5 représente deux textures différentes de pollen qui sont observées avec un microscope électronique. La photo de gauche montre une coupe de l'exine.

Nous avons vu dans la partie 3.4.3.2 comment on peut percevoir la texture d'un pollen au microscope à l'aide de la réfraction induite à l'échelle de la texture.

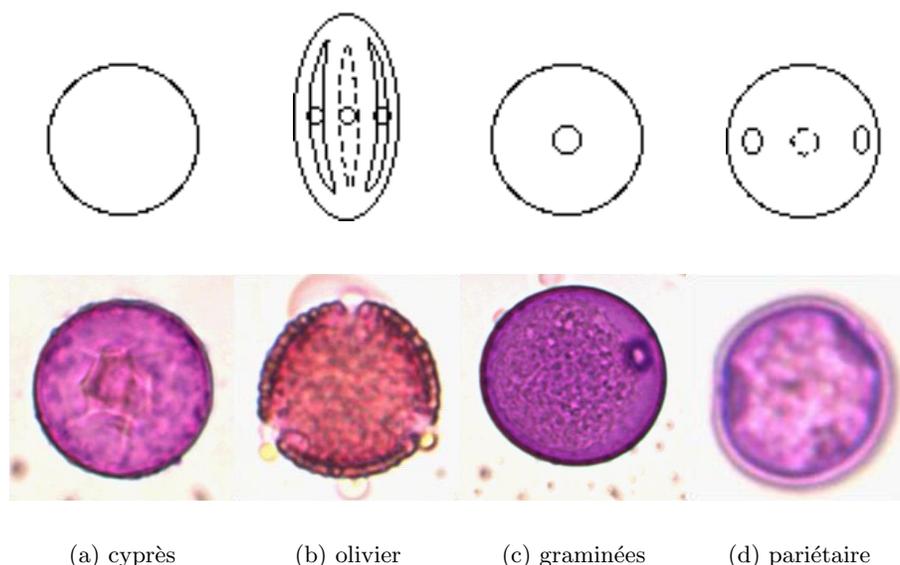


FIG. A.6 – Quatre pollens parmi les plus allergènes et leur forme approximative.

### Quelques grains de pollen étudiés

Nous nous intéresserons surtout dans ce rapport à des pollens allergènes définis dans le projet A.S.T.H.M.A.. Les plus allergènes sont les suivants :

- le **Cupressaceae** (pollen de cyprès) : inaperturé, de 22 à 28.5  $\mu\text{m}$  ;
- l'**Olea** (pollen d'olivier) : tricolpé (3 sillons méridiens équidistants), de 19.5 à 24.5  $\mu\text{m}$  ;
- le **Poaceae** (pollen de graminées) : monoporé (un seul pore), de 28 et 60  $\mu\text{m}$  ;
- l'**Urticaceae** (pollen de pariétaire) : triporé (3 pores équatoriaux équidistants), de 14 à 18  $\mu\text{m}$ .

On a extrait ces ordres de grandeur de [Pollinoses 79] ; on peut observer ces quatre pollens et leur forme approximative sur la Fig. A.6.

### La récupération et l'analyse des pollens

Nous avons déjà abordé ce sujet dans la partie 5.1.1.

### La récolte des pollens

La tâche d'analyse des pollens dans l'atmosphère est déjà quelque peu automatisée : un certain nombre de stations de prélèvement (une quarantaine en France) sont destinées à récolter des échantillons des pollens présents dans l'air. Ces collecteurs sont composés essentiellement d'une buse d'aspiration qui projette l'air sur un tambour cylindrique recouvert d'une bande adhésive, laquelle retient les particules en suspension dans l'atmosphère,

et donc les pollens en particulier. Ce tambour tourne sur lui-même à vitesse constante, de manière à définir une échelle temporelle sur la bande adhésive. C'est cette bande qui est prélevée chaque semaine et traitée afin d'être étudiée au microscope.

### La préparation et le comptage des pollens

Avant d'être observés au microscope, la bande adhésive est placée entre deux morceaux de verre : c'est la **lame**. Sans entrer plus en détail dans sa préparation, on peut juste insister sur le fait que les pollens sont trop translucides pour être observés directement ; il faut leur adjoindre un produit qui les rend plus absorbant à la lumière et qui fait ressortir les détails. Il s'agit de la *fucsine*, un colorant que tous les palynologues emploient et qui donne à l'ensemble une coloration rose. On peut ainsi noter que tous les pollens ne réagissent pas de la même façon à la fucsine : certains l'absorbent avec difficulté tandis que d'autres (olea) l'absorbent trop facilement et deviennent rapidement très opaques. On peut d'ailleurs voir sur les Fig.A.4 et A.6 que le pollen d'olivier est plus opaque et plus rouge que les autres.

La lecture de la lame est effectuée par les palynologues, entraînés à reconnaître les pollens. A l'aide d'un microscope optique, ils classifient et dénombrent les différentes espèces ; ils observent seulement une partie de la bande adhésive car observer la totalité de la bande serait très long du fait de la grande surface à étudier. Ils basent donc leurs observations sur des méthodes statistiques. La région qu'ils parcourent sur la lame a été prévue pour qu'elle soit représentative de l'échantillon tout entier, pour pouvoir ensuite faire une règle de proportionnalité avec la surface de la bande scotch. Il s'agit par exemple d'une région (non connexe) de 15 minutes toutes les 2 heures chaque jour de la semaine.

### La reconnaissance des pollens

La manière dont les palynologues reconnaissent un grain de pollen est très intéressante pour l'étude qui va suivre : après l'avoir localisé, ils focalisent et défocalisent le microscope **à travers** le pollen, de manière à cerner sa **structure tridimensionnelle**. Puisque la visualisation du volume est importante pour la classification d'un pollen « à l'œil », il faut donc se tourner vers une automatisation de la tâche de reconnaissance des pollens se basant sur des techniques intégrant le volume. C'est pour cela qu'il faut d'abord comprendre la formation de l'image d'un objet tridimensionnel et translucide, de manière à pouvoir ensuite s'occuper du problème inverse qui serait la reconstruction 3D de l'objet à partir d'une séquence d'images, ou au moins la recherche de ses caractéristiques en 3D. Il existe un CD-Rom pour aider à l'identification interactive des pollens<sup>5</sup> [CD-ROM 99].

