



**HAL**  
open science

## Caractérisation statistique d'une assemblée de nanotubes en imagerie microscopique

Pierre Chainais, Bérengère Lebental

► **To cite this version:**

Pierre Chainais, Bérengère Lebental. Caractérisation statistique d'une assemblée de nanotubes en imagerie microscopique. GRETSI, Sep 2011, France. 4p. hal-00860839

**HAL Id: hal-00860839**

**<https://hal.science/hal-00860839>**

Submitted on 11 Sep 2013

**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.

# Caractérisation statistique d'une assemblée de nanotubes en imagerie microscopique

Pierre CHAINAIS<sup>1</sup>, Bérengère LEBENTAL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Clermont Université CNRS LIMOS UMR 6158  
INRIA Lille-Nord Europe (SEQUEL)  
40 Avenue Halley 59650 Villeneuve d'Ascq, France

<sup>2</sup>Université Paris-Est, IFSTTAR  
58 boulevard Lefebvre 75732 Paris Cedex 15, France

pierre.chainais@inria.fr, berengere.lebental@ifsttar.fr

**Résumé** – Dans le domaine des nanotechnologies, de nombreux dispositifs incorporant des nano-objets sont développés. Les différents procédés de fabrication sont en général validés à l'aide d'images de microscopie souvent interprétées de manière relativement qualitative. Une caractérisation systématique et automatique de ces observations permettrait des comparaisons quantitatives et objectives. Nous nous intéressons en particulier à des nanomembranes en nanotubes de carbone destinées à des applications en instrumentation. Nous proposons une chaîne complète de traitement d'images de microscopie électronique à balayage. Les principales étapes sont un débruitage anisotrope, une amélioration de contraste et une segmentation utilisant la morphologie mathématique ainsi qu'une estimation de l'orientation locale de filaments grâce au tenseur de structure. Nous abordons aussi l'extraction de filaments individuels. Cette approche n'implique aucune intervention de l'utilisateur et peut être utilisée automatiquement sur des ensembles de plusieurs centaines d'images. Nous obtenons notamment pour la première fois les histogrammes d'orientation de nanotubes constituant des nanomembranes et accédons ainsi à une mesure objective de la qualité de l'alignement des nanotubes, essentielle pour la physique du capteur.

**Abstract** – Nanotechnology fosters the development of many devices incorporating nano-objects are developed. In general, the various manufacturing processes are validated thanks to microscopy imagery. The resulting images are most often interpreted in a qualitative manner only. A systematic and automatic characterization of these observations would allow for objective and quantitative comparisons. Here we focus on nanomembranes made of carbon nanotubes aimed at the instrumentation of buildings. We propose a complete procedure for the processing of scanning electron microscopy images. The main steps consist of anisotropic denoising, contrast enhancement and segmentation based on mathematical morphology and an estimation of the local orientation of filaments by using the structure tensor. We also deal with the extraction of individual filaments. This approach does not imply any user interaction and can be used in a fully automatic way on sets of hundreds of images. Noticeably, we obtain for the first time the histograms of nanotubes orientations. We get an objective measure of the quality of the alignment of nanotubes which is essential to the physics of sensors.

## 1 Introduction

Dans le domaine des nanotechnologies, les dispositifs intègrent de grandes quantités de nano-objets tels que nanotubes ou nano-agrégats. Les caractéristiques statistiques de ces distributions de nano-objets déterminent les propriétés physiques des dispositifs. Nous nous intéressons ici à de fines nano-membranes (20 nm d'épaisseur) constituées de nanotubes de carbone déposés entre deux électrodes en or espacées de 1  $\mu\text{m}$ , fig. 1(a). Ces membranes, suspendues et mises en vibration, constituent la brique élémentaire de microtransducteurs ultrasonores capacitifs destinés à des applications en instrumentation [1]. La densité et le degré d'alignement des nanotubes de ces membranes doivent être contrôlés pour assurer un fonctionnement reproductible du dispositif. La microscopie électronique à balayage (MEB) est couramment utilisée dans ce but, mais les images ne sont exploitées que par des techniques manuelles [2].

