



**HAL**  
open science

# Morphométrie de structures cellulaires biologiques partiellement observées par imagerie 3D

David Legland

► **To cite this version:**

David Legland. Morphométrie de structures cellulaires biologiques partiellement observées par imagerie 3D. Modélisation et simulation. Université René Descartes - Paris V, 2005. Français. NNT : . tel-00081554

**HAL Id: tel-00081554**

**<https://theses.hal.science/tel-00081554>**

Submitted on 23 Jun 2006

**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.

UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES - PARIS 5  
Centre Universitaire des Saint-Pères  
UFR DE MATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE

---

*Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de  
Docteur de l'Université RENÉ DESCARTES - PARIS 5*

Discipline : Sciences de la Vie et de la Matière  
Spécialité : Mathématiques Appliquées

par David LEGLAND

Sujet de la thèse :

**Morphométrie de structures cellulaires  
biologiques partiellement observées  
par imagerie 3D**

Soutenue le 16 Décembre 2005 devant le jury composé de :

Mr	de Baerdemaeker	Josse	Rapporteur
Mr	Jeulin	Dominique	Rapporteur
Mme	Graffigne	Christine	Directrice
Mr	Kiêu	Kiên	Encadrant
Mme	Devaux	Marie-Françoise	Encadrante
Mr	Dendievel	Rémy	Examineur



# Remerciements

Je tiens à remercier avant tout ma directrice de thèse, Christine Graffigne (Université René Descartes, Paris 5), qui m'a donné l'opportunité d'entreprendre ce travail de recherche, et de participer à la construction des liens entre des thèmes de recherche méthodologiques, et des problématiques biologiques, deux domaines assez opposés, mais qui ne peuvent s'ignorer.

Je souhaite aussi exprimer toute ma reconnaissance à mes deux encadrants, Marie-Françoise Devaux et Kiên Kiêu, qui ont su me conseiller et m'orienter avec beaucoup de pertinence, et qui ont toujours été disponibles tout au long de ces trois années. Leurs conseils éclairés et leurs remarques constructives m'auront beaucoup apporté, et ont vraiment été appréciés.

Je remercie également les autres membres du Jury, et particulièrement les rapporteurs, Dominique Jeulin et Josse de Baerdemaeker. Ils ont pris le temps de lire et d'analyser ce long manuscrit, et leurs recommandations sur la forme finale ont aussi été très utiles. Merci aussi à Rémy Dendievel, dont le point de vue permet d'apporter un éclairage nouveau sur le sujet.

Tous mes remerciements également aux membres de mon comité de thèse, Christian Lantuéjoul, Jean-Michel Leban, et Frédéric Mabile, dont les discussions et les commentaires ont permis d'approfondir les réflexions, et d'éclairer certains points délicats.

Mes quelques années au sein de l'unité de Jouy-en-Josas auront été personnellement très riches, et j'ai pris beaucoup de plaisir à côtoyer les différents membres de l'équipe MIA, et parfois à partager des passions communes (les photographes et plieurs de papier se reconnaîtront !). La disponibilité des uns et des autres a aussi été très généreuse (merci en particulier à Eric et Suzanne pour l'aide informatique et pour  $\text{\LaTeX}$ ). Un grand merci aussi aux stagiaires et non-permanents de l'unité, avec lesquels j'ai partagé de nombreux moments sympathiques : Fanny, Mohammed, Sergio, Kevin, Jessica, Cédric (et tous les autres...), et particulièrement Agnès, qui a vécu le stress de sa thèse en même temps que la mienne. Merci aussi aux collègues nantais, que j'ai moins souvent rencontrés, mais qui sont tout aussi accueillants.

Enfin je voudrais remercier ma famille et mes amis, parfois géographiquement plus éloignés, qui ont su être présents quand il le fallait, en particulier les anciens de la 51ème, et les nostalgiques du BS3.



# Table des matières

<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Le péricarpe de tomate</b>	<b>15</b>
2.1	La tomate produit modèle . . . . .	17
2.2	Le fruit de tomate . . . . .	18
2.3	Structure du péricarpe . . . . .	18
2.4	Texture sensorielle et propriétés mécaniques . . . . .	21
2.5	Modélisation des propriétés mécaniques . . . . .	23
2.6	Imagerie du péricarpe de tomate . . . . .	24
<b>3</b>	<b>Structures cellulaires et ensembles aléatoires</b>	<b>27</b>
3.1	Représentation ensembliste . . . . .	29
3.2	Caractérisation morphométrique . . . . .	31
3.3	Modélisation stochastique . . . . .	36
<b>4</b>	<b>Estimation dans le cas d'un échantillonnage non uniforme</b>	<b>41</b>
4.1	Protocole d'échantillonnage . . . . .	44
4.2	Estimation des paramètres morphométriques . . . . .	46
4.3	Cas d'une sonde perpendiculaire à une surface . . . . .	47
4.4	Calcul pour une structure du plan . . . . .	49
4.5	Extension au cas tridimensionnel . . . . .	53
4.6	Vérification sur un exemple simple . . . . .	61
4.7	Cas d'une surface de révolution . . . . .	62
<b>5</b>	<b>Mesures dans des images discrètes</b>	<b>67</b>
5.1	Discrétisation de l'espace . . . . .	69
5.2	Mesure du volume . . . . .	72
5.3	Mesure de la caractéristique d'Euler-Poincaré . . . . .	72
5.4	Surface et épaisseur moyenne . . . . .	74
5.5	Implémentation algorithmique . . . . .	77
5.6	Rose des normales . . . . .	81
5.7	Exemple d'application sur le pain . . . . .	85
<b>6</b>	<b>Estimation de surface par coupes verticales</b>	<b>91</b>
6.1	Échantillonnage par coupes verticales . . . . .	93
6.2	Estimation de surface par mesure d'angles . . . . .	94

---

6.3	Implémentation discrète . . . . .	96
6.4	Amélioration de l'estimateur discret . . . . .	98
6.5	Application à une sphère . . . . .	100
6.6	Application à un modèle booléen . . . . .	103
6.7	Discussion . . . . .	106
<b>7</b>	<b>Imagerie et morphométrie des cellules du péricarpe</b>	<b>109</b>
7.1	Choix des variétés . . . . .	111
7.2	Modélisation de la surface de chaque tomate . . . . .	112
7.3	Acquisition des images de péricarpe . . . . .	117
7.4	Amélioration des images . . . . .	121
7.5	Segmentation des particules de péricarpe . . . . .	127
7.6	Traitements additionnels . . . . .	128
7.7	Exemple d'images segmentées . . . . .	129
7.8	Extraction des paramètres morphologiques . . . . .	133
<b>8</b>	<b>Analyse des résultats</b>	<b>139</b>
8.1	Variétés Cameron et Quest . . . . .	141
8.2	Lignées sauvage et mutante DR12 . . . . .	149
<b>9</b>	<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>165</b>