---

5. Le site Web associé est <http://www.inhalix.com.au/airborne.htm>.

## Annexe B

# Fichiers de configuration

AVANT la phase d'éclairage, nous devons définir l'objet qui nous intéresse dans un fichier de configuration. L'objet est défini par son type (*Definition of object*) et le nombre d'objets primaire qui le composent (le nombre de définition d'objet), sa position dans l'espace (*Object coordinates*) et sa géométrie (*Object centre (hole - float - x,y,z), Object radius ...*). Nous définissons aussi la source lumineuse par sa géométrie (*Light matrix centre, size, number of spots,...*) et son intensité (*Light ray intensity*). Pour lutter contre les effets d'*aliasing*, la source lumineuse peut être variable en intensité (*Light ray variation of intensity*) ou en positionnement des points sources primaires (*Light spot variation of origin* ou *Light ray variation of origin*).

### Fichier de configuration pour le diaphragme

Les lignes qui sont en commentaires sont précédées d'un point-virgule ';'.

```

;
; Configuration file for the ray tracing software
;
; Alain Boucher and Nicolas Dey
; 14/03/2002
;

; all coordinates are world coordinates and not result volume coordinates
; (except when defining the result volume itself)

; all numerical parameters are specified for their types and the number of entries

; In case of a 2D world, the x coordinate is not taken into account

Draw rays and objects in colour (otherwise B&W) : false

; available colours are red, green and blue

Light Ray colour (if colour drawings) : red

```

```

Object colour (if colour drawings) : green

Draw objects over the image : false

World volume in 2D only (default is 3D) : false
Add light ray intensities : true
Draw light rays not arriving to the observer : false
Final intensity given for the whole ray path : false

World absorption coefficient (float) : 0.
World refraction index (float) : 1.

;
;
; Definition of spot light matrix (orthogonal to the z axis)
;

; introduce some random variations in rays

; intensity will be intensity +- variation (random)
; variation is between [0. , ray intensity[
Light ray variation of intensity : .1

; spot origin (z) will be origin.z +- variation (random) (once per spot)
Light spot variation of origin (float - each spot) : 50.

Light ray variation of origin (float - each ray) : .5

Light ray intensity (float) : 1

Light matrix centre (float - x,y,z) : 0., 0., -499.
Light matrix size (float - x,y) : 115., 115.
Light matrix number of spots (int - x,y) : 4001, 4001

Light spot cone angle (float) : 4.93, 4.93

Light spot number of rays (int) : 75, 75

; Saturation fixes a maximum threshold to saturate light in the images.
; It is function of light intensity (real saturation is intensity * saturation)

;
;
; Definition of result volume (orthogonal to all axes)
;
; volume size (number of voxels) must be defined. Then, one can choose
; between defining the volume
; 1) by zero and scale or
; 2) by two point coordinates
;

Result volume number of voxels (int - x,y,z) : 320, 320, 500
Result volume scale (float - x,y,z) : 3.0, 3.0, .5

```

Result volume zero point (in volume coord) (float - x,y,z) : 139, 139, 246

```

.....;
;
; Plate with hole
;

```

Definition of object : Hole

Object absorption coefficient (float) : 0.

Object refraction index (float) : 1.

Object coordinates (plate - float - x1,y1,z1,x2,y2,z2) : -500, -500, -3, 500, 500, 3

Object centre (hole - float - x,y,z) : 0, 0, 0

Object radius (hole - float) : 25.

;25 um de RAYON

## Fichier de configuration pour la bille opaque

```

;
; Configuration file for the ray tracing software
;
; Alain Boucher and Nicolas Dey
; 14/03/2002

; all coordinates are world coordinates and not result volume coordinates
; (except when defining the result volume itself)

; all numerical parameters are specified for their types and the number of entries

```

Draw rays and objects in colour (otherwise B&W) : false

; available colours are red, green and blue

Light Ray colour (if colour drawings) : red

Object colour (if colour drawings) : green

Draw objects over the image : false

World volume in 2D only (default is 3D) : false

Add light ray intensities : true

Draw light rays not arriving to the observer : false

Final intensity given for the whole ray path : false

World absorption coefficient (float) : 0.

World refraction index (float) : 1.0003

```

.....;
;

```

```

; Definition of spot light matrix (orthogonal to the z axis)
;

; introduce some random variations in rays

; intensity will be intensity +- variation (random)
; variation is between [0. , ray intensity[
Light ray variation of intensity : .1

; spot origin (z) will be origin.z +- variation (random) (once per spot)
Light spot variation of origin (float - each spot) : .1

Light ray intensity (float) : 1

Light matrix centre (float - x,y,z) : 0., 0., -600.
Light matrix size (float - x,y) : 400., 400.
Light matrix number of spots (int - x,y) : 4000, 4000

Light spot cone angle (float) : 4.93, 4.93

Light spot number of rays (int) : 300,300

;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;
;
; Definition of result volume (orthogonal to all axes)
;
; volume size (number of voxels) must be defined. Then, one can choose
; between defining the volume
; 1) by zero and scale or
; 2) by two point coordinates
;

Result volume number of voxels (int - x,y,z) : 128, 128, 500
Result volume scale (float - x,y,z) : 5.4, 5.4, 4
Result volume zero point (in volume coord) (float - x,y,z) : 70, 70, 266

;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;
;
; Definition of objects
;
; If the refraction coefficient is zero (0), then the object is considered
; as opaque (it stops the light rays).
; If the absorption coefficient is negative, then the object is considered
; as totally reflectant.
;
;
;

;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;
;
; Sphere
;

Definition of object : Sphere

```

Object absorption coefficient (float): 0.

Object refraction index (float): 0.