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude de structures filamenteuses telles que les neurites [3], les filaments de myosine [4], les vaisseaux sanguins [5] ou les routes en télédétection [6]. Plusieurs approches sont envisageables quant à la segmentation des nanotubes. Les filtres adaptés fonctionnent bien pour des formes relativement régulières et peu variables, ce qui n'est pas le cas ici. La croissance de régions ou la déformation de modèle nécessitent une initialisation délicate et impliquent généralement l'intervention de l'utilisateur. Nous avons choisi d'utiliser des outils de morphologie mathématique combinés à une étape de seuillage adaptatif. Nous obtenons ainsi de manière relativement fiable le squelette des nanotubes sur lequel nous estimons les largeurs et orientations locales, grâce au tenseur de structure notamment. Nous en déduisons des indicateurs statistiques pertinents et objectivement comparables d'un échantillon à l'autre. Accessoirement, le codage couleur de l'orientation locale améliore notablement la lisibilité des images segmentées, ce qui est est

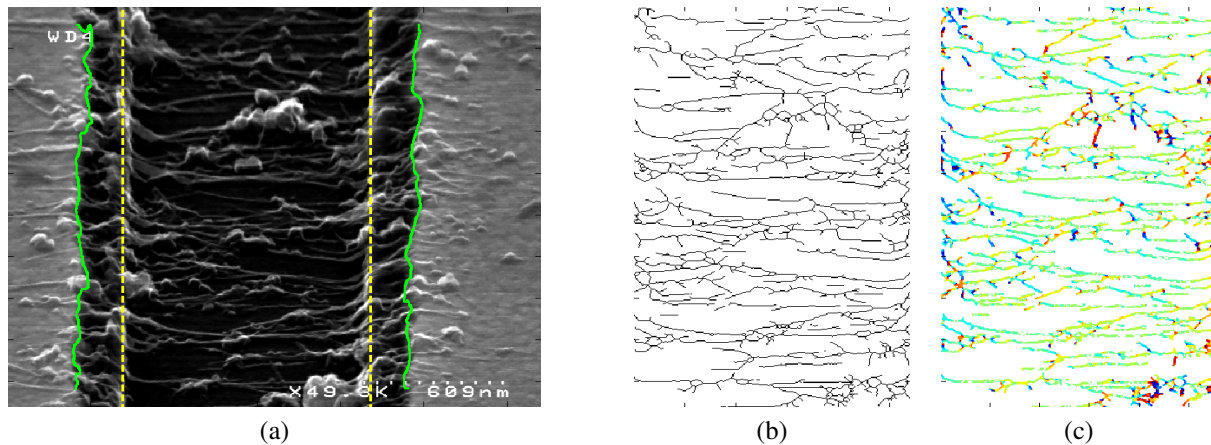


FIGURE 1 – (a) Image MEB d’une membrane de nanotubes déposés entre deux électrodes en or. Les électrodes (contours verts) sont les régions brillantes à gauche et à droite. La région d’intérêt se trouve entre les lignes pointillées jaunes ; (b) squelette des nanotubes dans la région d’intérêt ; (c) la couleur code l’orientation locale par rapport à l’horizontale, de bleu= $-90^\circ$  à rouge= $90^\circ$ .

utile pour un premier jugement visuel.

La principale contribution de ce travail est la mise en œuvre d’une chaîne de traitement automatisée n’impliquant pratiquement aucune intervention de l’utilisateur et potentiellement utile à d’autres applications. La procédure identifie les caractéristiques quantitatives d’une assemblée d’objets filamenteux. Les nanotubes sont efficacement segmentés dans les images MEB ; leur squelette est identifié avant d’estimer les histogrammes de largeur et d’orientation locale des nanotubes. Plusieurs centaines d’images peuvent ainsi être traitées en peu de temps sans intervention de l’utilisateur. Nous présentons et commentons le résultat obtenus sur un ensemble d’échantillons.