# Table des figures

2.1	Structure du fruit de tomate. . . . .	19
2.2	Hétérogénéité du péricarpe de tomate . . . . .	19
2.3	Structure interne d'une cellule végétale . . . . .	20
2.4	Approche hiérarchique pour décrire la texture . . . . .	22
2.5	Observations de péricarpe de tomate à différentes échelles. . . . .	24
2.6	Schéma de principe d'un microscope confocal. . . . .	25
3.1	Ensembles de portée positive. . . . .	30
3.2	Courbures principales d'un morceau de surface. . . . .	31
3.3	Calcul de l'élongation d'une fibre épaisse. . . . .	32
3.4	Nombre de tunnels d'une structure. . . . .	33
3.5	Diamètre projeté d'un ensemble 3D. . . . .	35
3.6	Définition des densités dans le cas du péricarpe de tomate . . . . .	38
3.7	Méthode de rose des intercepts . . . . .	39
3.8	Mesure directionnelle d'un ensemble . . . . .	40
4.1	Illustration du concept d'échantillonnage non uniforme. . . . .	44
4.2	Échantillonnage du péricarpe de tomate. . . . .	45
4.3	Échantillonnage d'un point dans une structure du plan. . . . .	50
4.4	Paramétrisation locale de la courbe d'échantillonnage . . . . .	51
4.5	Condition d'échantillonnage en 3D . . . . .	54
4.6	Probabilité d'échantillonnage en 3D . . . . .	55
4.7	Approximation numérique de la probabilité d'échantillonnage . . . . .	62
4.8	Courbe génératrice d'une surface de révolution . . . . .	63
4.9	Surface de révolution obtenue à partir d'une courbe. . . . .	64
4.10	Surface des points à une profondeur $p$ . . . . .	65
5.1	Discrétisation gaussienne d'une structure . . . . .	70
5.2	Reconstruction par complexes cellulaires . . . . .	71
5.3	Contributions élémentaires à la caractéristique d'Euler-Poincaré. . . . .	73
5.4	Indépendance de la division des complexes . . . . .	73
5.5	Les pondérations des 26 directions élémentaires . . . . .	75
5.6	Configurations diagonales dans un cube . . . . .	77
5.7	Numérotation des pixels d'une configuration 3D. . . . .	78
5.8	Numérotation de la position des mailles dans l'image . . . . .	79
5.9	Exemples de configurations de $3 \times 3$ pixels . . . . .	81

5.10	Calcul de la direction la plus probable. . . . .	82
5.11	Mesure directionnelle sur des objets de forme simple. . . . .	84
5.12	Calcul du corps de Blaschke sur une coupe de cellules végétales . . . . .	84
5.13	Exemple de mesures directionnelles 3D . . . . .	85
5.14	Acquisition 3D de pâte à pain. . . . .	86
5.15	Profils de densité de la structure du pain . . . . .	87
5.16	Roses des normales 3D du pain . . . . .	88
6.1	Échantillonnage d'une structure par des coupes verticales. . . . .	94
6.2	Estimation de la densité surfacique utilisant les angles . . . . .	95
6.3	Modification de l'estimateur de densité surfacique . . . . .	96
6.4	Détermination de l'angle par ajustement de droite. . . . .	97
6.5	Étendue possible des droites séparatrices. . . . .	99
6.6	Estimation pondérée par la distance de séparation. . . . .	100
6.7	Estimation de surface pour un système de sphères. . . . .	102
6.8	Amélioration de l'estimateur de densité surfacique. . . . .	103
6.9	Coupe verticale d'un modèle booléen 3D . . . . .	105
6.10	Densités théoriques et estimées du modèle booléen. . . . .	106
7.1	Différences entre les lignées sauvages et antisens. . . . .	112
7.2	Coupes de quartiers de tomate . . . . .	113
7.3	Segmentation du contour d'un quartier de tomate. . . . .	113
7.4	Transformation du contour en courbe. . . . .	114
7.5	Approximation du contour moyen par une courbe polynomiale . . . . .	115
7.6	Courbures principales en fonction de la distance géodésique. . . . .	116
7.7	Calcul de la probabilité d'échantillonnage dans le péricarpe de tomate. . . . .	116
7.8	Succession de coupes optiques de la même pile d'image. . . . .	118
7.9	Différentes images de piles successives . . . . .	119
7.10	Images de la séquence précédente après collage. . . . .	119
7.11	Images recollées des variétés Cameron et Quest . . . . .	122
7.12	Images recollées de la lignée antisens . . . . .	123
7.13	Images recollées de la lignée sauvage . . . . .	124
7.14	Correction de la baisse de luminosité en profondeur. . . . .	125
7.15	Rehaussement de l'image des lignes par filtrage max-médian. . . . .	126
7.16	Amélioration de l'image avec des filtres morphologiques. . . . .	126
7.17	Segmentation des particules du péricarpe. . . . .	128
7.18	Problème de détermination de la CEP d'une particule. . . . .	129
7.19	Images segmentées des variétés Cameron et Quest . . . . .	130
7.20	Images segmentées de la lignée antisens . . . . .	131
7.21	Images segmentées de la lignée sauvage . . . . .	132
8.1	Profil de densité. . . . .	144
8.2	Profils moyens de densité surfacique (Cameron et Quest). . . . .	145
8.3	Vecteurs propres de la densité surfacique . . . . .	146
8.4	Rose des directions 3D d'une traversée de péricarpe. . . . .	147
8.5	Rose des directions sur des coupes planes . . . . .	148

---

8.6	Traversées des variétés Cameron et Quest . . . . .	148
8.7	Influence de la position géodésique sur l'épaisseur du péricarpe. . . . .	149
8.8	Coupes de quartiers des lignées antisens et sauvage. . . . .	150
8.9	Traversées des lignées antisens et sauvage . . . . .	152
8.10	Profils moyens de densité surfacique relative (DR12) . . . . .	153
8.11	Profils moyens des densité de nombre et d'épaisseur (DR12) . . . . .	153
8.12	Vecteurs propres de l'analyse en composantes principales . . . . .	154
8.13	Profils de longueurs fixe moyens pour les deux lignées. . . . .	156
8.14	Carte de ressemblance des profils de surface tronqués. . . . .	157
8.15	Vecteurs propres des profils de surface tronqués . . . . .	158
8.16	Profils de densité surfacique obtenus par les coupes verticales. . . . .	159
8.17	Vecteurs propres pour la densité surfaciques dans des coupes verticales. . . . .	161
8.18	Vecteurs propres des profils tronqués sur coupes verticales . . . . .	162
8.19	Représentation par zonoïdes équivalents . . . . .	163