Object centre (float - x,y,z): 0, 0, 0

Object radius (float): 2.0

## Fichier de configuration pour la bille translucide de diamètre $63\mu m$

```

;
; Configuration file for the ray tracing software
;
; Alain Boucher and Nicolas Dey
; 14/03/2002
;

Draw rays and objects in colour (otherwise B&W): false

; available colours are red, green and blue

Light Ray colour (if colour drawings): red
Object colour (if colour drawings): green

Draw objects over the image: false

World volume in 2D only (default is 3D): false
Add light ray intensities: true
Draw light rays not arriving to the observer: false
Final intensity given for the whole ray path: true

World absorption coefficient (float): 0.
World refraction index (float): 1.002

;
; .....,
;
; Definition of spot light matrix (orthogonal to the z axis)
;
;
; introduce some random variations in rays

; intensity will be intensity +- variation (random)
; variation is between [0. , ray intensity[
;Light ray variation of intensity: .05

; spot origin (z) will be origin.z +- variation (random) (once per spot)
;Light spot variation of origin (float - each spot): .1

; ray vector (z) will be vector.z +- variation (random) (once per ray)

```



Object centre (float - x,y,z): 0, 0, 0  
 Object radius (float): 31.5;63/2

## Fichier de configuration pour la bille translucide de diamètre 27 $\mu$ m

```

;
; Configuration file for the ray tracing software
;
; Alain Boucher and Nicolas Dey
; 14/03/2002
;

; all coordinates are world coordinates and not result volume coordinates
; (except when defining the result volume itself)

; all numerical parameters are specified for their types and the number of entries

Draw rays and objects in colour (otherwise B&W): false

; available colours are red, green and blue

Light Ray colour (if colour drawings): red
Object colour (if colour drawings): green

Draw objects over the image: false

World volume in 2D only (default is 3D): false
Add light ray intensities: true
Draw light rays not arriving to the observer: false
Final intensity given for the whole ray path: true

World absorption coefficient (float): 0.
World refraction index (float): 1.0003

.....
;
; Definition of spot light matrix (orthogonal to the z axis)
;

; introduce some random variations in rays

; intensity will be intensity +- variation (random)
; variation is between [0. , ray intensity[
;Light ray variation of intensity: .05

; spot origin (z) will be origin.z +- variation (random) (once per spot)
;Light spot variation of origin (float - each spot): .1

```



Object refraction index (float): 1.52  
 Object centre (float - x,y,z): 0, 0, 0  
 Object radius (float): 13.3;26.6/2: rayon

## Fichier de configuration pour la bille translucide dans la fu- chine

```

;
; Configuration file for the ray tracing software
;
; Alain Boucher and Nicolas Dey
; 14/03/2002
;

; all coordinates are world coordinates and not result volume coordinates
; (except when defining the result volume itself)

; all numerical parameters are specified for their types and the number of entries

Draw rays and objects in colour (otherwise B&W): false

; available colours are red, green and blue

Light Ray colour (if colour drawings): red
Object colour (if colour drawings): green

Draw objects over the image: false

World volume in 2D only (default is 3D): false
Add light ray intensities: true
Draw light rays not arriving to the observer: false
Final intensity given for the whole ray path: true

World absorption coefficient (float): 0.0001
World refraction index (float): 1.4

;
; .....,.....
;
; Definition of spot light matrix (orthogonal to the z axis)
;
;
; introduce some random variations in rays

; intensity will be intensity +- variation (random)
; variation is between [0. , ray intensity[
Light ray variation of intensity: .05

; spot origin (z) will be origin.z +- variation (random) (once per spot)

```



Definition of object : Sphere

Object absorption coefficient (float) : 0.007

Object refraction index (float) : 1.52

Object centre (float - x,y,z) : 0, 0, 0

Object radius (float) : 8.3;16.8/2

## Fichier de configuration pour le modèle de pollen

```

;
; Configuration file for the ray tracing software
;
; Alain Boucher and Nicolas Dey
; 14/03/2002

; all coordinates are world coordinates and not result volume coordinates
; (except when defining the result volume itself)

; all numerical parameters are specified for their types and the number of entries

Draw rays and objects in colour (otherwise B&W) : false

; available colours are red, green and blue

Light Ray colour (if colour drawings) : red
Object colour (if colour drawings) : green

Draw objects over the image : false

World volume in 2D only (default is 3D) : false

Add light ray intensities : true
Draw light rays not arriving to the observer : false
Final intensity given for the whole ray path : true

World absorption coefficient (float) : 0.
World refraction index (float) : 1.46 ;fuchine

.....
;
; Definition of spot light matrix (orthogonal to the z axis)
;
; introduce some random variations in rays

; intensity will be intensity +- variation (random)
; variation is between [0. , ray intensity[
;Light ray variation of intensity : .01

```



; Sphere: EXTERIEURE: centre  
; TRES absorbant +

Definition of object: Sphere

Object absorption coefficient (float): 0.007  
Object refraction index (float): 1.55

Object centre (float - x,y,z): 0, 0, 0  
Object radius (float): 11

;;

;  
; Sphere: INTERIEURE: centree  
;: PEU absorbant 0

Definition of object: Sphere

Object absorption coefficient (float): 0.007  
Object refraction index (float): 1.55

Object centre (float - x,y,z): 0, 0, 0  
Object radius (float): 10.8

;;

;  
; Sphere: CYTOPLASME: legerement decentree  
;: PAS absorbant -

Definition of object: Sphere

Object absorption coefficient (float): 0.0  
Object refraction index (float): 1.33

Object centre (float - x,y,z): .5, -.35, 0  
Object radius (float): 8.8

;;

;  
; Sphere: PORE EXT.  
; TRES absorbant +

Definition of object: Sphere

Object absorption coefficient (float): 0.007  
Object refraction index (float): 1.55

Object centre (float - x,y,z): -8.7, 5.7, 0

Object radius (float) : 1.5

;No intersection inside object : true

```
.....  
;  
; Sphere: PORE INT.  
; NON absorbant
```

Definition of object : Sphere

Object absorption coefficient (float) : 0.