## 2 La chaîne complète de traitement

Ce travail est motivé par le souhait de comparer un ensemble de 660 images MEB de taille  $480 \times 640$ . Lors de l’acquisition, la membrane est inclinée de  $45^\circ$  par rapport au faisceau d’électrons. Certaines images peuvent être franchement bruitées. Nous souhaitons estimer la position mais aussi la largeur et surtout l’orientation locale des nanotubes. Nous nous intéressons uniquement à la partie suspendue des nanotubes, ce qui nécessite la détection des électrodes, voir fig. 1(a).

### 2.1 Pré-traitement des images et segmentation

La première étape est un débruitage par diffusion anisotrope (GREYcstoration) [7] qui préserve remarquablement les bords des électrodes aussi bien que la géométrie filamenteuse des nanotubes. La détection des électrodes, nécessaire pour définir la région d’intérêt -voir fig. 1(a)- est réalisée après un fort débruitage (10 itérations) et convolution par une fonction de forme ”aiguille” verticale de 20 pixels de long et de profil transversal gaussien ( $\sigma = 3$  pixels). Le reste de la procédure utilise les images légèrement débruitées (2 itérations) de façon à ne pas abîmer les nanotubes. La correction du fond non-uniforme

est obtenue grâce à une soustraction du fond morphologique utilisant un disque de rayon 15 pixels comme élément structurant [8]. L’amélioration de contraste utilise une opération de filtrage morphologique. Le principe du filtre est de créer une ouverture de l’image initiale avec chacun des éléments structuraux qui sont ici 16 segments de droites discrets de longueur 17 pixels (largeur maximum typique des nanotubes) et d’orientations régulièrement espacées de  $0^\circ$  à  $180^\circ$ . Chaque élément a pour effet de sélectionner dans l’image les objets possédant la même orientation que lui. L’image finale est obtenue en affectant en chaque pixel la différence des valeurs maximale et minimale sur les 16 images.

L’image est alors normalisée entre 0 et 1 avant un seuillage en niveau de gris. Le seuil peut être fixé à la main ou être optimisé de façon non supervisée entre 0.05 et 0.35 *a priori*. Dans ce dernier cas, il est déterminé itérativement en étudiant l’évolution de la longueur totale du squelette résultant lorsque le seuil augmente à partir de la valeur minimale. Lorsque le seuil est suffisamment élevé pour n’être sensible pratiquement qu’aux nanotubes, cette longueur varie peu. Ainsi on évite le réglage d’un seuil par l’utilisateur. Nous utilisons alors des opérations classiques de morphologie mathématique [8] (fonction MATLAB `bwmorph`) pour ne conserver que le squelette de l’image obtenue (option `thin`) et éliminer les points isolés (option `clean`).

### 2.2 Estimation des histogrammes d’orientation locale

Nous déterminons l’orientation locale des nanotubes après un lissage par une gaussienne à l’échelle 1,5 pixel. Pour une image  $f(x_1, x_2)$ , l’estimation de l’orientation du premier vecteur propre associé à la plus grande valeur propre du tenseur de structure  $\mathbf{S} = (\partial_i f \partial_j f)_{1 \leq i, j \leq 2}$  fournit cette information. On peut montrer qu’il s’agit de la direction du gradient orienté

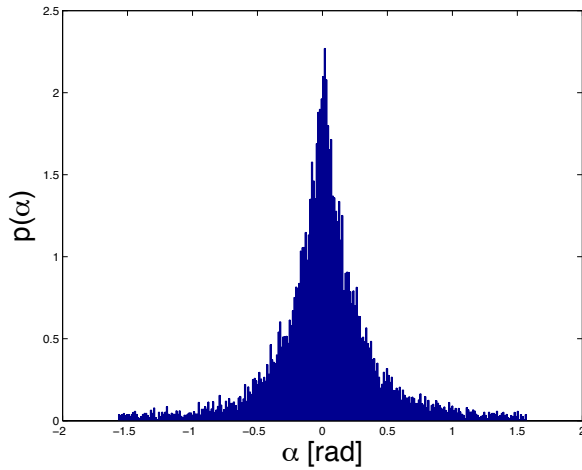


FIGURE 2 – Histogramme des orientations d’une image. Une telle distribution piquée est caractéristique d’un bon alignement.