# Liste des tableaux

5.1	Synthèse des contributions de chaque configuration. . . . .	89
5.2	Synthèse des contributions de chaque configuration. . . . .	90
6.1	Calcul des angles correspondants à des configurations de $3 \times 3$ pixels. . . . .	97
6.2	Comparaison des estimateurs de densité surfacique . . . . .	99
7.1	Taille des images après collage et sélection des épaisseurs utiles . . . . .	120
8.1	Résultats des acquisitions sur la variété Cameron . . . . .	141
8.2	Résultats des acquisitions sur la variété Quest . . . . .	142
8.3	Analyse de variance pour les tomates Cameron et Quest. . . . .	142
8.4	Analyse de variance de la densité surfacique Cameron et Quest. . . . .	146
8.5	Analyse de variance pour l'épaisseur des tomates DR12. . . . .	150
8.6	Résultats moyens pour DR12 . . . . .	151
8.7	Analyse de variance globale pour DR12 . . . . .	151
8.8	Résultats de l'analyse de variance pour les profils de surface relatifs . . . . .	155
8.9	Résultats de l'analyse de variance pour les profils de surface tronqués. . . . .	156
8.10	Analyse de variance des profils obtenus par coupes verticales. . . . .	160

# Chapitre 1

## Introduction

### Propriétés mécaniques et sensorielles des matériaux

La maîtrise des propriétés mécaniques des matériaux est un enjeu crucial dans de nombreux domaines. On cherche à expliquer les propriétés macroscopiques d'un matériau par la combinaison de sa structure, et des propriétés des éléments qui constituent cette structure.

Cette approche est bien sûr omniprésente en science des matériaux Fazekas et al. (2002); Gibson et Ashby (1997); Zhu et al. (2001); Zhu et Windle (2002), qui reste le domaine privilégié pour ce genre d'études. La démarche s'est aussi montrée pertinente dans d'autres types d'applications. En médecine, par exemple, on cherche à expliquer les risques de fractures osseuse en fonction du changement de la structure de l'os (van Lenthe et Huiskes, 2002; Majumdar et al., 1998; Nicholson et al., 1997), ou à surveiller le développement des vaisseaux capillaires (Barber et al., 2003; Munn, 2003). En exploitation forestière, on s'intéresse aux relations entre la qualité du bois et sa structure cellulaire depuis plus de 50 ans (Wardrop, 1951), mais la question reste toujours d'actualité (Thibaut et al., 2001; Perré et Badel, 2003; Badel et Perré, 2001).

Depuis quelques années, une démarche similaire est entreprise dans le domaine agro-alimentaire, notamment afin d'expliquer le comportement mécanique ou la texture sensorielle des aliments, en se basant sur la morphologie et l'organisation des éléments qui les constituent. On trouve des études sur le comportement en réponse à la fragmentation des graines de céréales (Antoine et al., 2003), la propagation de fractures dans la pomme de terre (Konstankiewicz et Zdunek, 2001; Konstankiewicz et al., 2001a), l'organisation des fibres du muscle pour expliquer la tendreté de la viande (Li et al., 1999), la structure alvéolaire du pain pour expliquer ses propriétés mécaniques (Zghal et al., 2002; Scanlon et Zghal, 2001), ou la granularité de la crème glacée (Bron et Jeulin, 2004).

L'objectif de ces études est de comprendre les relations existant entre la structure et les propriétés mécaniques ou sensorielles. Les applications envisagées sont l'amélioration de la qualité finale en agissant sur la structure des produits.

### Hypothèses de travail

Dans cette thèse, on s'intéresse plus particulièrement aux paramètres permettant d'expliquer la texture sensorielle et les propriétés mécaniques des fruits charnus tels que la

tomate, la pomme, l'abricot, la pêche... Si les paramètres de saveur et d'arôme peuvent être assez bien expliqués par la composition biochimique, les paramètres de texture sensorielle ne sont pas corrélés de manière sensible à cette composition.

La chair des fruits étant constituée de cellules, l'hypothèse la plus naturelle est que le nombre, la taille, la forme ainsi que l'organisation spatiale des cellules interviennent dans la définition de leur texture sensorielle ou de leurs propriétés mécaniques. Cette hypothèse, formulée déjà par Reeve (1970), est régulièrement reprise depuis (par exemple par l'équipe de Jackman (Jackman, 1995; Jackman et Stanley, 1995)), mais elle n'a jamais été démontrée clairement.

Par analogie avec d'autres types de matériaux cellulaires, le comportement mécanique d'un tissu dépendrait à la fois de la morphologie cellulaire et du comportement mécanique individuel des cellules (Gibson et Ashby, 1997; Gibson, 2005). De même la morphologie individuelle des cellules, ainsi que leurs propriétés mécaniques, résulteraient en partie de la structure et des propriétés des parois (Smith, 2003). Une particularité du matériel végétal par rapport aux matériaux de type industriel est l'hétérogénéité de sa structure. Les cellules des végétaux assument différents rôles (stockage, maintien de la plante, alimentation...), ce qui leur confère des formes et des tailles variées. Cette variabilité dépend en grande partie de l'architecture globale de la plante.

Cette complexité hiérarchique nécessite de modéliser les connaissances acquises à plusieurs échelles, afin de synthétiser l'ensemble dans une démarche intégrative. L'apport de connaissances à une échelle donnée permettrait ainsi de préciser les modèles des niveaux supérieurs, et d'ouvrir de nouvelles perspectives d'investigation, ou de validation des modèles, pour les niveaux d'échelles plus fins.

## Observation de la structure cellulaire

Une des échelles a priori les plus importantes vis-à-vis des paramètres mécaniques et sensoriels est la structure cellulaire, ainsi que son hétérogénéité au sein de la plante. La quantification de cette structure nécessite la mise en œuvre de techniques d'observation et d'analyse des images acquises. L'approche la plus courante consiste à acquérir des images 2D à partir de coupes histologiques. Les paramètres extraits décrivent le plus souvent la morphologie des cellules en 2D. Toutefois, les propriétés mécaniques et sensorielles dépendent de l'organisation spatiale et de la morphologie tridimensionnelle des cellules et des tissus.

Assez peu de travaux ont été publiés concernant l'analyse tridimensionnelle de la structure cellulaire des végétaux (Gray et al., 1999). La difficulté tient à la fois dans l'acquisition d'images 3D de la structure qui soient de bonne qualité, et dans l'extraction de paramètres morphométriques à partir de ces images. Une alternative est d'estimer les paramètres tridimensionnels à partir de mesures effectuées sur des images 2D, plus simples à obtenir. Les méthodes rendant possible ce passage du 2D au 3D sont du ressort de la stéréologie, une discipline qui puise ses racines à la fois dans les statistiques et la géométrie (Weibel, 1979; Gundersen, 1986; Baddeley et Jensen, 2005).

Les dispositifs d'acquisition tels que la microscopie confocale permettent d'obtenir des images en 3 dimensions (voire 4 ou 5, en tenant compte du temps ou de la longueur d'onde utilisée), qui donnent directement accès à des mesures 3D de la morphologie des structures. Un des intérêts de cette technique est qu'elle permet d'obtenir des observations 3D de

matériel biologique frais (voire vivant), avec un minimum de préparation. Le champ de vue en  $x$ - $y$  des images acquises varie entre quelques centaines de microns et 1 mm, pour une résolution de l'ordre du micron.