Object refraction index (float) : 1.46

Object centre (float - x,y,z) : -9.1, 5.9, 0

Object radius (float) : 1.1

No intersection inside object : true

# Bibliographie

- [Agard 83] Agard (D.A.) et Sedat (J.W.). – Three-dimensional architecture of a polytene nucleus. *Nature*, vol. 302, avril 1983, pages 676–681.
- [Agard 84a] Agard (D.A.). – Optical sectioning microscopy. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, vol. 13, 1984, pages 191–219.
- [Agard 84b] Agard (D.A.). – Optical sectioning microscopy: Cellular architecture in three dimensions. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, vol. 13, 1984, pages 191–219.
- [Agard 89] Agard (D.A.), Hiraoka (Y.), Shaw (P.) et Sedat (J.W.). – Fluorescence microscopy in three dimensions. *Methods Cell Biol.*, vol. 30, 1989, pages 353–377.
- [ASTHMA 98] Technical annexe. *In: European Project A.S.T.H.M.A.* – European Commission DGXII - 4th Framework Programme for Research, Technological Development, and Demonstration in the Field of Environment and Climate, 1998.
- [Avenueau 99] Avenueau (L.) et Mériaux (M.). – Rendering polygonal scenes with diffraction account. *In: Proceedings of International Conference in Central Europe on Computer Graphics, Visualization and Interactive Digital Media WSCG'99.*
- [Baker 92] Editor (L.Baker). – *Selected papers on: Effects of Aberrations in Optical Imaging.* – SPIE Milestone Series, Volume MS 59, Optical Engineering Press, 1992.
- [Bechar 97] Bechar (A.), Gan-Mor (S.), Vaknin (Y.), Shmulevich (I.), Ronen (B.) et Eiskowitch (D.). – An image-analysis technique for accurate counting of pollen on stigmas. *New Phytologist*, no137, 1997, pages 639–643.
- [Benyon 99] Benyon (F.H.L.), Jones (A.S.), Tovey (E.R.) et Stone (G.). – Differentiation of allergenic fungal spores by image analysis, with application to aerobiological counts. *Aerobiologia*, no15, 1999, pages 211–223.
- [Bianco 89] Bianco (B.) et Diaspro (A.). – Analysis of three-dimensional cell imaging obtained with optical microscopy based on defocusing. *Cell Biophysics*, vol. 15, 1989, pages 189–199.
- [Boddeke 94] Boddeke (F.R.), van Vliet (L.J.), Netten (H.) et Young (I.T.). – Autofocusing in microscopy based on the otf and sampling. *Bioimaging*, no2, 1994, pages 193–203.
- [Boddeke 99] Boddeke (F.R.). – *Quantitative Fluorescence Microscopy.* – Thèse de Doctorat, Technische Universiteit Delft - Hollande, janvier 1999.
- [Boero 95] Boero (Eric). – Compter les pollens en suspension dans l'air - pourquoi et comment, juin 1995.
- [Bonton 01] Bonton (P.), Boucher (A.), Thonnat (M.), Tomczak (R.), Hidalgo (P.), Belmonte (J.) et Galan (C.). – Colour image in microscopy 2d and 3d for the automation of pollen rates measurement. *In: 8th European Congress for Stereology and Image Analysis.*
- [Bonton 02] Bonton (P.), Boucher (A.), Thonnat (M.), Tomczak (R.), Hidalgo (J.), Belmonte (J.) et Galan (C.). – Development of a semi-automatic system for pollen recognition. *Aerobiologia*, 2002.

- [Born 99] Born (Max) et Wolf (Emil). – *Principles of Optics*. – Cambridge University Press, 1999, 7th (expanded) édition.
- [Boucher 02] Boucher (A.) et Thonnat (M.). – Object recognition from 3D blurred images. *In: Proceedings of ICPR (ICPR'02)*.
- [Bove 93] Bove (V. Michael Jr.). – Entropy-based depth from focus. *Journal of Optical Society of America A*, vol. 10, n° 4, avril 1993, pages 561–566.
- [Brakenhoff 93] Brakenhoff (G.J.) et Visscher (K.). – Imaging modes for bilateral confocal scanning microscopy. *Journal of Microscopy*, vol. 171, juillet 1993, pages 17–26.
- [Carlson 90] Carlson (K.). – Scanning and detection techniques used in a confocal scanning microscope. *Journal of Microscopy*, vol. 157, janvier 1990, pages 21–27.
- [Carrington 87] Carrington (W.) et Fogarty (K.E.). – 3-d molecular distribution in living cells by deconvolution of optical sections using light microscopy. *In: Proceedings of Northeast Bioengineering Conference*, pages 108–111.
- [Carrington 90] Carrington (W.A.). – Image restoration in 3d microscopy with limited data. *Bioimaging and Two-Dimensional Spectroscopy*, vol. 1205, 1990, pages 72–83.
- [Casas 96] Casas (Cristina), Márquez (Jesús), SuárezCervera (María) et Seoane-Camba (Juan A.). – Immunocytochemical localization of allergenic proteins in paritaria jdaica l. (urticaceae) pollen grains. *Journal of Cell Biology*, no70, juin 1996, pages 179–188.
- [Castleman 96] Castleman (K.R.). – *Digital Image Processing*. – Prentice Hall, 1996.
- [CD-ROM 99] Hjelmroos (M.), Benyon (F.), Culliver (S.), Jones (A.S.) et Tovey (E.). – *Airborne Allergens: Interactive Identification of Allergenic Pollen and Fungal Spores*. – Institute of Respiratory Medicine Limited, 1999.
- [Chiu 79] Chiu (M.Y.), Barrett (H.H.), Simpson (R.G.), Chou (C.), Arendt (J.W.) et Gindi (G.R.). – Three-dimensional radiographic imaging with a restricted view angle. *JOSA*, vol. 69, n° 10, 1979, pages 1323–1333.
- [Cook 84] Cook (R.L.), Porter (T.) et Carpenter (L.). – Distributed ray tracing. *In: Proceedings of SIGGRAPH'84*, pages 137–145.
- [Cushing 96] Cushing (E.J.). – Choosing a microscope for counting pollen and spores. *The Pollen Monitor*, septembre 1996.
- [Cushing 97] Cushing (E.J.). – Bumps or pits. *The Pollen Monitor*, février 1997.
- [De 55] De (M.). – The influence of astigmatism on the response function of an optical system. *Proceedings of the Royal Society of London Serie A*, vol. 233, avril 1955, pages 91–104.
- [Deschênes 00] Deschênes (F.), Ziou (D.) et Fuchs (P.). – *Enhanced depth from defocus estimation: tolerance to spatial displacements*. – Rapport technique n256, Université de Sherbrooke, août 2000.
- [Deschênes 02] Deschênes (F.). – *Estimation Simultanée et Coopérative d'Indices Visuels de Profondeur pour la Perception Tridimensionnelle*. – Thèse de Doctorat, Université de Sherbrooke - Québec - Canada, juillet 2002.
- [Dey 99] Dey (Nicolas). – *Analyse de la Forme de Grains de Pollen à partir de Plusieurs Plans Image*. – Toulouse, Rapport de DEA, E.N.S.A.E. (Sup'Aero), septembre 1999.
- [Dey 01] Dey (Nicolas), Boucher (Alain) et Thonnat (Monique). – Modélisation et étude de la formation de l'image d'un objet 3d translucide. *In: Actes du deuxième colloque francophone Méthodes et Techniques Optiques pour l'Industrie*. SFO, pages 75–80.
- [Dey 02a] Dey (Nicolas), Boucher (Alain) et Thonnat (Monique). – Image formation model of 3-d translucent object observed in light microscopy. *In: Proceedings of ICIP'02*, pages 469–472.

