

DEA de Biologie Structurale et Fonctionnelle - DEA de Biologie Cellulaire et Moléculaire

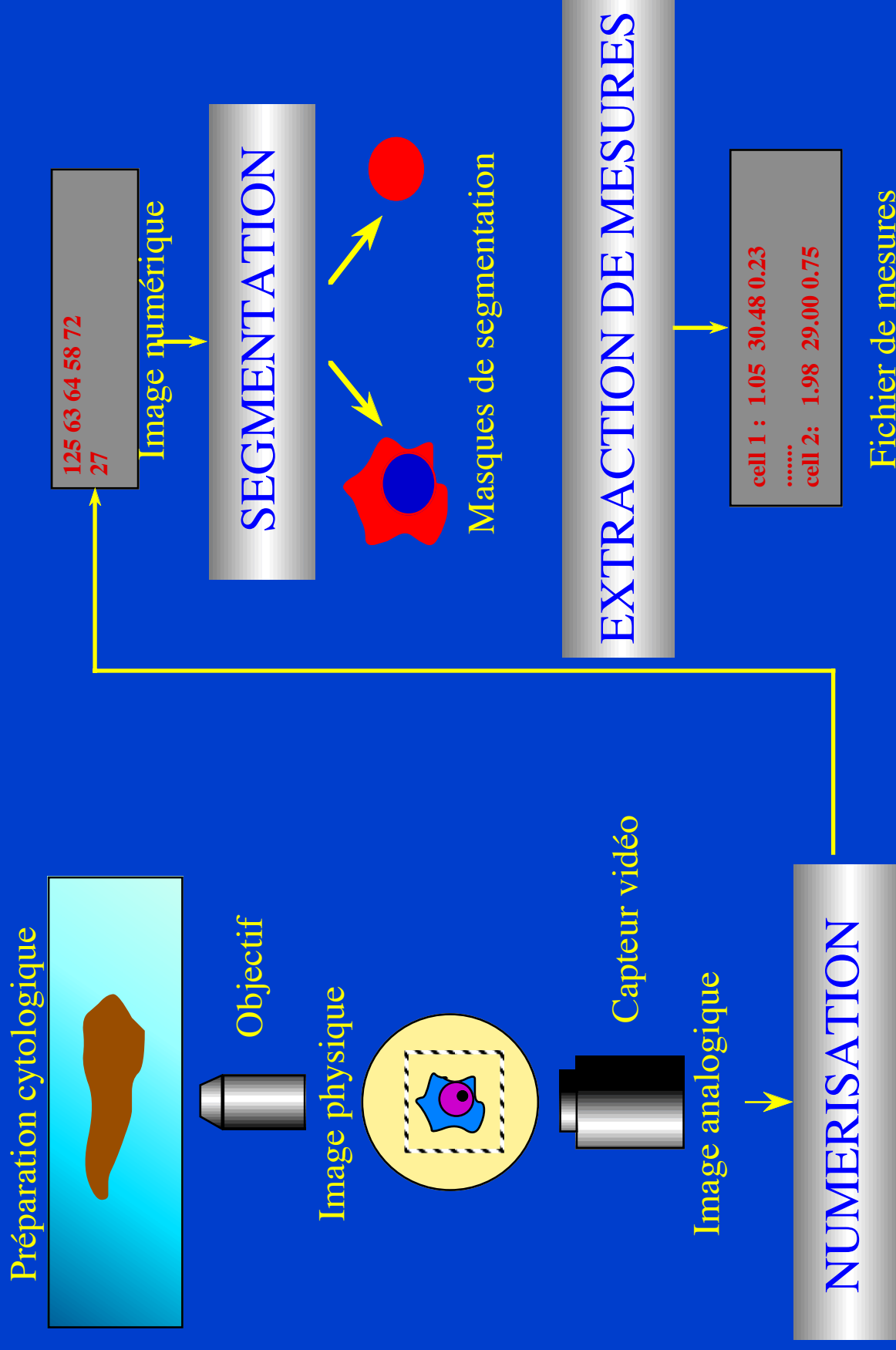
Module de Microscopie Structurale  
Cours n° 6

# Traitement et analyse d'images 2D et 3D

Yves Usson  
Institut Albert Bonniot  
Domaine de la Merci  
38706 La Tronche cedex  
[Yves.Usson@ujf-grenoble.fr](mailto:Yves.Usson@ujf-grenoble.fr)

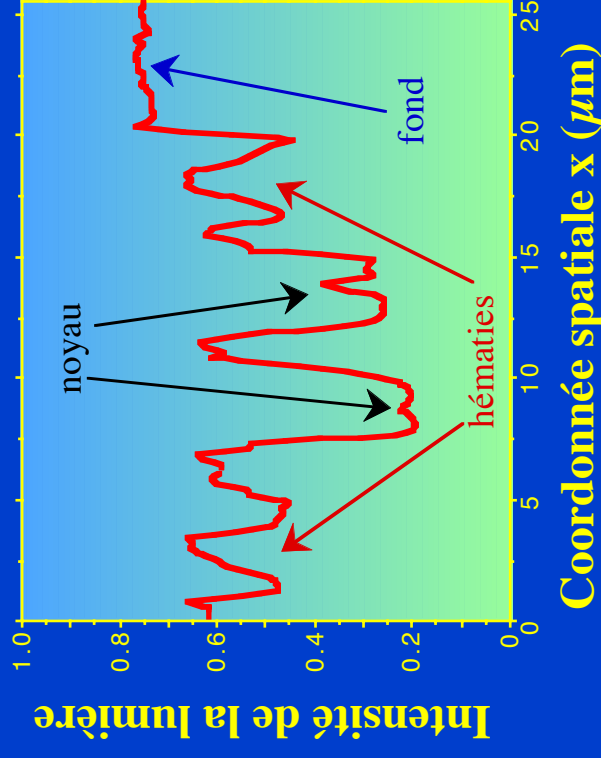
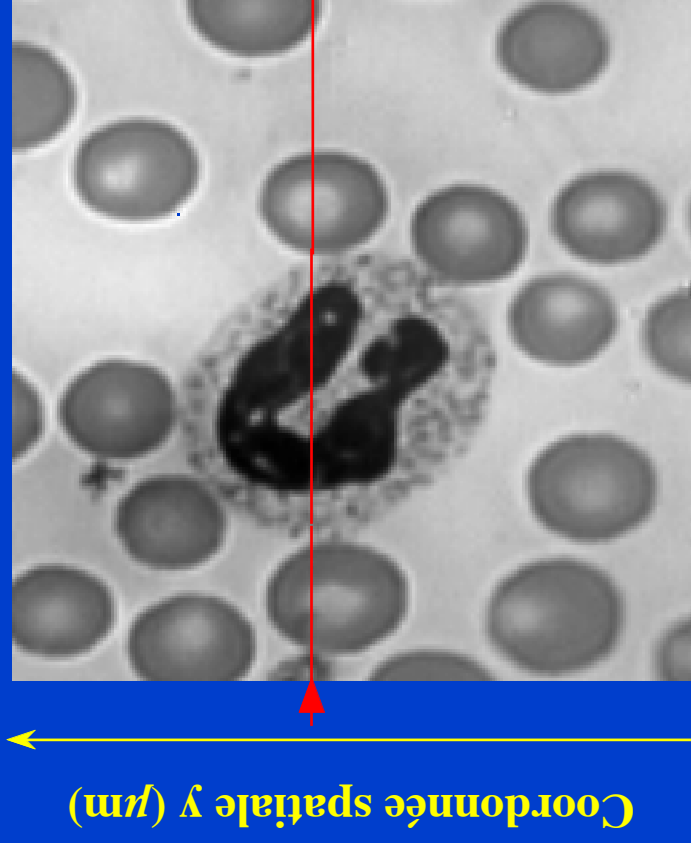
# Microscopie quantitative - Analyse d'images

## Etapes de la cytométrie par analyse d'image



# Microscopie quantitative - Analyse d'images

## Nature de l'image



# Microscopie quantitative - Analyse d'images

## L'image numérique

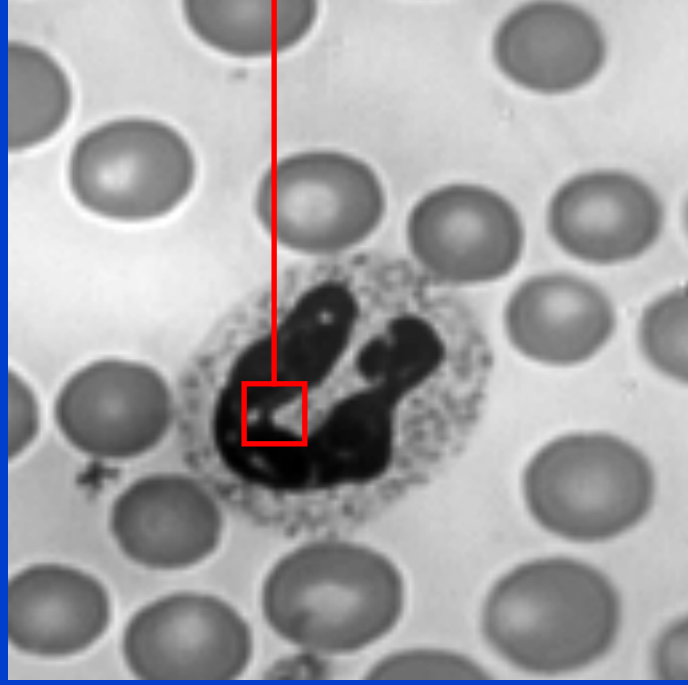
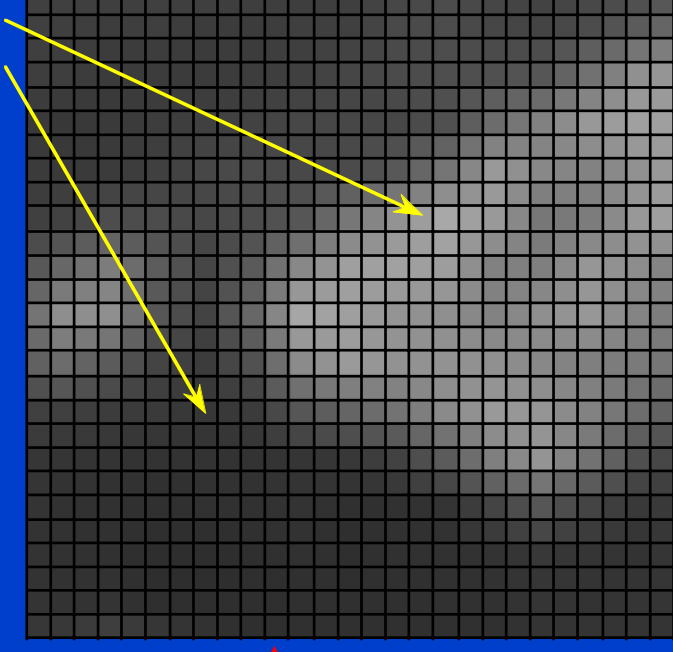