## Quantification de la structure

La microscopie confocale permet d'obtenir des observations en 3D pour une profondeur maximale de 150 à 200 microns. La taille des cellules végétales peut être très grande, notamment dans le cas des cellules de stockage, ce qui rend leur observation difficile. Peu de cellules sont visibles sur une image, et le tissu ne peut être observé intégralement. Les cellules peuvent même être trop grandes pour être entièrement observées en 3D. On parle donc d'observation partielle de la structure en 3D. Dans ce cas, malgré l'observation tridimensionnelle, il est nécessaire de mettre en œuvre des techniques issues de la stéréologie pour accéder aux paramètres morphologiques 3D de la structure.

Cela implique de sélectionner un nombre fixé d'échantillons, qui soient représentatifs de la structure à caractériser. Cet échantillonnage requiert une grande attention, pour garantir la plus grande uniformité possible, selon la position, mais aussi selon l'orientation des observations. L'établissement d'un protocole d'échantillonnage fait appel à des considérations statistiques, afin de déterminer la position relative des observations par rapport à la structure à caractériser (Cochran, 1977; Cruz-Orive et Weibel, 1981; Gundersen et al., 1999), ainsi qu'à des considérations pratiques propres le plus souvent au matériel utilisé.

La quantification de la morphologie cellulaire observée dans les images est réalisée par analyse d'images. Dans le but de traiter des séries importantes d'images, des procédures automatiques ne faisant pas ou peu intervenir l'opérateur sont recherchées. Elles nécessitent en général des développements méthodologiques spécifiques. Les images acquises doivent être travaillées afin de corriger les problèmes d'acquisition, réduire le bruit, ou améliorer la visibilité des structures d'intérêt. Il faut ensuite disposer d'algorithmes adéquats pour reconnaître la structure, et en produire une représentation qui soit exploitable informatiquement.

De plus, du fait de la nature numérique des images, les mesures géométriques continues nécessitent d'être adaptées à des informations de nature discrète. Les mesures de périmètre, surface, ou nombre, si elles ne sont pas effectuées correctement, peuvent mener à des résultats biaisés (Serra, 1982; Ohser et Mücklich, 2000; Klette et Rosenfeld, 2004).

## Notre démarche

L'objectif de la thèse est de définir des méthodes et des paramètres permettant de quantifier la morphologie cellulaire tridimensionnelle de produits biologiques observés par imagerie 3D, dans le cas où la technique d'observation ne permet pas une visualisation complète des structures d'intérêt. Nous avons axé les développements autour d'un cas concret : la caractérisation du péricarpe de tomate, qui correspond à la partie charnue du fruit, tout en ayant une démarche suffisamment générique pour pouvoir être adaptée à d'autres types de matériaux cellulaires.

Nous avons fait le choix de travailler sur du matériel frais, afin de limiter les déformations de structure dues à la préparation. Nous avons choisi de décrire la structure des cellules

du péricarpe de tomate en utilisant le formalisme des ensembles aléatoires. Le fait de ne pas considérer les cellules individuellement, mais au contraire l'ensemble des cellules en tant que matériau est relativement original en biologie cellulaire. Cette approche permet de caractériser non seulement la forme moyenne des cellules, mais aussi de tenir compte de la variabilité naturelle. De plus, les paramètres géométriques peuvent être estimés même lorsque la structure n'est pas entièrement observée.

Nous avons voulu caractériser la morphologie des cellules en fonction de la géométrie du péricarpe. Cela nous a conduit à utiliser un échantillonnage non uniforme de la structure. Nous avons développé des estimateurs adaptés au cas non uniforme, ainsi que leur application à des images discrètes. Le traitement et la segmentation des images 3D de matériaux cellulaires a aussi nécessité des développements spécifiques, qui tiennent compte de la nature cellulaire de la structure.

Il nous a ainsi été possible d'estimer, de manière non biaisée, les propriétés géométriques du matériau. La méthode présentée est générique, et peut s'appliquer à toute structure suffisamment régulière. Ces paramètres morphologiques ont ensuite été estimés sur deux jeux de données correspondant à des variétés de texture sensorielle contrastée, ainsi que des lignées présentant des différences au niveau de la division cellulaire.

## Plan du document

Le chapitre 2 présente la structure d'intérêt choisie : le péricarpe de tomate. Nous introduisons ensuite dans le chapitre 3 le formalisme utilisé pour le décrire, ainsi que les différents paramètres morphologiques 3D retenus.

Le chapitre 4 présente le protocole d'échantillonnage utilisé, et les développements méthodologiques qui nous ont permis d'obtenir des estimateurs sans biais des paramètres morphologiques. Leur implémentation pour des images discrètes 3D est présentée dans le chapitre 5. Le chapitre 6 présente une méthode alternative d'estimation de la surface en utilisant des coupes verticales planes.

Les problèmes d'acquisition, de traitement des images, et de segmentation des zones cellulaires sont traités dans le chapitre 7. Enfin le chapitre 8 présente l'analyse des résultats pour les variétés testées.

# Chapitre 2

## Le péricarpe de tomate

### Contenu

---

<b>2.1</b>	<b>La tomate produit modèle</b>	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>Le fruit de tomate</b>	<b>18</b>
2.2.1	Développement du fruit	18
2.2.2	Composition biochimique	18
2.2.3	Organisation interne du fruit de tomate	18
<b>2.3</b>	<b>Structure du péricarpe</b>	<b>18</b>
2.3.1	Les différents tissus	19
2.3.2	La cellule végétale et sa paroi	20
<b>2.4</b>	<b>Texture sensorielle et propriétés mécaniques</b>	<b>21</b>
2.4.1	La texture sensorielle	21
2.4.2	Propriétés mécaniques	21
2.4.3	Causes de variabilité	22
2.4.4	Influence de la structure cellulaire	22
<b>2.5</b>	<b>Modélisation des propriétés mécaniques</b>	<b>23</b>
<b>2.6</b>	<b>Imagerie du péricarpe de tomate</b>	<b>24</b>
2.6.1	Observation des tissus	24
2.6.2	La microscopie confocale	24
2.6.3	Assemblage d'images en microscopie	26

---



## Introduction

Afin de mutualiser les efforts de recherches, il importe de se limiter à un nombre réduit de produits modèles, particulièrement représentatifs, ou qui présentent un intérêt scientifique ou économique particulier. Cette méthode permet de faciliter la transposition des résultats obtenus par des approches différentes, et offre la possibilité d'appliquer plus facilement à d'autres produits les méthodologies développées ou les résultats connus. Dans le cadre des recherches menées à l'INRA<sup>1</sup>, des produits alimentaires de types variés sont étudiés. Au sein du département CEPIA<sup>2</sup>, les produits modèles choisis sont les solides alvéolaires (pain, biscuits...), le blé, et les fruits charnus (tomate et raisin). Nous avons choisi d'étudier la tomate, qui présente un intérêt économique important.