maximal [9]. Nous utilisons l’implémentation de G. Peyré<sup>1</sup>. Cette estimation est ensuite lissée par un noyau gaussien à l’échelle 3 pixels horizontalement et 1 pixel verticalement. Remarquons que la représentation du squelette des nanotubes est notablement améliorée par le codage couleur des orientations de bleu ( $-90^\circ$ ) à rouge ( $+90^\circ$ ), voir fig. 1(c). Les histogrammes sont calculés pour 256 directions linéairement espacées  $-90^\circ < \alpha \leq 90^\circ$  autour de l’horizontale correspondant à  $0^\circ$ .

Nous avons ensuite tenu compte de l’inclinaison de l’échantillon à  $45^\circ$  autour d’un axe horizontal pendant l’acquisition MEB pour estimer correctement les orientations locales qui sont affectées par cette projection. Il faut aussi en tenir compte dans l’évaluation des histogrammes puisque le poids réel en longueur associée à un pixel d’orientation donnée dépend de l’orientation locale du nanotube. Soit  $\beta$  l’angle entre le plan de l’échantillon et le plan de l’image. Soit  $\alpha$  (resp.  $\alpha'$ ) l’orientation locale dans chacun des plans. On a la relation

$$\alpha = \arctan \left( \frac{\tan \alpha'}{\cos \beta} \right)$$

qui permet de déterminer l’orientation dans le plan de l’échantillon en fonction de l’orientation estimée dans l’image. L’histogramme est initialement estimé en pourcentage du nombre total de pixels. Cependant chaque pixel du squelette de l’image correspond à une longueur effective de nanotube qui dépend de son orientation, les éléments verticaux étant sous-estimés. L’histogramme qui est physiquement pertinent s’exprime en pourcentage de la longueur totale cumulée des nanotubes segmentés. Pour tenir compte de la correction nécessaire nous introduisons un facteur de pondération correspondant au rapport entre la longueur  $\ell$  d’un filament dans le plan de l’échantillon et sa longueur apparente  $\ell'$  dans le plan de l’image. Ce rapport vaut

$$\sqrt{\frac{(1+\tan^2 \alpha)}{(1+\tan^2 \alpha \cos^2 \beta)}}$$

1. [www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/5103](http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/5103)

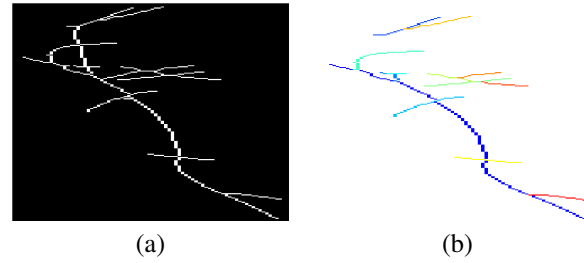


FIGURE 3 – (a) Skeleton of intersecting filaments ; (b) each color corresponds to an individual filament.