Image numérique 256x256 pixels

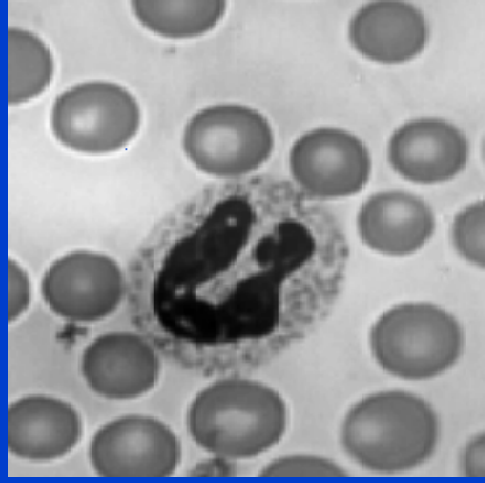
points élémentaires ou pixels (picture elements)



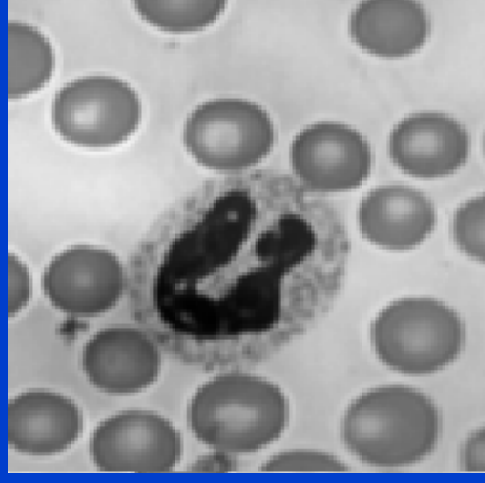
Agrandissement de la zone encadrée (8 fois)

# Microscopie quantitative - Analyse d'images

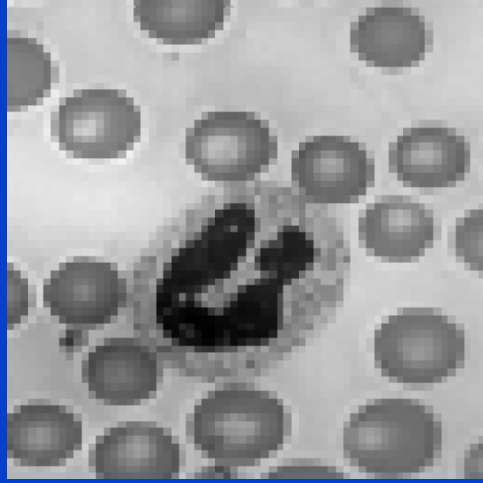
## L'échantillonnage spatial



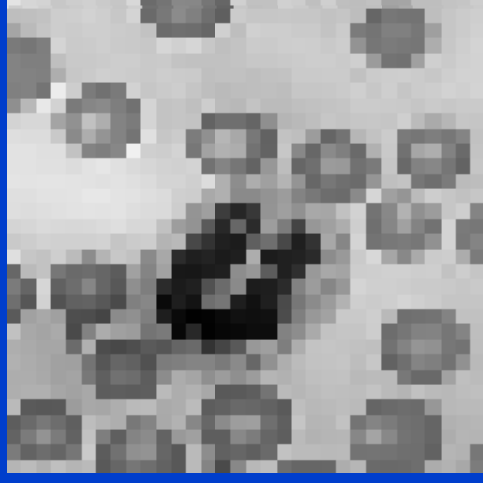
Taille du pixel  
 $0,1 \times 0,1 \mu\text{m}$   
Nombre de pixels  
 $256 \times 256$



Taille du pixel  
 $0,2 \times 0,2 \mu\text{m}$   
Nombre de pixels  
 $128 \times 128$



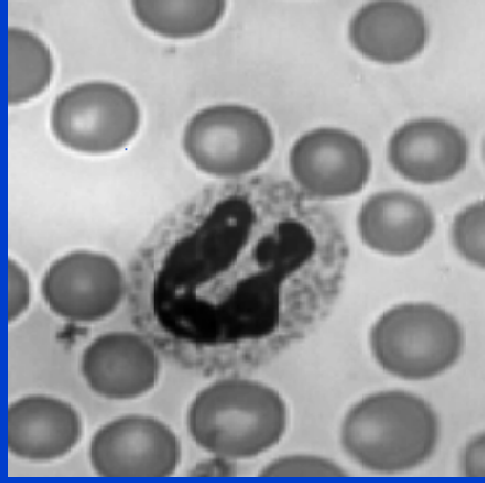
Taille du pixel  
 $0,4 \times 0,4 \mu\text{m}$   
Nombre de pixels  
 $64 \times 64$



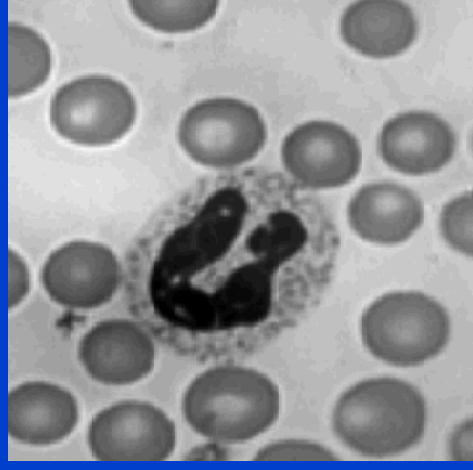
Taille du pixel  
 $0,8 \times 0,8 \mu\text{m}$   
Nombre de pixels  
 $32 \times 32$

# Microscopie quantitative - Analyse d'images

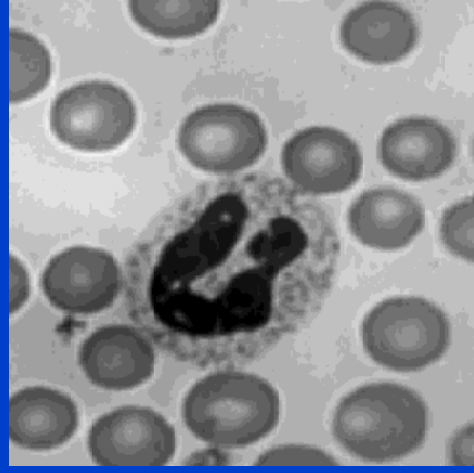
## L'échantillonnage dynamique



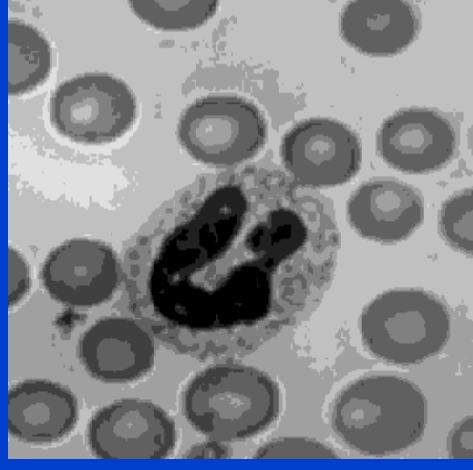
Dynamique : 256  
niveaux de gris



Dynamique : 32  
niveaux de gris



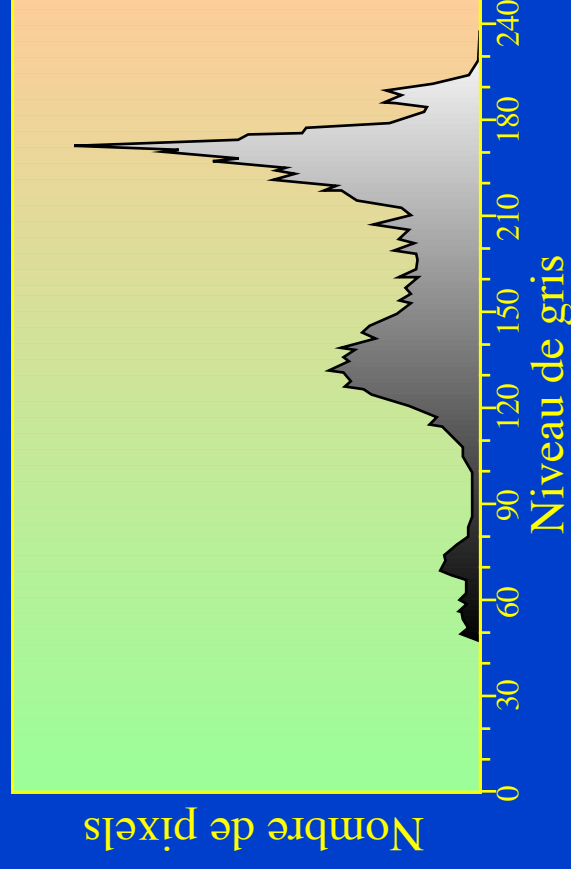
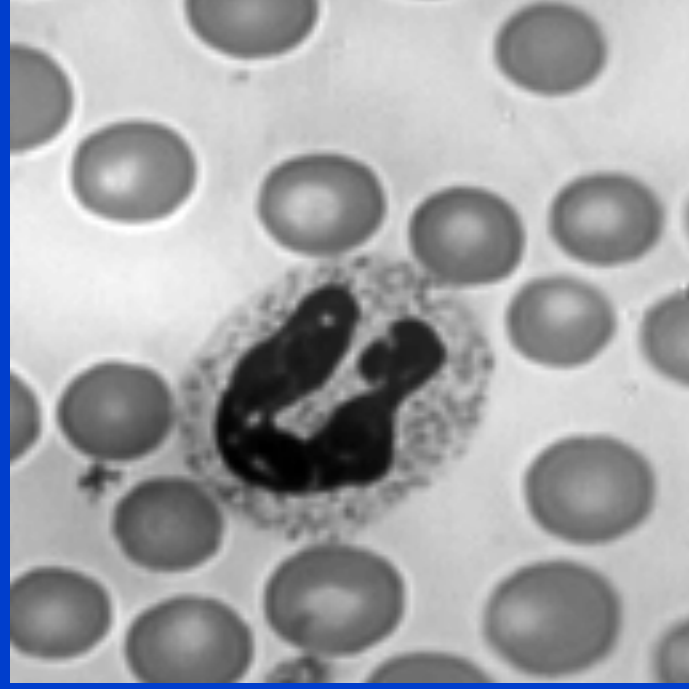
Dynamique : 16  
niveaux de gris