Caractériser la structure des produits biologiques nécessite de réfléchir aux niveaux de variabilité qui doivent être pris en compte, afin de déterminer une échelle pertinente pour les observations, les variations inhérentes à la structure, et celles considérées comme faisant partie de la variabilité naturelle des mesures. Nous décrivons la structure interne de la tomate, puis nous rappelons l'organisation de la cellule végétale, et de sa paroi.

Nous présentons ensuite les différentes approches entreprises pour caractériser les propriétés mécaniques et sensorielles des produits biologiques. Nous évoquons l'imagerie, qui permet de quantifier la structure pour expliquer ces propriétés. L'utilisation de modèles mécaniques permet de préciser les relations entre les différentes échelles d'observation, mais nécessite de connaître les paramètres morphométriques de la structure. Nous terminons en présentant les techniques d'acquisitions les plus adaptées à l'observation de la structure de la tomate.

## 2.1 La tomate produit modèle

La tomate est le légume le plus consommé en France (12 kg par personne et par an), et le plus cultivé : 90 millions de tonnes sont produites chaque année dans le monde, dont environ 800 000 en France (chiffres du CTIFL<sup>3</sup> (CTIFL, 2000)). C'est un produit très populaire auprès des consommateurs, qui sait en outre se diversifier tant par les variétés (marmande, olivette, cerise ou grappe n'en sont que les plus connues) que par les recettes (à la "croque", en salade, farcie...). C'est donc un produit qui a été choisi naturellement comme modèle de recherche au sein de l'INRA. Elle est étudiée selon différentes approches : génétique (Causse et al., 2004), agronomique (Bertin et al., 2002; Gautier et al., 2005), physico-chimique (Joubès et al., 2000).

Afin d'étudier les propriétés mécaniques et sensorielles de la tomate, nous nous sommes focalisés sur le péricarpe. Sa consistance est en effet la première impression que va ressentir un consommateur de tomate. Les paramètres tels que la résistance de la peau (ou cuticule), la jutosité ou le croquant de la chair sont ici prépondérants. La dureté de la cuticule, ainsi que l'élasticité générale du péricarpe ont également une importance pour déterminer la résistance de la tomate aux aléas du transport et de ses manipulations.

---

<sup>1</sup>Institut National de la Recherche Agronomique

<sup>2</sup>Caractérisation et Élaboration des Produits Issus de l'Agriculture

<sup>3</sup>Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes

## 2.2 Le fruit de tomate

La tomate appartient au groupe des angiospermes, plantes dont les graines sont contenues dans un fruit. La tomate cultivée *Lycopersicon esculentum* Mill., est une dicotylédone de la famille des Solanacées (qui comprend aussi la pomme de terre, le tabac, les piments ou le poivron).

### 2.2.1 Développement du fruit

La tomate en tant que fruit est une baie charnue : elle contient des pépins sans noyau dur. Son développement à partir de l'anthèse (qui correspond à la floraison) peut être divisée en 3 périodes principales (CTIFL, 2000).

La première, qui dure une quinzaine de jours, est une phase de croissance lente, pendant laquelle a lieu la majorité des divisions cellulaires. Le potentiel de croissance se détermine à cette période, en fonction du nombre de cellules qui sont formées (CTIFL, 2000).

La deuxième phase est une phase de croissance rapide du fruit jusqu'au stade appelé vert mature. On observe peu de divisions cellulaires, mais les cellules créées lors de la première phase se développent et accumulent des réserves.

La dernière phase est une phase de maturation, pendant laquelle le fruit évolue jusqu'à sa sénescence. Les cellules ont leur taille définitive : des transformations biochimiques ont lieu qui vont donner la saveur et l'arôme du fruit avant le stade final de la sénescence.

### 2.2.2 Composition biochimique

La tomate est majoritairement (95%) composée d'eau. Cette eau provient principalement de la sève brute en provenance des racines et de la sève élaborée par les feuilles. Elle amène avec elle le saccharose, issu de la photosynthèse, des acides aminés et organiques et des ions (potassium, calcium...). Ces éléments se transforment en différents composés (hexoses, acides, protéine, cellulose...), qui déterminent partiellement le goût et la texture du fruit. La matière sèche est majoritairement constituée de sucres. L'eau crée la pression de turgescence, qui participe au maintien des cellules et à la cohésion du fruit.

### 2.2.3 Organisation interne du fruit de tomate

La tomate est divisée en plusieurs loges (voir la figure 2.1). La zone charnue est le péricarpe. On distingue le péricarpe interne, qui sépare les loges entre elles, et le péricarpe externe, qui protège le fruit du milieu extérieur. Le péricarpe externe est recouvert d'une peau : l'épiderme. Le centre de la tomate est occupé par le placenta. Celui-ci sert de support physique et nourricier aux graines, placées dans un gel protecteur.

## 2.3 Structure du péricarpe

Le péricarpe possède une structure hétérogène (voir la figure 2.2-a). On peut le diviser en trois zones : l'endocarpe, fin et vers l'intérieur, le mésocarpe, charnu et en position intermédiaire, et l'épicarpe, qui correspond à la peau du fruit, et dont la couche la plus externe correspond à l'épiderme. Le mésocarpe est constitué de cellules qui forment plusieurs tissus : le parenchyme et les faisceaux vasculaires.

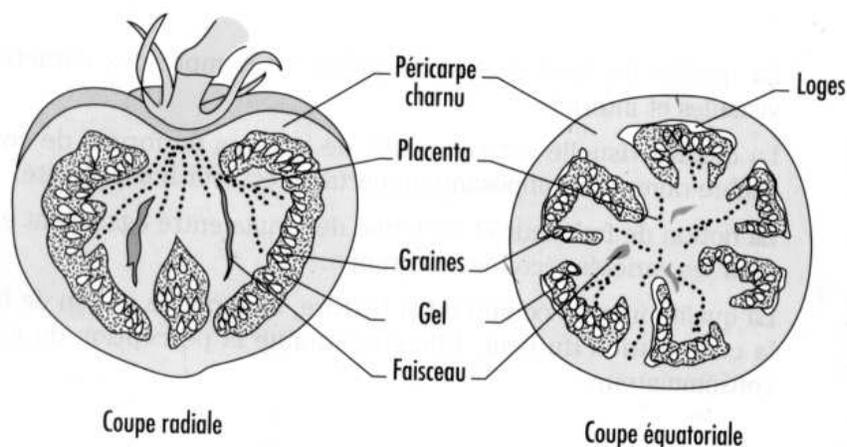


FIG. 2.1 – Structure interne d'une tomate (d'après CTIFL, 2000).

### 2.3.1 Les différents tissus

Le péricarpe est majoritairement constitué de parenchyme. Ces tissus servent de réserve à la plante. Dans le cas de la tomate, les cellules accumulent essentiellement de l'eau. Les cellules parenchymateuses sont souvent de taille importante (jusqu'à 1 mm de longueur pour les plus grosses), et peuvent être de formes variées : arrondies ou allongées, laissant entre elles des méats, ou au contraire de formes polygonales.