- [Dey 02b] Dey (Nicolas), Boucher (Alain), Thonnat (Monique) et Sylvain (Jean-Denis). – Etude et modélisation de la formation de l'image d'un objet 3d translucide. *In: Actes du Troisième colloque francophone Méthodes et Techniques Optiques pour l'Industrie*. SFO, pages 182–188.
- [Diaspro 90] Diaspro (A.), Sartore (M.) et Nicolini (C.). – 3d representation of biostructures imaged with an optical microscope. *Technical Report of CUCS*, vol. 8, n° 2, mai 1990, pages 130–141.
- [Draaijer 93] Draaijer (A.) et Houpt (P.M.). – *Electronic Light Microscopy*. – Wiley-Liss, Inc., 1993.
- [du Buf 99] du Buf (H.), Bayer (M.), Droop (S.), Head (R.), Juggins (S.), Fischer (S.), Bunke (H.), Roerdink (M. Wilkinson J.), Pech-Pacheco (J.), Cristóbal (G.), Shahbazkia (H.) et Ciobanu (A.). – Diatom identification: a double challenge called ADIAC. *In: Proceedings 10th International Conference on Image Analysis and Processing (ICIAP'99)*, pages 734–739.
- [Ens 93] Ens (J.) et Lawrence (P.). – An investigation of methods for determining depth from focus. *IEEE Trans. Patt. Anal. Mach. Int.*, vol. 15, n° 2, février 1993, pages 97–107.
- [Erdtman 69] Erdtman (G.). – *Handbook of Palynology: An Introduction to the Study of Pollen Grains and Spores*. – Munksgaard, 1969.
- [Erhardt 85] Erhardt (A.), Zinser (G.), Komitowski (D.) et Bille (J.). – Reconstructing 3-d light-microscopic images by digital image processing. *Applied Optics*, vol. 24, n° 2, janvier 1985, pages 194–200.
- [Fay 89] Fay (F.S.), Carrington (W.) et Fogarty (K.E.). – Three-dimensional molecular distribution in single cells analysed using the digital imaging microscope. *Journal of Microscopy*, vol. 153, février 1989, pages 133–149.
- [Fearing 96] Fearing (P.). – Importance ordering for real-time depth of field. *In: Proceedings of the third International Conference on Computer Science*, pages 372–380.
- [Feynman 98] Feynman (R.P.). – *Mécanique 2*. – Dunod, 1998.
- [FitzGerrel 97] FitzGerrel (Alan R.), Dowski (Edward R.) et Cathey (W. Thomas). – Defocus transfer function for circularly symmetric pupils. *Applied Optics*, vol. 36, n° 23, août 1997, pages 5796–5804.
- [Frieden 67] Frieden (B.R.). – Optical transfer of the three-dimensional object. *Journal of Optical Society of America*, vol. 57, n° 1, janvier 1967, pages 56–66.
- [Geusebroek 00] Geusebroek (J.-M.), Cornelissen (F.), Smeulders (A.W.M.) et Geerts (H.). – Robust autofocus in microscopy. *Cytometry*, vol. 39, n° 1, 2000, pages 1–9.
- [Gibson 89] Gibson (S.F.) et Lanni (F.). – Diffraction by a circular aperture as a model for three-dimensional optical microscopy. *Journal of Optical Society of America A*, vol. 6, n° 9, septembre 1989, pages 1357–1367.
- [Goodman 68] Goodman (J. W.). – *Introduction to Fourier Optics*. – McGraw-Hill Book Company, 1968.
- [Grossberg 01] Grossberg (Michael D.) et Nayar (Shree K.). – A general imaging model and a method for finding its parameters. *In: Proceedings of ICCV (ICCV'01)*.
- [Häusler 72] Häusler (G.). – A method to increase the depth of focus by two step image processing. *Optics Communications*, vol. 6, n° 1, septembre 1972, pages 38–42.
- [Häusler 84] Häusler (G.) et Körner (E.). – Letters to the editor: Simple focusing criterion. *Applied Optics*, vol. 23, n° 15, 1984, pages 2468–2469.
- [Heidrich 97] Heidrich (Wolfgang), Slusallek (Philipp) et Seidel (Hans-Peter). – An image-based model for realistic lens systems in interactive computer graphics. *In: Proceedings of Graphics Interface'97*, pages 68–75.

- [Hervé 01] Hervé (P.) et Hou (F.). – Granulométrie de particules submicronique par analyse de la polarisation d'un rayonnement diffus. *In: Actes du deuxième colloque francophone Méthodes et Techniques Optiques pour l'Industrie*. SFO, pages 59–64.
- [Hidalgo 02] Hidalgo (Pablo J.), Mangin (Antoine), Galán (Carmen), Hembise (Odile), Vásquez (Luis M.) et Sanchez (Oscar). – An automated system for surveying and forecasting *Olea* pollen dispersion. *Aerobiologia*, no18, 2002, pages 23–31.
- [Hiraoka 90] Hiraoka (Y.), Sedat (J.W.) et Agard (D.A.). – Determination of three-dimensional imaging properties of a light microscope system. *Biophys. J.*, vol. 57, février 1990, pages 325–333.
- [Hönig 96] Hönig (Johannes), Heit (Bernard) et brémont (Jacques). – Visual depth perception based on optical blur. *In: Proceedings of International Conference on Image Processing (ICIP'96)*, pages 721–724.
- [Hopkins 55] Hopkins (H.H.). – The frequency response of a defocused optical system. *Proceedings of the Royal Society of London Serie A*, vol. 231, février 1955, pages 91–103.
- [Hopkins 84] Hopkins (H.H.). – Image shift, phase distortion and the optical transfer function. *Optica Acta*, vol. 31, n° 3, mars 1984, pages 345–368.
- [Horii 92] Horii (A.). – Depth from defocusing. *In: Proceedings of ISRN KTH*.
- [Horn 86] Horn (B.K.P.). – *Robot Vision*. – The MIT Press, 1986.
- [Horn 89] Horn (B.K.P.) et Brooks (M.J.). – *Shape from Shading*. – The MIT Press, 1989.
- [Itoh 89] Itoh (K.), Hayashi (A.) et Ichioka (Y.). – Digitalized optical microscopy with extended depth of field. *Applied Optics*, vol. 28, n° 15, août 1989, pages 3487–3493.
- [Jähne 99] Jähne (B.), Haußecker (H.) et Geißler (P.). – *Handbook of Computer Vision and Applications*. – Academic Press, 1999.
- [Jalobeanu 01] Jalobeanu (A.), Kingsbury (N.) et Zerubia (J.). – Image deconvolution using hidden markov tree modeling of complex wavelet packets. *In: Proceedings of ICIP'01*.
- [Jensen 95] Jensen (Henrik Wann) et Christensen (Niels Jorgen). – Photon maps in bidirectional monte carlo ray tracing of complex objects. *Computers & Graphics*, vol. 19, n° 2, mars 1995, pages 215–224.
- [Jensen 01a] Jensen (H.W.), Marschner (S.R.), Levoy (M.) et Hanrahan (P.). – A practical model for subsurface light transport. *In: Proceedings of SIGGRAPH'01*, pages 511–518.
- [Jensen 01b] Jensen (H.W.), Marschner (S.R.), Levoy (M.) et Hanrahan (P.). – *Realistic Image Synthesis Using Photon Mapping*. – A.K. Peters Ltd., 2001.
- [Kagalwala 98] Kagalwala (Farhana) et Kanade (Takeo). – Computational model of image formation process in DIC microscopy. *In: Proceedings of Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy V*. pages 193–204. – Bellingham, Washington, janvier 1998.
- [Kagalwala 99a] Kagalwala (F.) et Kanade (T.). – Simulating dic microscope images: From physical to a computational model. *In: Proceedings of Workshop on Photometric Modelling in Computer Vision and Graphics*, éd. par Society (IEEE Computer), pages 48–55.
- [Kagalwala 99b] Kagalwala (F.), Lanni (F.) et Kanade (T.). – Computational model of dic microscopy for reconstructing 3-d specimens. *In: Proceedings of Workshop on Bio-Signal Analysis*, éd. par Society (IEEE EMB), pages 334–337.
- [Kagalwala 00a] Kagalwala (F.) et Kanade (T.). – Reconstructing specimens using dic microscope images. *In: Proceedings of 2000 IEEE Symposium on Bio-Informatics and Biomedical Engineering*, pages 307–315.