Dynamique : 8  
niveaux de gris

# Microscopie quantitative - Analyse d'images

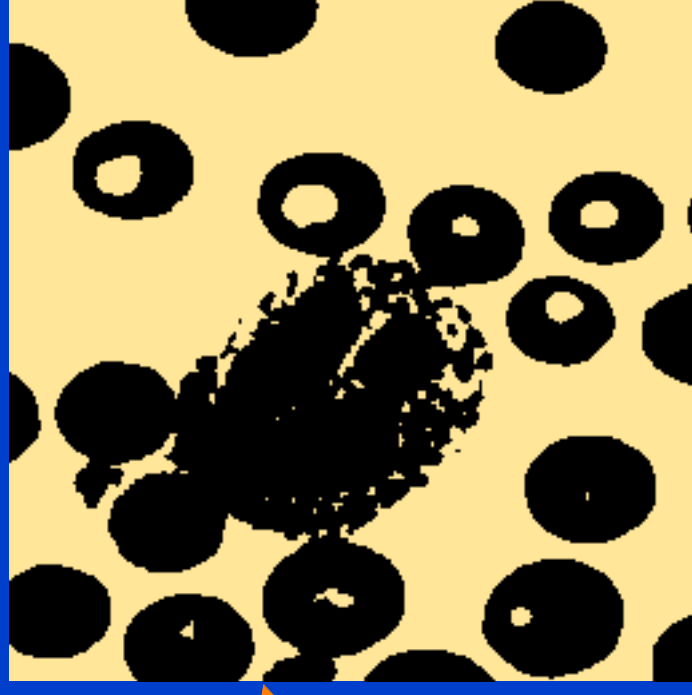
## Image et information



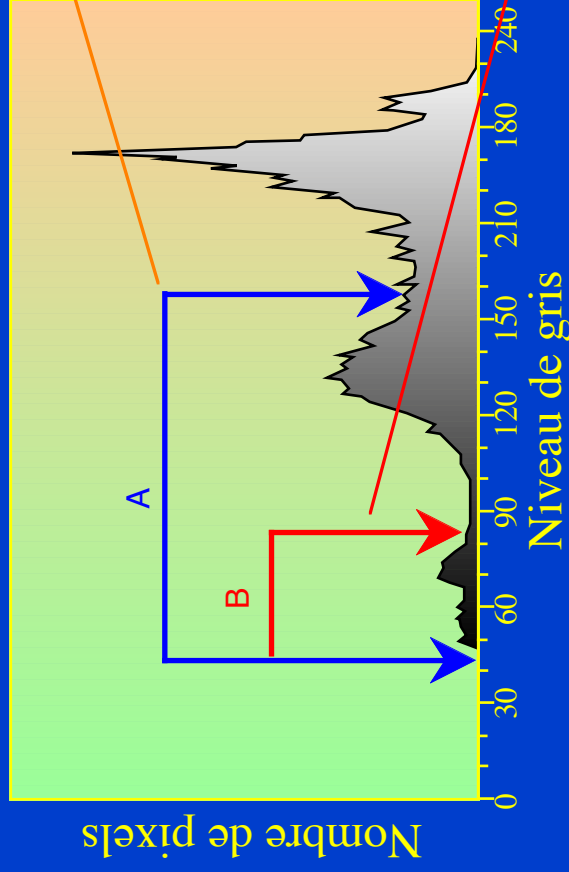
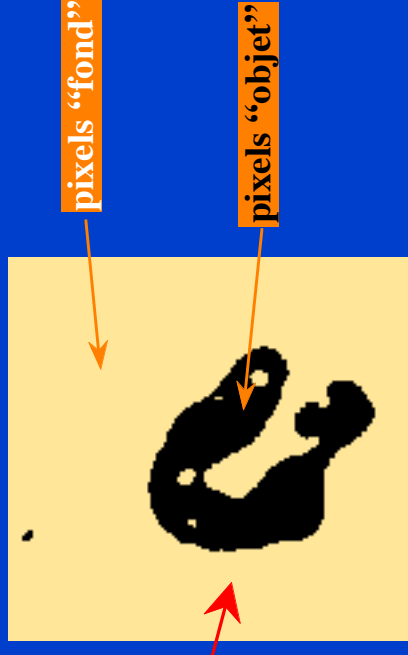
Distribution des niveaux de gris dans une image numérique. L'axe vertical correspond au nombre de pixels par classe de niveau de gris. L'axe horizontal correspond aux niveaux de gris : 0 -> noir et 255 -> blanc

# Microscopie quantitative - Analyse d'images

## Segmentation - Approche par régions



Masque binaire

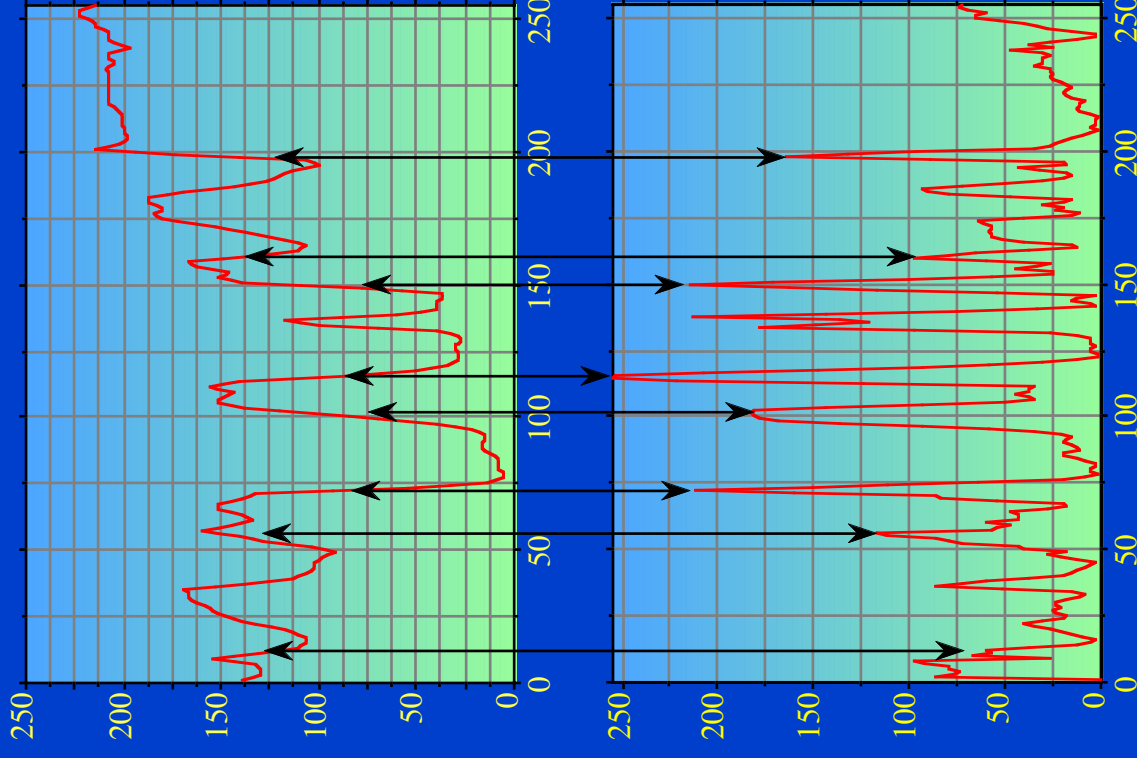
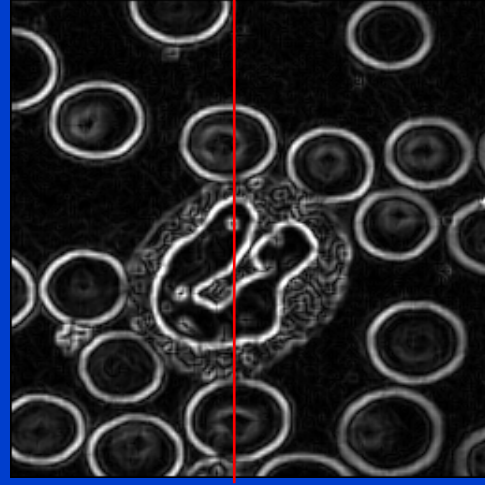
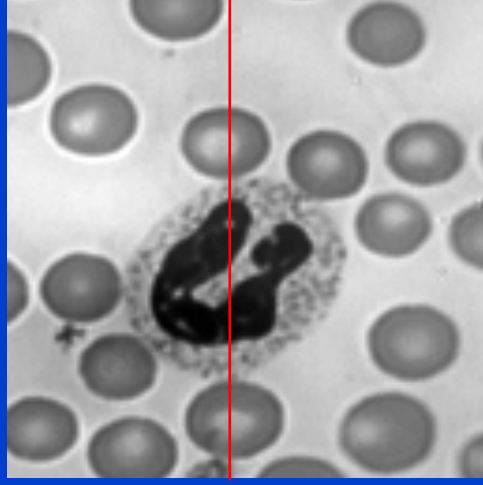


Segmentation par fenêtre de seuillage sur l'histogramme des intensités



# Microscopie quantitative - Analyse d'images

## Segmentation - Approche par frontières



$$G_X = \parallel I_{X-1} - 2.I_X + I_{X+1} \parallel$$

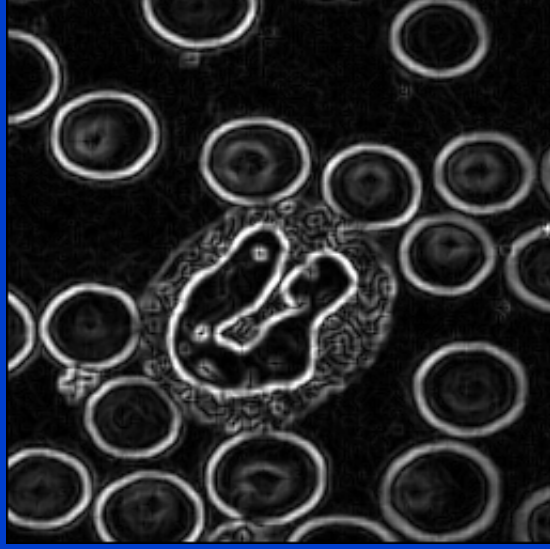
Filtrage de Sobel

(valeur absolue de la dérivée seconde)