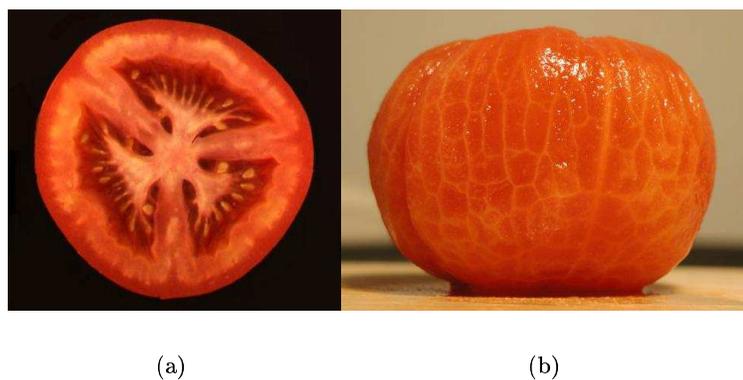


FIG. 2.2 – Hétérogénéité à l'intérieur du péricarpe de tomate. (a) Coupe équatoriale (b) Organisation des faisceaux

Le péricarpe est parcouru par tout un réseau de cellules plus fines et plus rigides, qui assurent le transport des nutriments : les faisceaux de xylème et de phloème. Ces faisceaux sont organisés de manière globalement radiale autour du pédoncule de la tomate, et se ramifient ensuite dans le péricarpe, pour parcourir tout le volume à irriguer (voir la figure 2.2-b).

Les cellules situées à la surface externe forment l'épiderme, qui joue un rôle de protection contre les parasites, les chocs, la pénétration de l'eau, mais aussi contre la transpiration. Il est constitué en général par une couche unique de cellules, allongées tangentiellement à la surface, et étroitement imbriquées. Leurs parois internes sont le plus souvent minces et cellulósiques, tandis que les parois externes sont épaissies, et cutinisées.

### 2.3.2 La cellule végétale et sa paroi

À l'intérieur de la cellule on distingue le cytoplasme, qui contient le matériel nécessaire au fonctionnement de la cellule, ainsi que des vacuoles, et le noyau (voir la figure 2.3). Les vacuoles sont des inclusions aqueuses situées dans la cellule. Elles ont une fonction de stockage de l'eau, des produits élaborés et des déchets. Le nombre et la taille des vacuoles dépendent du type et de l'âge de la cellule.

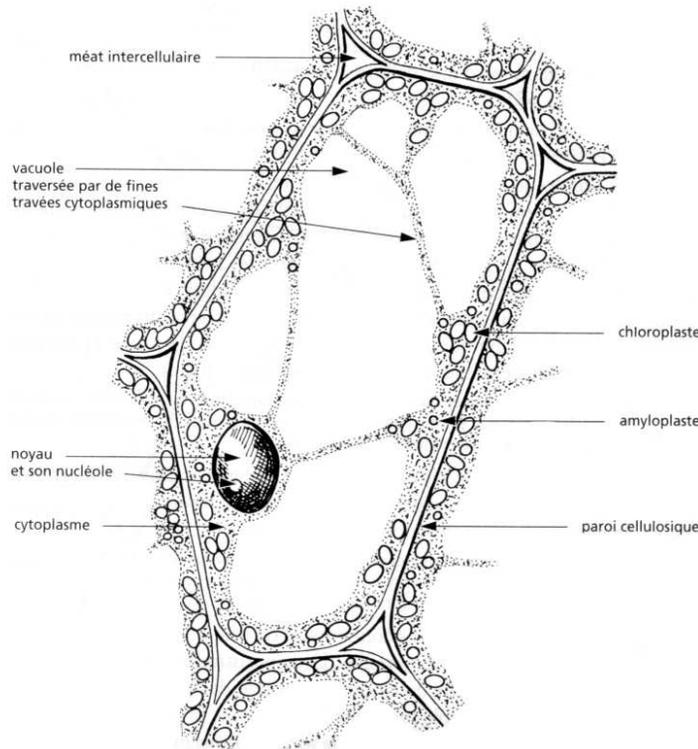


FIG. 2.3 – Structure interne d'une cellule végétale (d'après Raynal-Roques, 1994, avec l'autorisation des éditions Belin).

Le noyau est, après la paroi, la partie la plus apparente de la cellule. Il n'en existe qu'un seul par cellule, situé au centre des cellules jeunes, et poussé vers la périphérie de la cellule lorsque les vacuoles se forment.

La cellule végétale se distingue par sa paroi pecto-cellulosique qui assure sa rigidité et la cohésion des cellules entre elles. L'observation microscopique montre l'existence de différentes structures dans la paroi. La lamelle moyenne constitue l'interface entre deux cellules.

Elle est composée essentiellement de pectines. La paroi primaire, souple et hydrophile est constituée d'un réseau de fibres de cellulose enchâssé dans une matrice composée majoritairement de pectine (Carpita et Gibeaut, 1993). Des couches additionnelles sont parfois présentes en fonction des organes et des types cellulaires, qui constituent alors la paroi secondaire, enrichie en cellulose ou en lignine.

La composition et la structure de la paroi varient, ce qui influe sur les propriétés d'adhésion et de rigidité. En particulier, la structure de la lamelle moyenne est modifiée au cours de la maturation, induisant l'apparition de méat entre les cellules, voire des dissociations cellulaires.

## 2.4 Texture sensorielle et propriétés mécaniques

La qualité de la tomate recouvre des notions différentes pour un producteur, un commerçant, un consommateur ou du point de vue nutritionnel. On s'intéresse ici à la qualité en terme de texture sensorielle et de propriétés mécaniques.

### 2.4.1 La texture sensorielle

La texture sensorielle résulte de caractéristiques perçues en bouches lors de la mastication et dues à la quantité de gel dans les loges, la consistance de la chair, l'élasticité de la paroi... Avec le goût et l'arôme, c'est une des caractéristiques essentielles pour décrire la qualité au niveau du consommateur. Les paramètres sensoriels sont classiquement estimés par un jury de dégustateurs entraînés, qui note chaque produit testé en fonction de tomates bien caractérisées (Auerswald et al., 1999). Pour la tomate, les paramètres principaux sont la fermeté, la jutosité, le croquant, la farinosité ou encore la sensation de peau persistante. Pour chacun des paramètres retenus, les dégustateurs donnent une note comprise entre 0 et 10. L'ensemble des notes obtenues pour chacun des paramètres constitue un profil de texture sensorielle, caractéristique de l'échantillon.

### 2.4.2 Propriétés mécaniques

Les données sensorielles sont longues et coûteuses à acquérir. Une approche alternative est de recourir à des mesures instrumentales plus facilement reproductibles, et qui seraient corrélées aux paramètres sensoriels (Abbott, 1999). Beaucoup de méthodes utilisent les propriétés mécaniques des matériaux obtenues en appliquant des contraintes et en mesurant les forces de résistance.