### 2.3 Indicateurs statistiques pertinents

Nous pouvons désormais définir des indicateurs quantitatifs et objectifs de qualité d’alignement des arrangements de nanotubes. La surface de l’histogramme avant normalisation correspond à la longueur totale du squelette. Le rapport entre cette quantité et la largeur de l’image définit un nombre moyen de nanotubes dans l’image ; rapporté à la hauteur de l’échantillon observé nous obtenons une densité moyenne de nanotubes par unité de longueur des électrodes, une quantité usuelle de la littérature en nanotechnologie. La qualité de l’alignement des nanotubes est habituellement caractérisée par le paramètre d’ordre  $\langle \cos^2 \alpha \rangle$  issu des mesure de polarisation de la lumière [10]. Ce paramètre vaut 1 pour un alignement parfait et 0,5 pour une distribution uniformément isotrope. Ce paramètre n’est pas très sensible au caractère plus ou moins piqué de la distribution de  $\alpha$  puisque la dérivée de  $\cos^2 \alpha$  est nulle en 0. Nous utiliserons par conséquent des indicateurs tels que l’écart-type mais surtout la proportion (en longueur réelle) de nanotubes pointant dans un secteur angulaire donné autour de l’horizontale, par exemple  $\pm 20^\circ$ . Ce dernier indicateur est bien plus informatif. Ni l’écart-type ni le paramètre d’ordre ne rendent compte de la forme plus ou moins piquée des histogrammes.

Nous avons testé notre procédure sur des images synthétiques contenant des segments de droite d’orientation, d’intensité et de longueur variables. Les incertitudes estimées sont de l’ordre de  $2^\circ$  pour les orientations et de 2% pour les longueurs. Nous avons aussi utilisé des images contenant des morceaux de nanotubes extraits des observations expérimentales et paraissant horizontaux. L’écart-type est alors de  $9^\circ$  et 96% des orientations sont comprises dans le secteur  $\pm 20^\circ$  pour un paramètre d’ordre  $\langle \cos^2 \alpha \rangle = 0,97$ . Ces valeurs serviront de référence et seront considérées comme un alignement optimal.

### 2.4 Extraction de filaments individuels

Nous souhaitons également identifier les filaments individuellement. Une première approche en ce sens repose sur le suivi de particules inertielles se déplaçant le long du squelette. Les filaments isolés sont facilement identifiés par un simple étiquetage des composantes connexes du squelette. Les difficultés apparaissent lorsque plusieurs filaments se croisent, sans structure a priori. Dans ces régions où apparaît au moins 1 inter-

section nous utilisons la procédure itérative suivante. On lance une particule à une l'extrémité (1-connectivité) avec une vitesse  $\mathbf{v}_0$  selon l'orientation locale estimée. Au pas de temps  $n$ , la particule se déplace vers le pixel le plus proche (s'il existe) dans un secteur de  $\pm 45^\circ$  sur le squelette. La mémoire inertielle de la particule est introduite en posant  $\mathbf{v}_n \leftarrow \sum_{k=0:3} h_k \mathbf{v}_{n-k}$  avec  $h_k = 1/2^k$ ; on impose ensuite  $\|\mathbf{v}_n\| = 1$ . On considère qu'un filament individuel est extrait lorsqu'une autre extrémité est atteinte. On itère jusqu'à ce que toute la région connexe ait été visitée. La figure 3 illustre le résultat de cette procédure sur un exemple. Cette méthode ne fonctionne pour l'instant efficacement que pour des distributions peu denses de nanotubes. Nous explorons la possibilité de traiter des images plus complexes.

### 3 Application et résultats

Le traitement de chaque image ne prend que quelques secondes, sans intervention de l'utilisateur pour un ensemble de 660 images traitées en quelques dizaines de minutes sur un PC. Cette analyse indispensable est ainsi considérablement simplifiée fournit des informations précieuses. Nous avons ainsi pu déterminer une densité verticale moyenne de 19 nanotubes/ $\mu\text{m}$ . Nous avons observé des histogrammes d'orientation le plus souvent piqués autour de 0 (non gaussiens, voir fig. 2) avec un paramètre d'ordre  $\langle \cos^2 \alpha \rangle$  variant de 0.5 (distribution isotrope) à 0.93 (alignement horizontal quasi-parfait) pour des écarts-types variant de  $50^\circ$  à  $13^\circ$ . Ces valeurs se comparent très favorablement aux meilleurs résultats de la littérature en nanotechnologie, confirmant l'intérêt des nanomembranes étudiées. Les histogrammes permettent une caractérisation bien plus riche et précise de ces nanomembranes que les techniques usuelles utilisant des mesures de polarisation.