# Microscopie quantitative - Analyse d'images

## Segmentation - Approche par frontières

Seuillage des niveaux de gris



Calcul du squelette du masque binaire

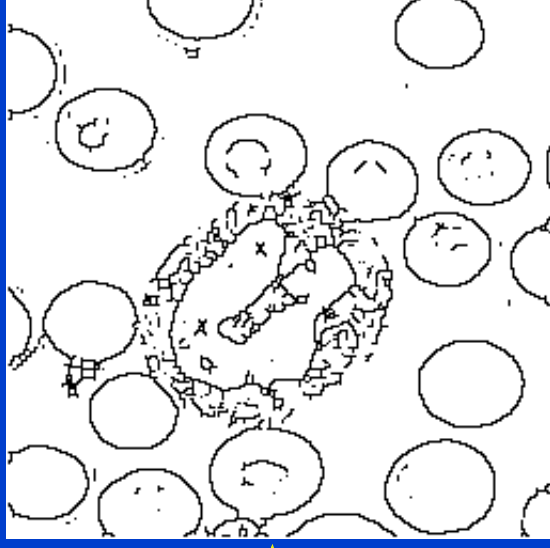
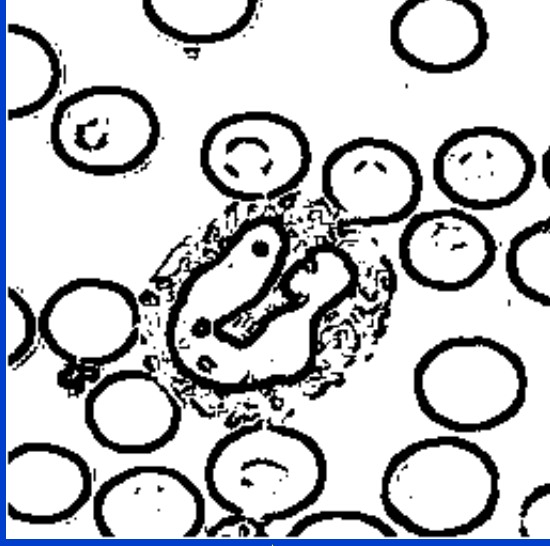
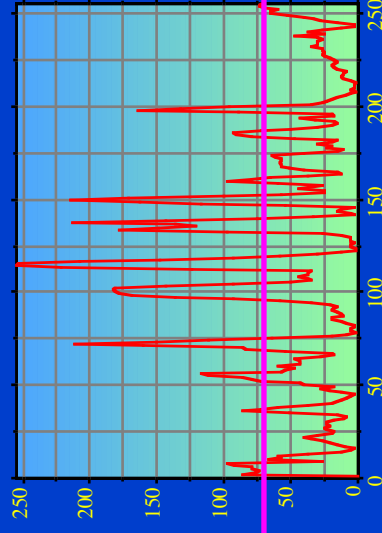


Image filtrée : image des gradients



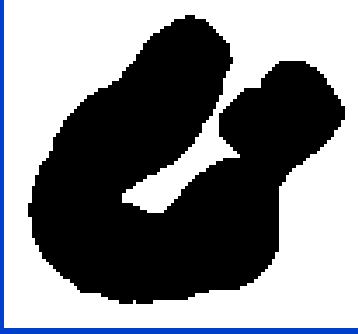
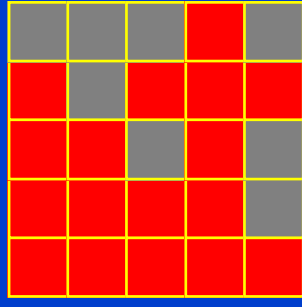
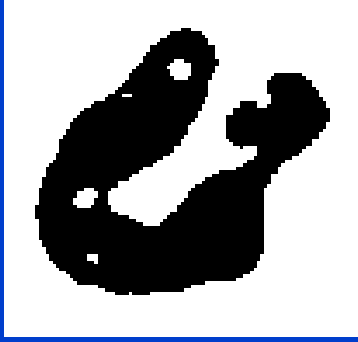
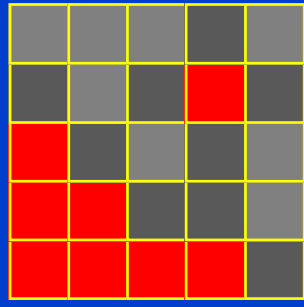
Masque binaire

Squelette binaire

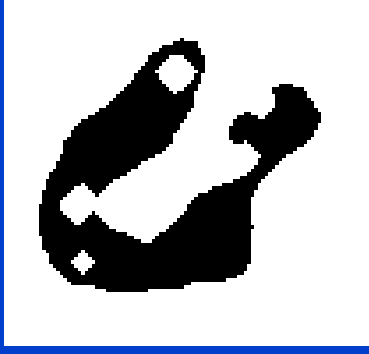
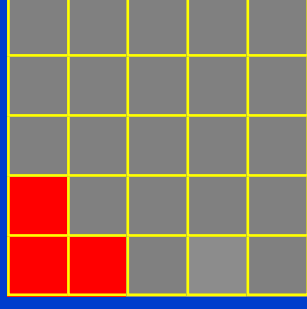
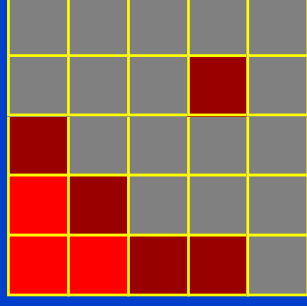
# Microscopie quantitative - Analyse d'images

## Filtrage morphologique

**DILATATION**



**EROSION**



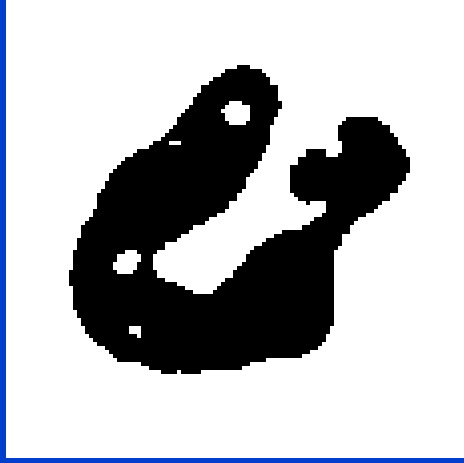
Les pixels du fond au contact de l'objet deviennent des pixels objets