Pour les fruits charnus, des techniques de mesure des forces de compression, résistance à la tension, pénétrométrie, ont été mises en œuvre (Tu et al., 1996; Harker, 1997; Alvarez et al., 2000; Harker et al., 2003). Des techniques, basées sur la séparation de cellules et la quantité de jus libéré après déstructuration des fruits, ont été développées spécifiquement pour tenter de comprendre la farinosité (Crisosto et Labavitch, 2002; Brovelli et al., 1998; Devaux et al., 2005).

Les propriétés rhéologiques de la cuticule ont également été étudiées, afin d'expliquer le comportement de la région la plus externe du péricarpe (Petracek et Bukovac, 1995; Bargel et Neinhuis, 2005), ou la résistance à des tests de perforation (Desmet et al., 2002, 2003; Allende et al., 2004).

### 2.4.3 Causes de variabilité

La composition, la forme, et la texture des fruits de tomate dépendent de la variété et des facteurs environnementaux (Knee, 2002). La température pendant la maturation favorise ou inhibe l'activité enzymatique (Ferguson et al., 1999; Adams et al., 2001) et agit sur la couleur finale (Hertog et al., 2004).

Les conditions de conservation après la récolte influent sur la texture du fruit. La tomate perd en fermeté si la température de conservation est trop basse (Brovelli et al., 1998; Jackman et Stanley, 1995), et la présence éventuelle d'éthylène accélère le mûrissement (Salveit, 1999; Alexander et Grierson, 2002).

Il convient de mentionner les nombreuses recherches dans le domaine de la génétique, qui cherchent à comprendre et à contrôler les mécanismes d'expression des caractéristiques sensorielles et instrumentales (Seymour et al., 2002; Causse et al., 2002). Le gène *rin* (pour *ripening inhibitor*), permet ainsi d'inhiber la production d'éthylène de la tomate, et d'augmenter sa durée de conservation. Mais la diminution des qualités sensorielles des fruits portant ces gènes motive la création de variétés hybrides, ainsi que la recherche d'indicateurs de la qualité organoleptique (Causse et al., 2004; Bertin et al., 2003; Lecomte et al., 2004).

### 2.4.4 Influence de la structure cellulaire

Différents niveaux d'organisation spatiale sont susceptibles d'intervenir dans la définition de la texture sensorielle. Cette organisation est difficile à appréhender dans un matériau comme la tomate, du fait de l'hétérogénéité de la structure et de l'imbrication de plusieurs niveaux de complexité. La texture globale d'une tomate dépend de la forme et de l'organisation du péricarpe, du placenta et des loges. Les propriétés du péricarpe dépendent de la forme et de l'arrangement des cellules ainsi que des propriétés des parois cellulaires. Celles-ci sont déterminées par l'organisation et l'interaction des macromolécules dans la paroi (voir la figure 2.4).

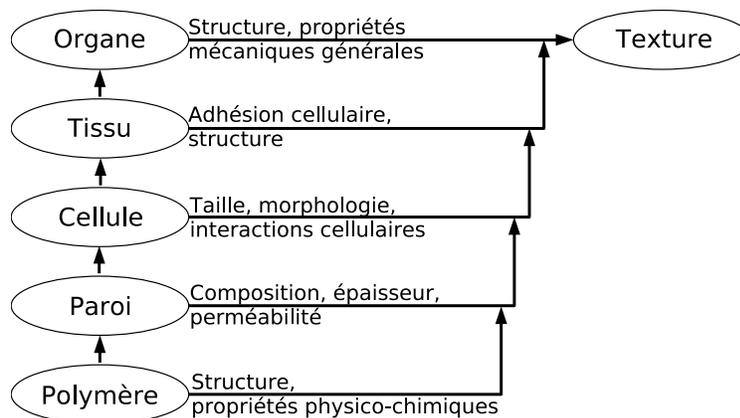


FIG. 2.4 – Différents niveaux hiérarchiques pour caractériser la texture (d'après Waldron et al., 1997, avec l'autorisation des éditions Elsevier).

Des études ont été réalisées pour relier directement la forme des cellules à des paramètres de texture sensorielle comme la farinosité (De Smedt et al., 1998) ou le fondant (Redgwell et al., 1997). La dégradation de la lamelle moyenne, qui entraîne des dissociations cellulaires, est souvent mise en cause (Waldron et al., 1997; Jackman, 1995). La jutosité des fruits, qui est un paramètre sensoriel majeur, a été corrélé avec une grande taille de cellules (Reeve, 1970; Harker, 1997; Harker et al., 2003).

Konstankiewicz et Zdunek (2001); Konstankiewicz et al. (2001b, 2002) ont réalisé plusieurs études sur la pomme de terre, en couplant des tests mécaniques à des mesures morphométriques sur des coupes histologiques. Des essais sur la pomme ont relié de façon quantitative la forme des cellules à l'adhésion cellulaire (Alvarez et al., 2000), mais aussi à des propriétés physiques, comme les échanges gazeux à l'intérieur des fruits (Shotsmans et al., 2004). Concernant la tomate, Allende et al. (2004) ont relié la résistance mécanique de la cuticule à la géométrie des cellules.

## 2.5 Modélisation des propriétés mécaniques

Pour comprendre les caractéristiques mécaniques et sensorielles des plantes, la modélisation peut se révéler une approche complémentaire des mesures physiques et morphologiques. Une revue des différents types de modélisation mécanique pour les milieux cellulaires végétaux est présentée par Bruce (2003).

Les outils théoriques issus de la mécanique, comme les techniques d'homogénéisation, permettent de remplacer la description de milieux hétérogènes complexes par une description continue équivalente du point de vue macroscopique. Un modèle adapté au cas des matériaux cellulaires biologiques considère le comportement de bulles étanches, remplies de liquide (Davies et al., 1998). Les paramètres nécessaires à la construction de tels modèles sont les propriétés mécaniques de la paroi cellulaire, l'organisation spatiale et la morphologie cellulaire, ainsi que la pression de turgescence, qui assure le maintien des cellules (Lin et Pitt, 1986).

Des travaux se sont intéressés plus spécifiquement à la modélisation du comportement individuel des cellules (Wu et Pitts, 1999; Wang et al., 2004). La modélisation des phénomènes de transports de fluides à l'intérieur des cellules, et de modification de la pression de turgescence, permet d'améliorer la qualité des modèles (Chiralt et Talens, 2005). Enfin, l'adhésion cellulaire est un phénomène crucial, conditionné par les propriétés de la lamelle moyenne, et qui influe à la fois sur les propriétés mécaniques et sensorielles (Waldron et al., 1997; Jarvis et al., 2003).

Un autre modèle plus généraliste a été proposé par Gibson et Ashby (1997). Les cellules sont assimilées à des polyèdres convexes, dont les arêtes forment un réseau tridimensionnel. On considère des modèles de cellules fermées ou ouvertes, selon que les faces des polyèdres sont pleines ou non. Ce système permet de modéliser une grande variété de structures, et de calculer leurs propriétés mécaniques globales (Gibson, 2005). Des modèles similaires imitant les matériaux cellulaires végétaux ont également été étudiés, afin d'évaluer les facteurs influençant l'élasticité et la réponse à la compression (Zhu et Melrose, 2003).