- [Kagalwala 00b] Kagalwala (F.), Lanni (F.) et Kanade (T.). – Computational model of DIC microscopy for reconstructing 3D specimens. *Methods of Information in Medicine*, février 2000, pages 105–109.
- [Kaufhold 98] Kaufhold (J.) et Karl (W.C.). – A nonparametric defocus-based approach to reconstructing thin 3d structures in optical sectioning microscopy. *In: Proceedings of ICIP'98*.
- [Kimura 89] Kimura (S.) et Munakata (C.). – Calculation of a three-dimensional optical transfer function for a confocal scanning fluorescent microscope. *Journal of Optical Society of America A*, vol. 6, n° 7, juillet 1989, pages 1015–1019.
- [Kolb 95] Kolb (C.), Mitchell (D.) et Hanrahan (P.). – A realistic camera model for computer graphics. *Journal of Computer Graphics Proceedings*, août 1995, pages 317–324.
- [Koshy 90] Koshy (M.), Agard (D.A.) et Sedat (J.W.). – Solution of toeplitz systems for the restoration of 3-d optical sectioning microscopy data. *Bioimaging and Two-Dimensional Spectroscopy*, vol. 1205, 1990, pages 64–71.
- [Lam 00] Lam (Edmund Y.) et Goodman (Joseph W.). – Iterative statistical approach to blind image deconvolution. *Journal of Optical Society of America A*, vol. 17, n° 7, juillet 2000, pages 1177–1184.
- [Laub 85] Laub (G.A.), Lenz (G.) et Reinhardt (E.R.). – Three-dimensional object representation in imaging systems. *Optical Engineering*, vol. 24, n° 5, septembre 1985, pages 901–905.
- [Laurent 92] Laurent (M.), Johannin (G.), Guyader (H. Le) et Fleury (A.). – Confocal scanning optical microscopy and three-dimensional imaging. *Biologie Cellulaire*, vol. 76, 1992, pages 113–124.
- [Lee 90] Lee (H.C.). – Review of image-blur models in a photographic system using the principles of optics. *Optical Engineering*, vol. 29, n° 5, mai 1990, pages 405–421.
- [Macias-Garza 89] Macias-Garza (F.), Diller (K.R.), Bovik (A.C.), Aggarwal (S.J.) et Aggarwal (J.K.). – Improvement in the resolution of three-dimensional data sets collected using optical serial sectioning. *Journal of Microscopy*, vol. 153, février 1989, pages 205–221.
- [Mahajan 94] Editor (V.N. Mahajan). – *Selected papers on: Effects of Aberrations in Optical Imaging*. – SPIE Milestone Series, Volume MS 74, Optical Engineering Press, 1994.
- [Marchand 64] Marchand (E.W.). – Derivation of the point spread function from the line spread function. *JOSA*, vol. 54, juillet 1964, pages 915–919.
- [Markham 01] Markham (J.) et Conchello (J.-A.). – Fast maximum-likelihood image-restoration algorithms for three-dimensional fluorescence microscopy. *Journal of Optical Society of America A*, vol. 18, n° 5, 2001, pages 1062–1071.
- [Mazière 97] Mazière (M.). – Etude de faisabilité pour la reconnaissance automatique de grains de pollens, juin 1997.
- [McNally 94] McNally (J.G.), Preza (C.), Conchello (J.-A.) et Thomas (L.J. Jr.). – Artifacts in computational optical-sectioning microscopy. *Journal of Optical Society of America A*, vol. 11, n° 3, mars 1994, pages 1056–1067.
- [Nayar 94] Nayar (S.K.) et Nakagawa (Y.). – Shape from focus. *IEEE Trans. Patt. Anal. Mach. Int.*, vol. 16, n° 8, août 1994, pages 824–831.
- [Nayar 95] Nayar (S.K.), Watanabe (M.) et Noguchi (M.). – Real-time focus range sensor. *IEEE International Conference on Computer Vision*, juin 1995, pages 995–1001.
- [Nguyen 00] Nguyen (N.T.). – Expérimentation de techniques d'apprentissage pour la reconnaissance automatique des grains de pollen, octobre 2000.