Les pixels de l'objet au contact du fond deviennent des pixels du fond

# Microscopie quantitative - Analyse d'images

## Filtrage de forme

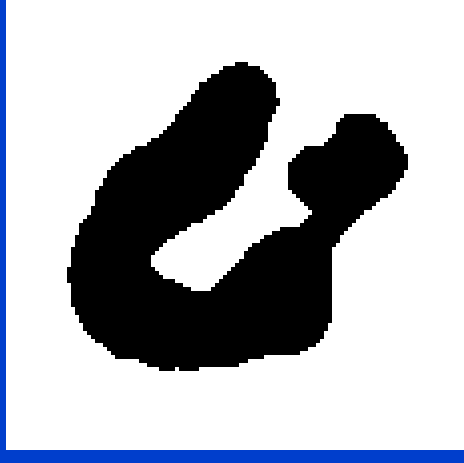
### Opération de fermeture



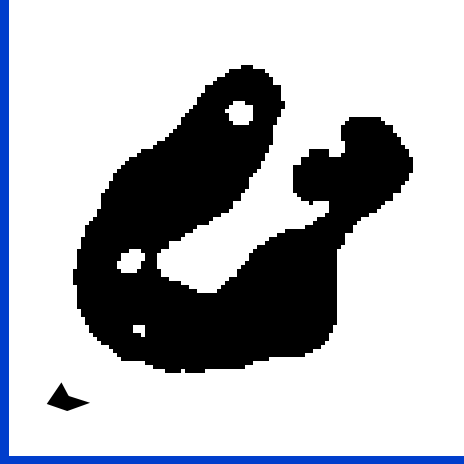
Dilatations  
↑



Erosions  
↑



### Opération d'ouverture



Erosions  
↑



Dilatations  
↑



# Microscopie quantitative - Analyse d'images

## Etiquetage en composantes connexes

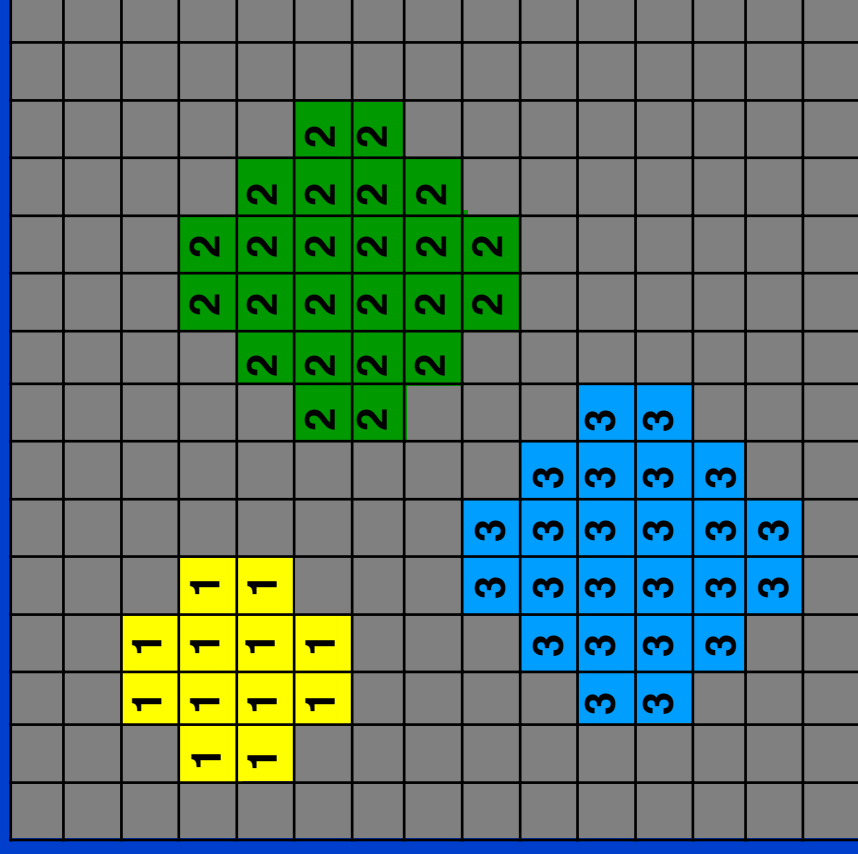
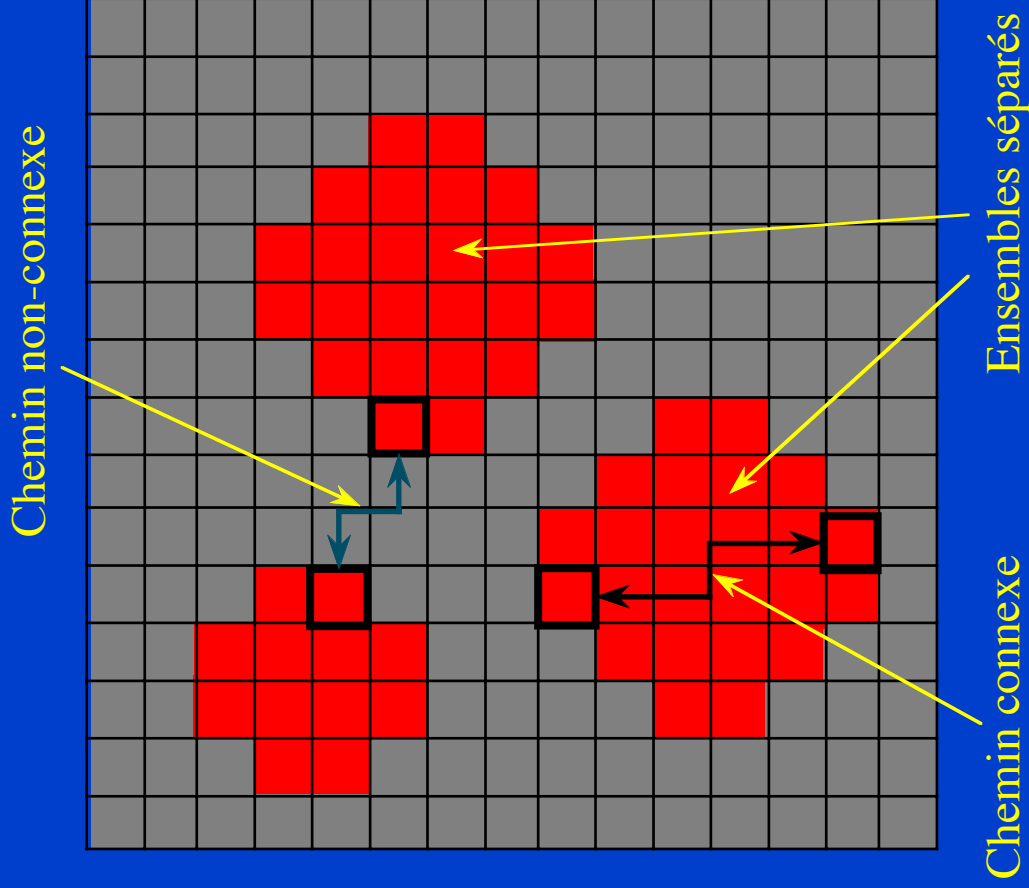


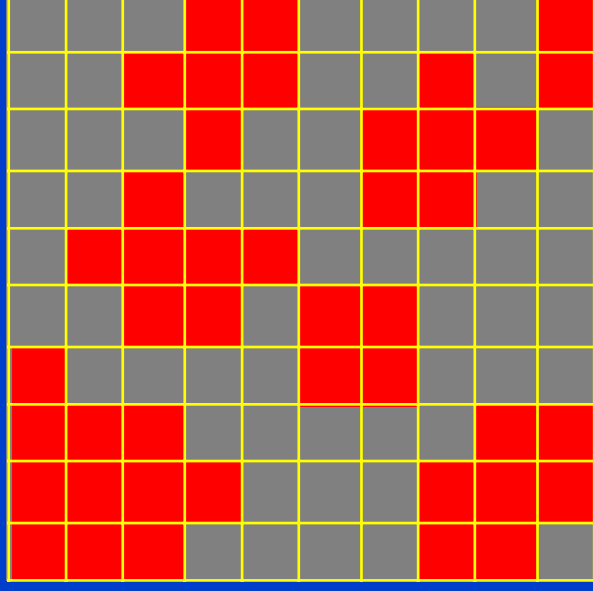
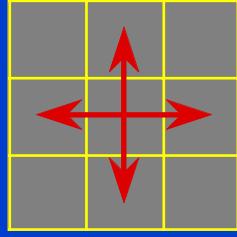
Image binaire

Image des étiquettes

# Microscopie quantitative - Analyse d'images

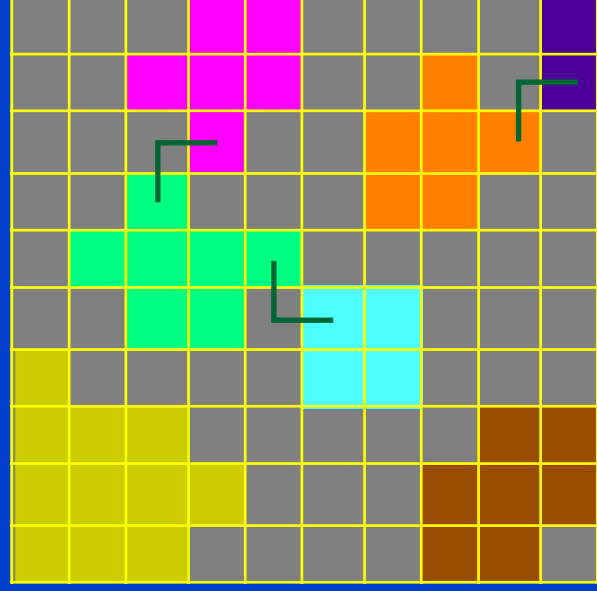
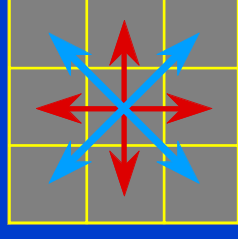
## Etiquetage - Règles de connexité

Connexité 4 voisins  
voisins latéraux

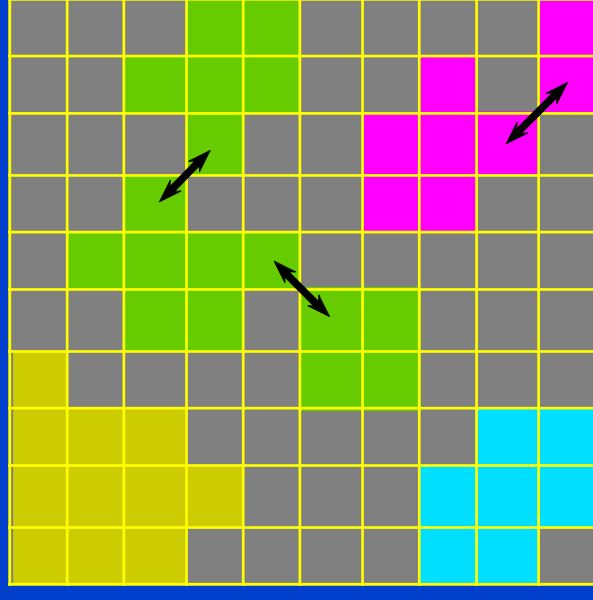


Masque à étiqueter

Connexité 8 voisins  
voisins latéraux & diagonaux



7 ensembles de composantes  
connexes

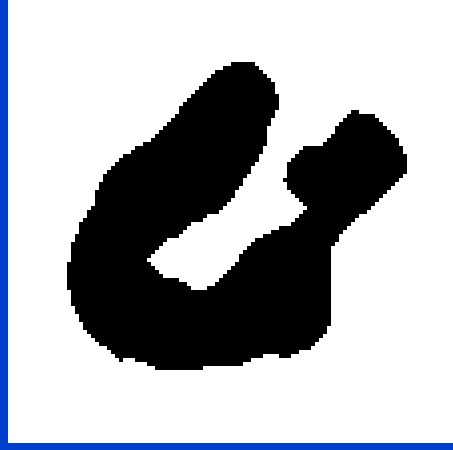


4 ensembles de composantes  
connexes

# Microscopie quantitative - Analyse d'images

## Paramètres morphométriques

Masque binaire

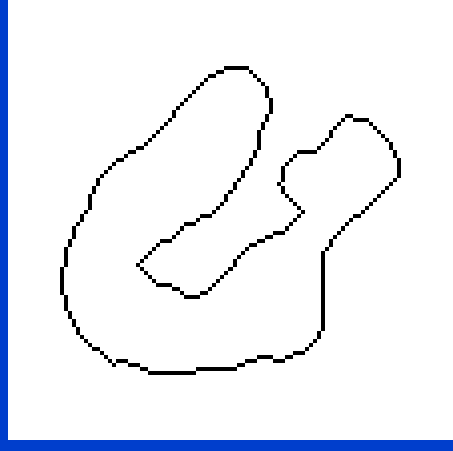


extraction de  
bord



(automate  
cellulaire)

Profil binaire



- Surface (nombre de pixels)

- Centre de gravité (analyse de position, anisotropie, cartographie cellulaire)

- Enveloppe convexe

- Périmètre (nombre de pixels)