Par exemple, 40 images présentent un même paramètre d'ordre  $\langle \cos^2 \alpha \rangle = 0,80$ . Les mesures de polarisation ne permettraient pas de les distinguer. Pourtant les histogrammes d'orientation sont significativement différents puisque les écarts-types varient de  $25^\circ$  à  $31^\circ$  et que la proportion comprise dans le cône  $\pm 20^\circ$  varie de 50% à 62%. Une distribution gaussienne donnerait une proportion de 58% dans le cône  $\pm 20^\circ$  pour un écart-type de  $25^\circ$ . Pour la plupart de ces 40 images la distribution des orientations est très piquée et 80% des dépôts de nanotubes présentent un alignement bien meilleur que celui d'une distribution gaussienne. Cet exemple met en évidence la richesse et l'intérêt de l'information fournie par les histogrammes d'orientation au-delà du seul paramètre d'ordre  $\langle \cos^2 \alpha \rangle$  usuel.

### 4 Conclusion

La procédure de traitement d'images de nanotubes de carbone en microscopie électronique présentée fournit une estimation précise de la distribution des orientations locales des nanotubes de manière non supervisée et applicable à des centaines d'images en quelques minutes. Le pré-traitement est un

débruitage anisotrope préservant les structures filamenteuses suivi d'une correction du fond non-uniforme et d'un rehaussement de contraste impliquant des outils de morphologie mathématique. La segmentation des nanotubes est alors possible par simple seuillage en niveau de gris des images renormalisées. Une combinaison d'opérations morphologiques permet d'extraire le squelette des nanotubes. Enfin les orientations locales sont estimées à partir de l'orientation du premier vecteur propre du tenseur de structure. La géométrie du dispositif d'acquisition est prise en compte pour estimer correctement les histogrammes d'orientation malgré les effets de projection. Nous avons montré la pertinence et l'intérêt des indicateurs statistiques produits sur un ensemble d'images. Cette méthode va permettre de valider et de poursuivre l'amélioration systématique du procédé de fabrication de nanomembranes destinées à la conception de nanocapteurs pour le génie civil.

### Références

- [1] B. Lebental et al., "Carbon nanotubes based ultrasonic microtransducers for durability monitoring in civil engineering," to appear in *Eur. J. of Env. Civ. Eng.*, 2011.
- [2] J.M. Russel et al., "Alignment of nematic liquid crystals using carbon nanotubes films," *Thin Solid films*, vol. 509, pp. 53–57, 2006.
- [3] E. Meijering et al., "Neurite tracing in fluorescence microscopy images using ridge filtering and graph searching : principles and validation," in *IEEE Int. Symp. on Biomed. Im.*, April 2004, vol. 2, pp. 1219–1222.
- [4] B. Bödvarsson et al., "A morphological image processing method for locating myosin filaments in muscle electron micrographs," *Im. Vis. Comp.*, vol. 26, no. 8, pp. 1073–1080, 2008.
- [5] C. Kirbas and F.K.H. Quek, "Vessel extraction techniques and algorithms : a survey," in *3rd IEEE Symp. on Bioinfo. & Bioeng.*, 2003, pp. 238–245.
- [6] I. Laptev et al., "Automatic extraction of roads from aerial images based on scale space and snakes," *Mach. Vis. & App.*, vol. 12, pp. 23–31, 2000.
- [7] D. Tschumperlé, "Fast anisotropic smoothing of multi-valued images using curvature-preserving PDE's," *Int. J. of Comp. Vis.*, vol. 68, no. 1, pp. 65–82, 2006.
- [8] P. Soille, *Morphological image analysis*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1999.
- [9] E. Fonck et al., "Effect of Aging on Elastin Functionality in Human Cerebral Arteries," *Stroke*, vol. 40, no. 7, pp. 2552–2556, 2009.
- [10] J. Lagerwall et al., "Nanotube alignment using lyotropic liquid crystals," *Adv. Mater.*, vol. 19, pp. 359–364, 2007.