- [Noguchi 94] Noguchi (M.) et Nayar (S.K.). – Microscopic shape from focus using active illumination. *In: Proceedings of ICPR (ICPR'94)*, pages 68–73.
- [Num.Rec. 93] Press (W.H.), Teukolsky (S.A.), Vetterling (W.T.) et Flannery (B.P.). – *Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing*. – Cambridge University Press, janvier 1993, 2nd édition.
- [Pentland 87] Pentland (A.P.). – A new sense for depth of field. *IEEE Trans. Patt. Anal. Mach. Int.*, vol. 9, n° 4, juillet 1987, pages 523–531.
- [Perez 95] Perez (J.-Ph.). – *Optique Géométrique et Ondulatoire*. – Masson Editeur, 1995.
- [Pieper 83] Pieper (R.J.) et Korpel (A.). – Image processing for extended depth of field. *Applied Optics*, vol. 22, n° 10, mai 1983, pages 1449–1453.
- [Pollinoses 79] *Les Pollinoses*. – Laboratoire FISIONS, 1979.
- [Poon 87] Poon (T.-C.) et Motamedi (M.). – Optical/digital incoherent image processing for an extended depth of field. *Applied Optics*, vol. 26, n° 21, novembre 1987, pages 4612–4615.
- [POV-Ray 99] POV-Team. – *Persistence of Vision Ray-Tracer*. – User's Documentation, mai 1999.
- [Preza 92a] Preza (C.), Miller (M.I.), Thomas (L.J. Jr.) et McNally (J.G.). – Regularized linear method for reconstruction of three-dimensional microscopic objects from optical sections. *Journal of Optical Society of America A*, vol. 9, n° 2, février 1992, pages 219–228.
- [Preza 92b] Preza (C.), Ollinger (J.M.), McNally (J.G.) et Thomas (L.J. Jr.). – Point-spread sensitivity analysis for computational optical-sectioning microscopy. *Micron Microsc. Acta*, vol. 23, 1992, pages 501–513.
- [Pudney 94] Pudney (Chris), Kovesi (Peter) et Stretch (David). – Surface detection using local energy for 3d confocal microscope images. *In: Proceedings of Image Analysis'94*, pages 68–73.
- [Rajagopalan 97a] Rajagopalan (A.N.) et Chaudhuri (S.). – Space-variant approaches to recovery of depth from defocused images. *Computer Vision and Image Understanding*, vol. 68, n° 3, décembre 1997, pages 309–329.
- [Rajagopalan 97b] Rajagopalan (A.N.) et Chaudhuri (S.). – A variational approach to recovering depth from defocused images. *IEEE Trans. Patt. Anal. Mach. Int.*, vol. 19, n° 10, octobre 1997, pages 1158–1164.
- [Reille 90] Reille (M.). – *Leçons de Palynologie et d'Analyse Pollinique*. – Editions du C.N.R.S., 1990.
- [Rodenacker 01] Rodenacker (K.), Gais (P.), Jütting (U.) et Hense (B.A.). – (semi-) automatic recognition of microorganisms in water. *In: Proceedings of ICIP'01*, pages 30–33.
- [Ronneberger 02] Ronneberger (O.), Burkhardt (H.) et Schultz (E.). – General-purpose object recognition in 3d volume data sets using gray-scale invariants - classification of airborne pollen-grains recorded with a confocal laser scanning microscope. *In: Proceedings of ICPR'02*.
- [Schechner 00a] Schechner (Yoav Y.). – Depth from defocus vs. stereo: How different really are they? *IJCV*, vol. 89, 2000, pages 141–162.
- [Schechner 00b] Schechner (Yoav Y.), Kiryati (Nahum) et Basri (Ronen). – Separation of transparent layers using focus. *IJCV*, vol. 39, n° 1, 2000, pages 25–39.
- [Schechner 00c] Schechner (Yoav Y.), Kiryati (Nahum) et Shamir (Joseph). – Blind recovery of transparent and semireflected scenes. *In: Proceedings of CVPR'00*, pages 38–43.
- [Schechner 02] Jin (H.), Favaro (P.), Yezzi (A.) et Soatto (S.). – A variational approach to shape from defocus. vol. 2, 2002, pages 18–30.

- [Schwartz 97] Schwartz (Laurent). – *Théorie des distributions - Troisième cycle et recherche*. – HERMANN, 1997.
- [Sheppard 83] Sheppard (C.J.R.), Hamilton (D.K.) et Cox (I.J.). – Optical microscopy with extended depth of field. *Proceedings of the Royal Society of London Serie A*, vol. 387, 1983, pages 171–186.
- [Sheppard 88] Sheppard (C.J.R.). – Depth of field in optical microscopy. *J. of Microscopy*, vol. 149, janvier 1988, pages 73–75.
- [Sheppard 90] Sheppard (C.J.R.) et Cogswell (C.J.). – Three-dimensional image formation in confocal microscopy. *Journal of Microscopy*, vol. 159, août 1990, pages 179–194.
- [Sibarita 92] Sibarita (J.-B.). – *Formation et restauration des images en microscopie à rayons X & application à l'observation d'échantillons biologiques*. – Thèse de Doctorat, Université Joseph FOURIER - Grenoble I, octobre 1992.
- [Stokseth 69] Stokseth (P.A.). – Properties of a defocused optical system. *Journal of Optical Society of America*, vol. 59, n° 10, octobre 1969, pages 1314–1321.
- [Strand 85] Strand (T.C.). – Optical three-dimensional for machine vision. *Optical Engineering*, vol. 24, n° 1, janvier 1985, pages 33–40.
- [Streibl 84] Streibl (N.). – Fundamental restrictions for 3-d light distributions. *Optik*, vol. 66, n° 4, 1984, pages 341–354.
- [Streibl 85] Streibl (N.). – Three-dimensional imaging by a microscope. *Journal of Optical Society of America A*, vol. 2, n° 2, février 1985, pages 121–127.
- [Sugimoto 85] Sugimoto (S.A.) et Ichioka (Y.). – Digital composition of images with increased depth of focus considering depth information. *Applied Optics*, vol. 24, n° 14, juillet 1985, pages 2076–2080.
- [Swaminathan 01] Swaminathan (Rahul), Grossberg (Michael D.) et Nayar (Shree K.). – Caustics of catadioptric cameras. In: *Proceedings of ICCV (ICCV'01)*.
- [Swedlow 97] Swedlow (J.R.), Sedat (J.W.) et Agard (D.A.). – *Deconvolution in Optical Microscopy*. – P.A. Janson, ed., 1997, 2nd édition, 284–309p.
- [t. Haar Romeny 94] ter Haar Romeny (B.M.), Florack (L.M.J.), de Swart (M.), Wilting (J.) et Viergever (M.A.). – Deblurring gaussian blur. *Congress Mathematical Methods in Medical Imaging*, vol. 1, 1994, pages 139–148.
- [Tomczak 98] Tomczak (R.) et Bonton (P.). – Etude d'un algorithme de mise au point automatique de l'image : application l'observation d'échantillons sous microscope. *RFIA '98*, janvier 1998, pages 347–355.
- [Tomczak 99a] Tomczak (R.). – *Traitement d'images couleur et reconnaissance des formes appliqués la mesure automatique des taux de pollens dans l'air*. – Thèse de Doctorat, Université Blaise Pascal - Clermont Ferrand, décembre 1999.
- [Tomczak 99b] Tomczak (R.), Furie (F.), Rouquet (C.) et Bonton (P.). – Automated measurement of pollen rates by computer vision. In: *Proceedings of the 5th International Conference on Quality Control by Artificial Vision (QCAV'99)*.
- [Tsingos 01] Tsingos (Nicolas), Funkhouser (Thomas), Ngan (Addy) et Carlbom (Ingrid). – Modeling acoustics in virtual environments using the uniform theory of diffraction. In: *Proceedings of SIGGRAPH'01*.
- [v. Kempen 99] van Kempen (G.M.P.). – *Image Restoration in Fluorescence Microscopy*. – Thèse de Doctorat, Technische Universiteit Delft - Hollande, janvier 1999.
- [v.d. Hulst 81] van de Hulst (H.C.). – *Light Scattering by Small Particles*. – Dover Publications, inc., 1981, 2nd édition.
- [Verveer 98] Verveer (P. J.). – *Computational and Optical Methods for Improving Resolution and Signal Quality in Fluorescence Microscopy*. – Thèse de Doctorat, Technische Universiteit Delft - Hollande, décembre 1998.