- Energie de courbure

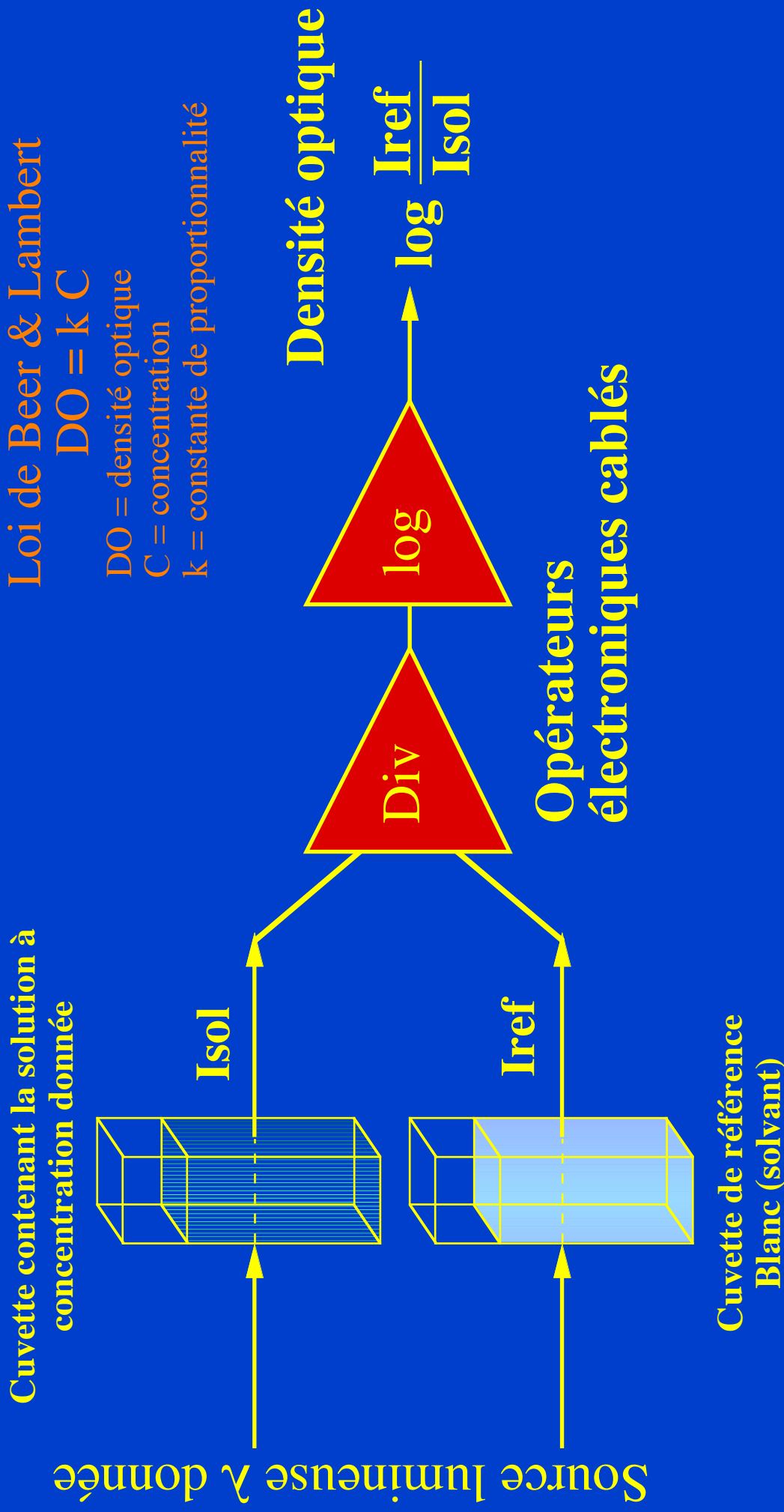
- Facteur de forme

- Grand et petit axe

- Orientation

# Microscopie quantitative - Analyse d'images

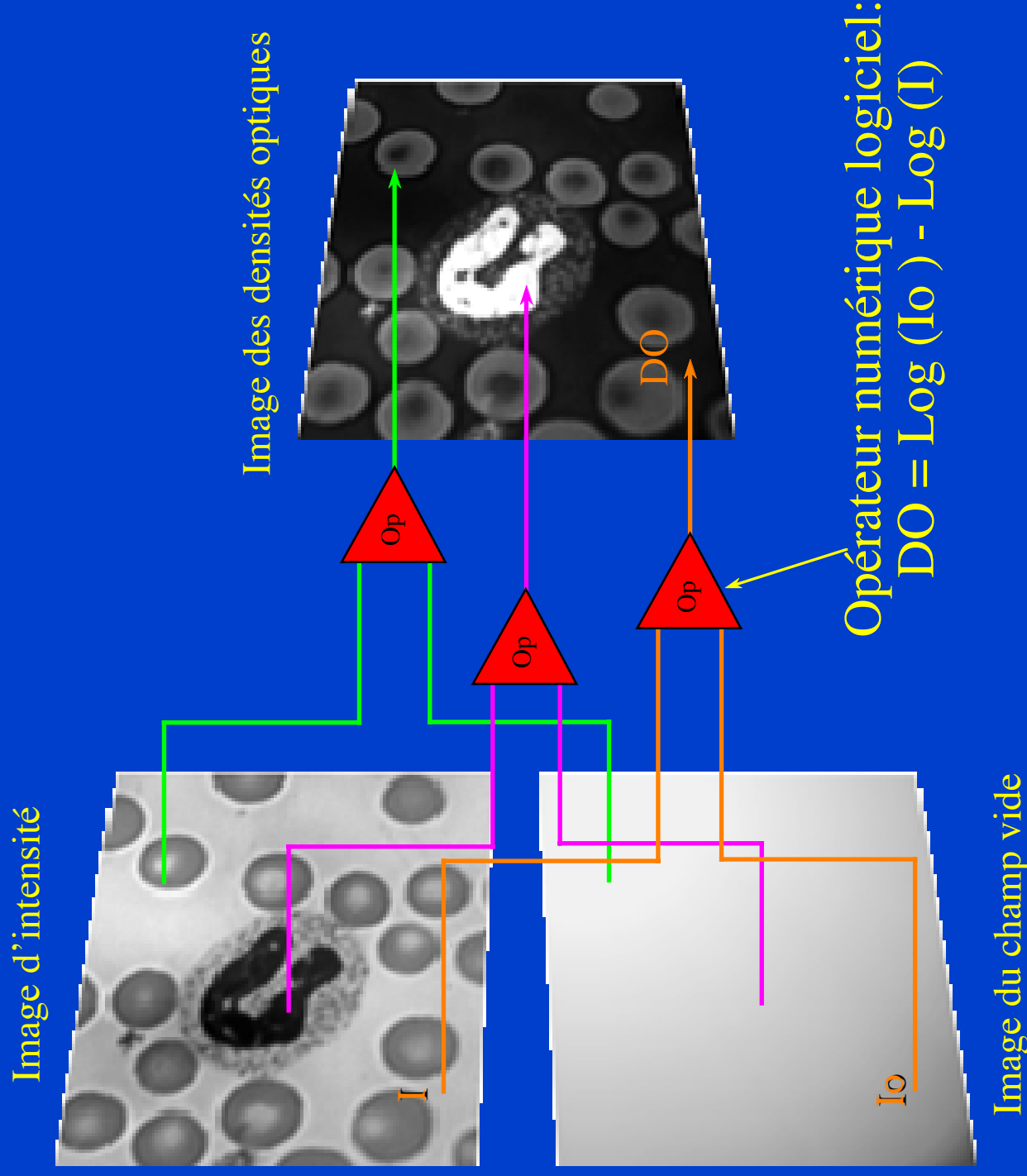
## Lumière transmise - Densitométrie





# Microscopie quantitative - Analyse d'images

## Lumière transmise - Densitométrie



# Microscopie quantitative - Analyse d'images

## Microscope confocal à balayage laser

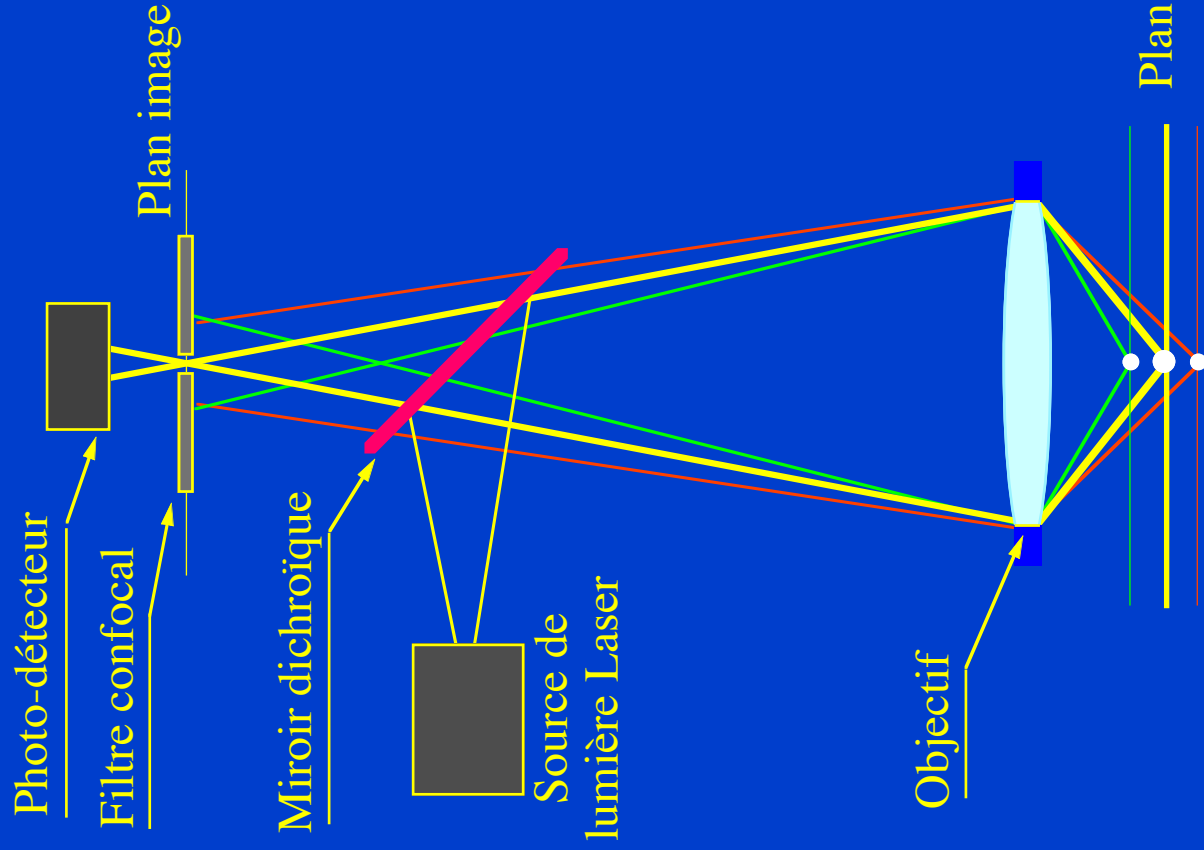
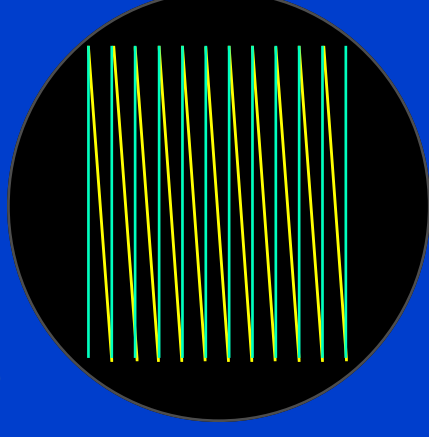


Image reconstruite point par point  
par balayage laser

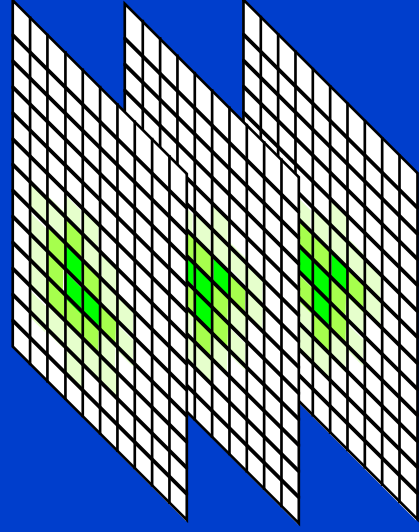


Obtention directe de coupes optiques sans  
information parasite des plans voisins

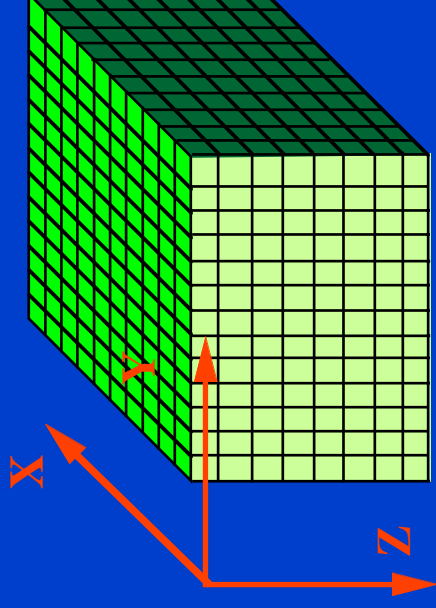
# Microscopie quantitative - Analyse d'images

## Description des données 3D

Pile de sections numérisées



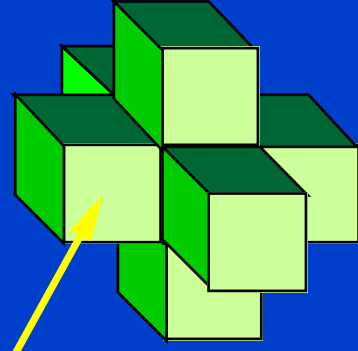
Volume numérique



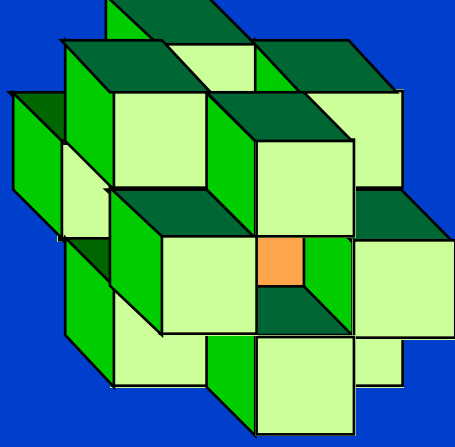
Connexité (voisinage) dans un volume numérique

facette commune

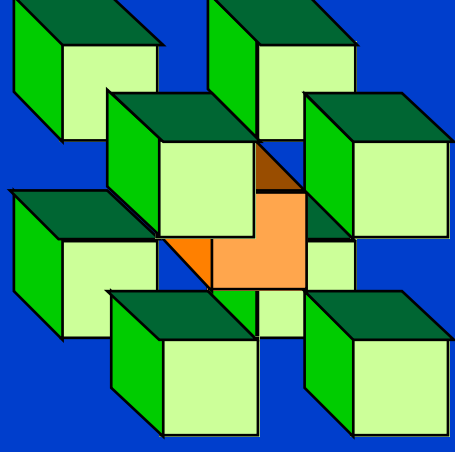
**VOXEL**



arête commune



sommet commun



# Microscopie quantitative - Analyse d'images

## Limites des méthodes d'acquisition en microscopie confocale

Modes de microscopie limités

Profondeur d'observation limitée par les propriétés des objectifs

Photodégradation des fluorochromes

Absorption de la lumière par le specimen

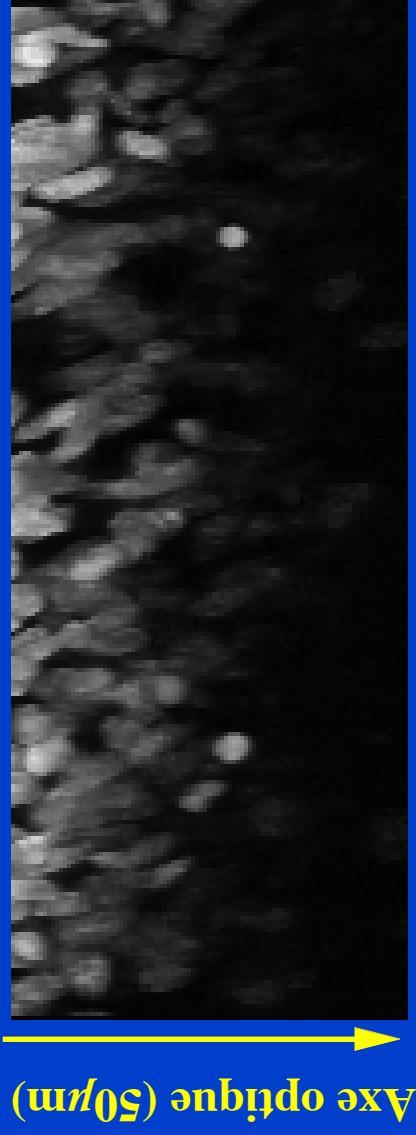
Atténuation du signal lumineux par l'optique du microscope

Bruits photonique et électronique

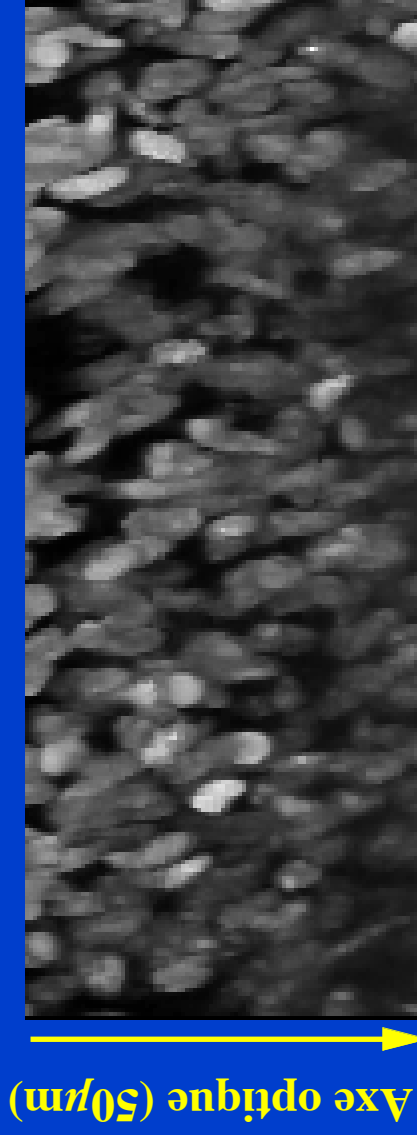
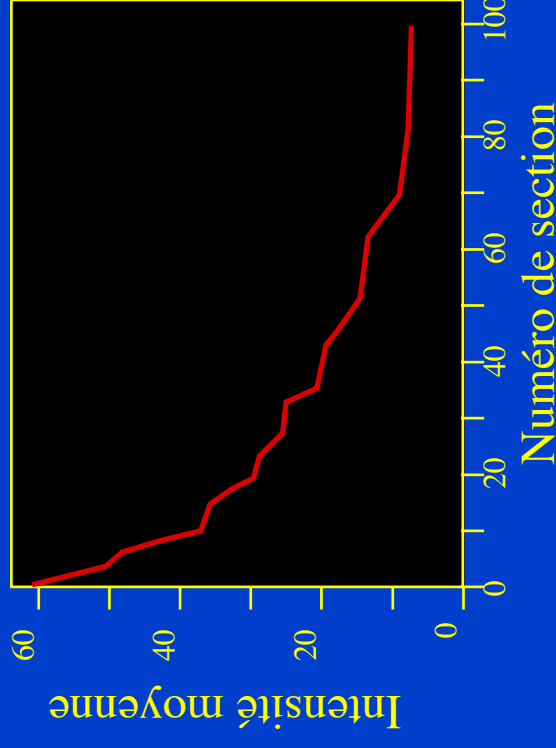
Déformations dues aux différences d'indice de réfraction

# Microscopie quantitative - Analyse d'images

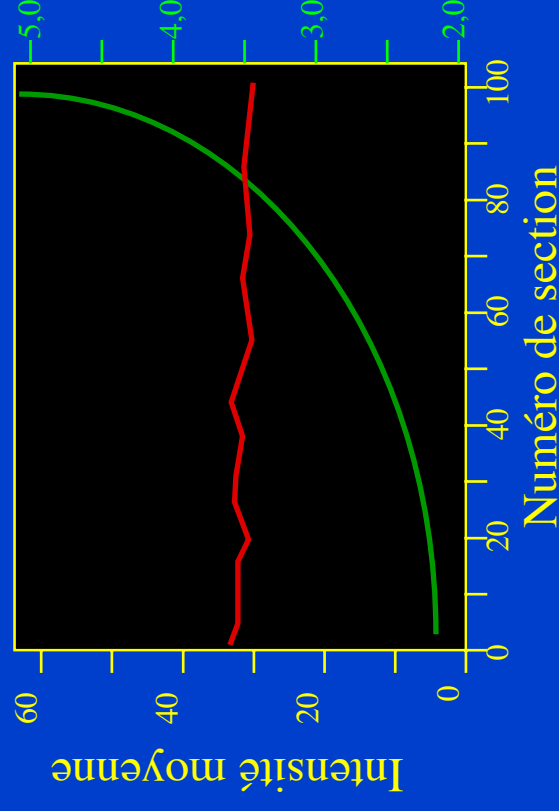
## Absorption de la lumière par le specimen