- [Watt 92] Watt (A.) et Watt (M.). – *Advanced Animation and Rendering Techniques*. – Addison-Wesley, 1992.
- [Watt 00] Watt (A.). – *3D Computer Graphics*. – Addison-Wesley, 2000.
- [Weinstein 71] Weinstein (M.) et Castleman (K.R.). – Reconstructing 3-d specimens from 2-d section images. In : *Proceedings of Quantitative Imagery in the Biomedical Sciences*, éd. par SPIE, pages 131–138.
- [White 87] White (J.G.), Amos (W.B.) et Fordham (M.). – An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *Journal of Cell Biology*, vol. 105, juillet 1987, pages 41–48.
- [Whitted 80] Whitted (Turner). – An improved illumination model for shaded display. In : *Communications of the ACM*, pages 343–349.
- [Wiersma '00] Wiersma (S.H.). – *Focusing of Electromagnetic Waves*. – Thèse de Doctorat, Vrije Universiteit te Amsterdam, septembre 2000.
- [Xiong 93] Xiong (Y.) et Shafer (S.A.). – Depth from focusing and defocusing. *Proceedings of CVPR'93*, juin 1993, pages 68–73.
- [Young 93] Young (L.T.), Zagers (R.), van Vliet (L.J.), J.Mullikin, Boddeke (F.) et Netten (H.). – Depth-of-focus in microscopy. In : *Scandinavian Conference on Image Analysis*, pages 493–498.
- [Zinser 83] Zinser (G.), Erhardt (A.), Komitowski (D.) et Bille (J.). – Erzeugung und rekonstruktion dreidimensionaler lichtmikroskopischer bilder. *Fifth Deutsche Arbeitsgemeinschaft Mustererkennung Symposium*, 1983, pages 294–299. – Karlsruhe - Germany.



# Résumé

Dans cette thèse, nous proposons un modèle complet de la formation de l'image, qui s'applique à des objets microscopiques 3D translucides. La principale originalité de ce modèle est la prise en compte d'objets 3D translucides. Le système imageur que nous simulons est un microscope optique conventionnel, travaillant en lumière visible. Un système optique réel possède une profondeur de champ finie. Il en résulte que l'objet n'apparaît net qu'autour du plan de focalisation. Par opposition, toutes les parties de l'objet 3D qui sont en dehors de cette zone sont floues. De plus, l'objet étant translucide, toutes les parties de l'objet, nettes ou floues, sont visibles par transparence.

Dans notre modèle, un objet translucide est défini comme une répartition discrète d'indices de réfraction et de coefficients d'absorption. Pour simuler le trajet de la lumière, nous proposons un modèle physique utilisant des techniques de lancer de rayons de la source vers l'observateur. Ce modèle physique sert à calculer l'espace objet éclairé. Pour simuler la génération d'images par le système optique, nous utilisons des principes d'optique ondulatoire. Nous modélisons la fonction de transfert 3D du microscope, qui dépend de la défocalisation. Après avoir choisi un plan de focalisation, nous calculons une image simulée en appliquant cette fonction de transfert à chaque plan plus ou moins défocalisé de l'espace objet éclairé. Une séquence d'images simulées est obtenue en faisant varier la focalisation.

Ce modèle a été validé sur des objets simples : des micro-billes de verre, de différentes tailles. En particulier, nous retrouvons avec précision les caustiques qui apparaissent à l'arrière de l'objet observé. Pour terminer, nous avons appliqué ce modèle à des objets biologiques complexes : des grains de pollen.

**Mots-clés :** objet translucide, microscopie optique, formation de l'image, profondeur de champ, flou, réfraction.

# Abstract

We present a complete image formation model for microscopic 3D translucent objects. The main contribution is that we take microscopic 3D translucent objects into account. We simulate the imaging system as a transmitted light microscope. A real optical system has a finite depth of field, which implies that not all the object but a part of it (that correspond to the focusing plane) is not blurred; all parts of the objects that are outside this area are blurred. Due to the translucence, we can see all the parts of the object (blurred or not).

In our model, we define a translucent object as a discrete repartition of refractive indexes and absorption coefficients. To simulate the trajectory of light, we propose a physical model using ray tracing (rays are traced from the light source to the observer). This physical model is used to calculate the lit object space. To simulate the image generation by the optical system, we use some wave optic principles. We model the 3D transfer function of the microscope, which depends on the amount of defocusing. We first choose the focused plane, and then we calculate a simulated image using this transfer function with each plane of the lit object space that is more or less defocused. If we change the focused plane, we obtain a simulated image sequence.

This model has been validated on simple objects such as glass micro spheres of different sizes. For one thing, we can observe that the caustics that appear behind the observed translucent object are very accurate. Also, we applied this model to complex biological objects: pollen grains.

**Keywords:** translucent object, light microscopy, image formation, depth of field, blur, refrac-