Vue latérale brute (noyaux de cellules myocardiques)



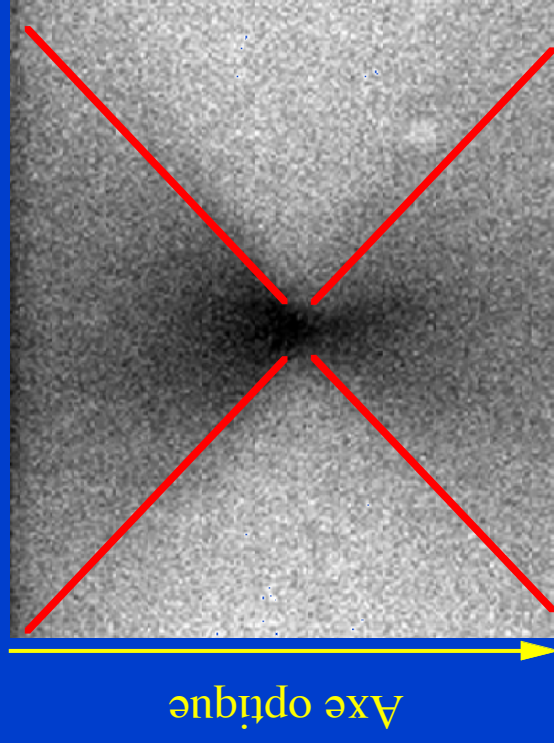
Vue latérale après compensation par une fonction log-logistique (Rigaut et al., 1991)



# Microscopie quantitative - Analyse d'images

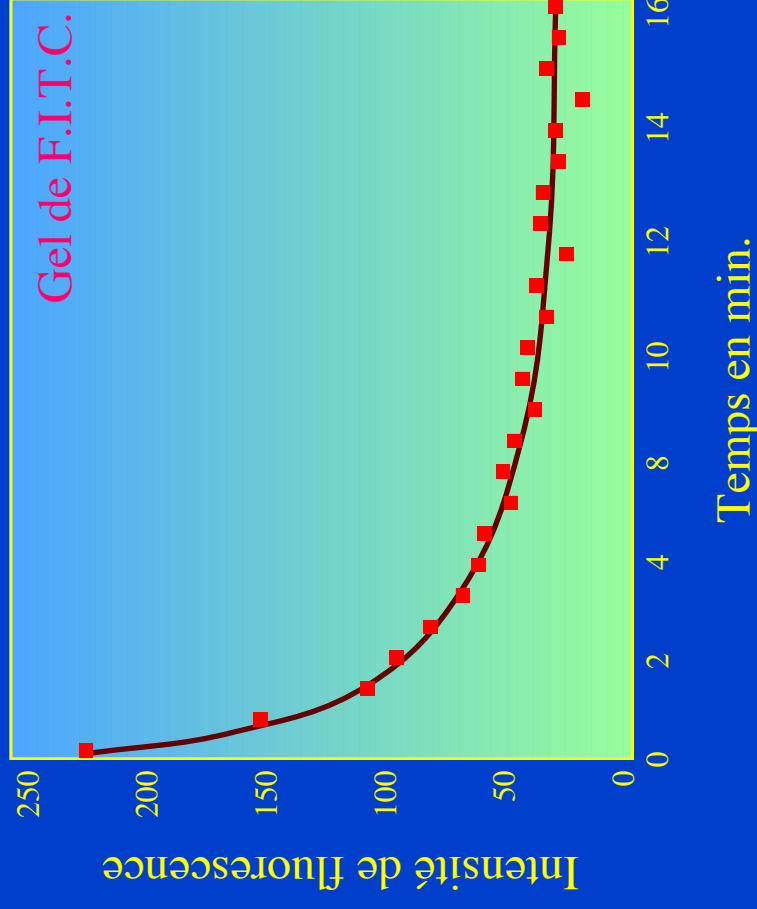
## Photodégradation de la fluorescence

Photodégradation  
d'une préparation homogène



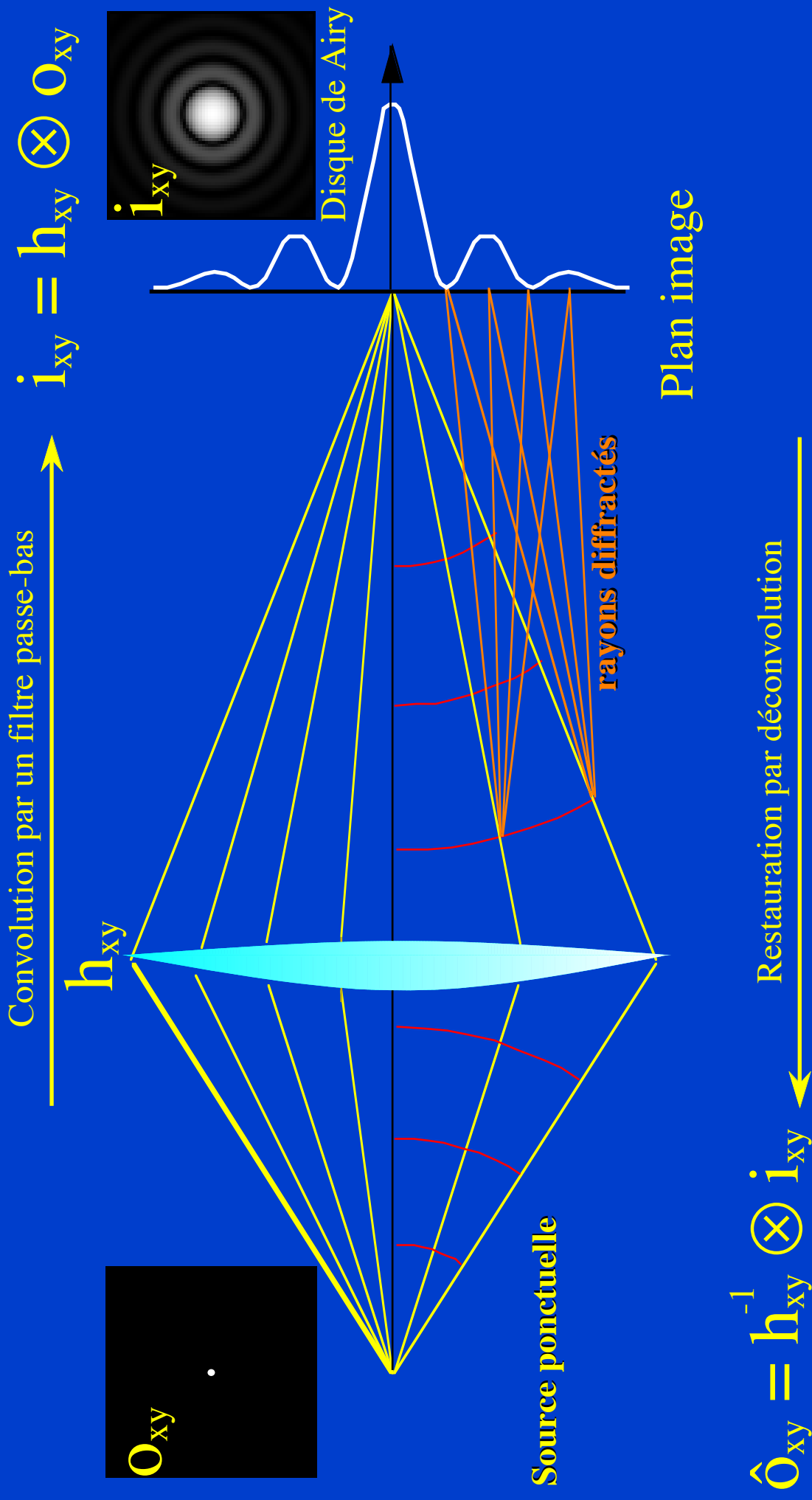
Les molécules de fluorochrome  
situées dans le double cône de  
lumière sont altérées

Photodégradation en fonction  
du temps d'exposition



# Microscopie quantitative - Analyse d'images

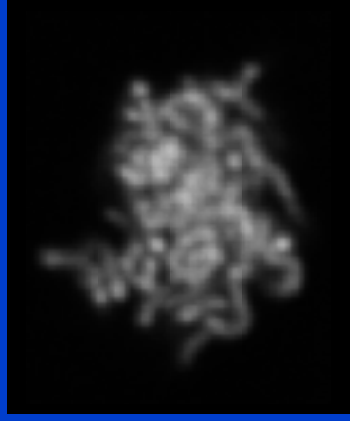
## Formation de l'image par une lentille



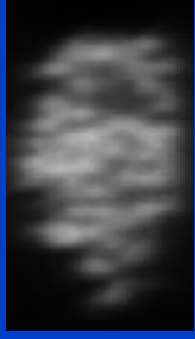
# Microscopie quantitative - Analyse d'images

## Restauration de la résolution par déconvolution

Spermatozoïde démembrané de *Xenopus laevis* incubé dans un extrait d'oeuf  
Etude de la cinétique de recondensation chromosomique (1h30)  
Marquage YOYO (de la Barre & Dimitrov)

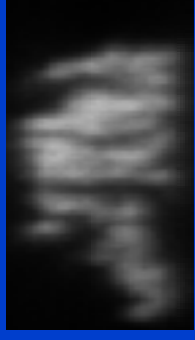


Sections XY

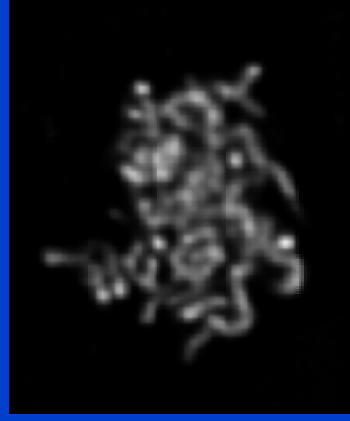
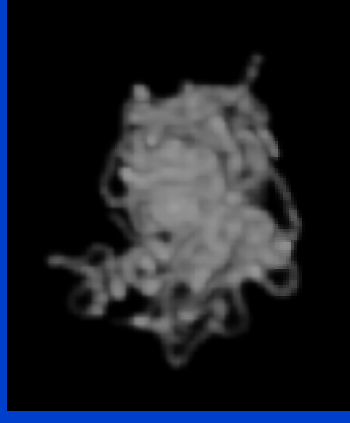


Données brutes

Sections XZ



Reconstructions



Données restaurées