Pour ces études, il est nécessaire de connaître le comportement mécanique des parois, ainsi que leurs propriétés d'adhérence. Ces propriétés sont mal connues, car difficilement mesurables (Smith et al., 1998), mais peuvent être expliquées par l'étude de l'ultrastructure

pariétale (Carpita et Gibeaut, 1993; Brett et Waldron, 1996; Whitney et al., 1999). Cette ultrastructure est soumise à de nombreuses modifications, engendrées par la maturation ou le changement de la composition physico-chimique des tissus (Wells et al., 1994; Smith, 2003; Martin et al., 2001).

## 2.6 Imagerie du péricarpe de tomate

Que ce soit pour étudier les relations directement avec les données sensorielles, les propriétés mécaniques, ou pour renseigner les modèles de comportements mécaniques, il est nécessaire de disposer de données quantifiées concernant la morphologie tissulaire et cellulaire : taille, forme des cellules, arrangement et orientation dans le tissu, épaisseur des parois... Ces paramètres sont obtenus en mettant en œuvre des techniques d'imagerie.

### 2.6.1 Observation des tissus

Les cellules de parenchyme du péricarpe de tomate peuvent avoir des tailles importantes (Devaux et al., 2005). Des observations à l'échelle macroscopique permettent de visualiser l'organisation spatiale des tissus (figure 2.5-a). Pour observer la morphologie des cellules et la présence de méats, l'échelle de la microscopie optique reste plus adaptée (figure 2.5-b). L'observation plus précise de la paroi cellulaire requiert l'usage de la microscopie électronique à transmission.

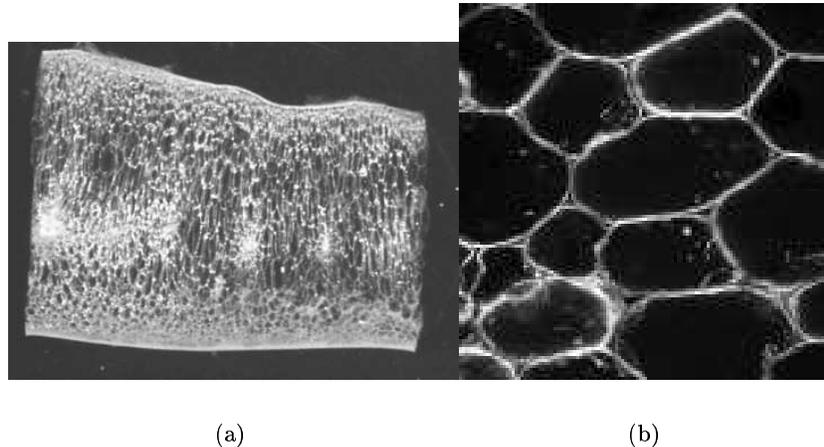


FIG. 2.5 – Observations de péricarpe de tomate à différentes échelles. (a) Macroscopie sur une coupe d'épaisseur  $400\ \mu\text{m}$  (largeur :  $10.7\ \text{mm}$ ). (b) Microscopie confocale au grossissement  $\times 10$  (largeur :  $1280\ \mu\text{m}$ )

### 2.6.2 La microscopie confocale

La microscopie confocale à balayage laser est la technique la plus adaptée à l'étude de la morphologie cellulaire. Elle produit une série de coupes optiques, à partir d'échantillons

épais (plusieurs dizaines de micromètres), avec une résolution spatiale améliorée (Pawley, 1989). Elle permet ainsi d'obtenir des observations volumiques à partir de matériel frais.

Les échantillons sont éclairés par une longueur d'onde d'excitation, ce qui provoque en retour un signal d'émission des molécules fluorescentes à une longueur d'onde spécifique. La fluorescence provenant des plans au-dessus et au-dessous du plan focal est éliminée grâce à un diaphragme (ou pinhole) (figure 2.6). L'image est obtenue en balayant tous les points du plan focal.

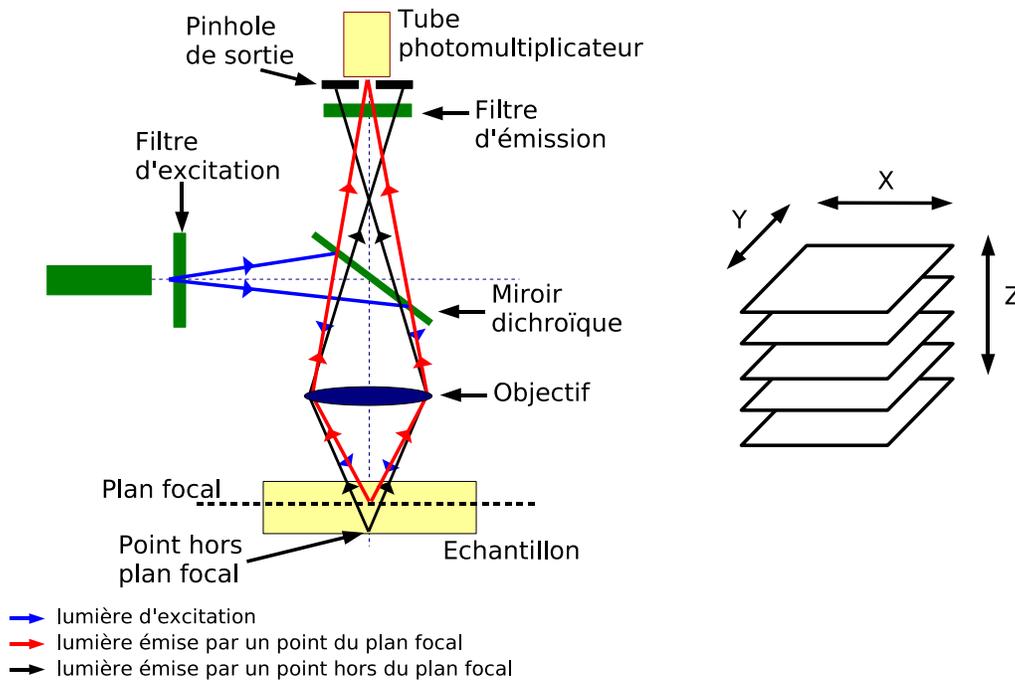


FIG. 2.6 – Schéma de principe d'un microscope confocal (d'après Laurent et al. (1992)). Le laser excite la zone d'intérêt. La particule fluorescente, en revenant à un niveau d'excitation stable, émet de la lumière. Cette lumière est filtrée par le dispositif optique du microscope, de manière à ne laisser passer que l'information venant du plan focal voulu. Le résultat est une succession d'images à des profondeurs différentes (à droite).

L'acquisition d'images à des profondeurs différentes permet d'obtenir des coupes virtuelles successives dont l'ensemble constitue une image tridimensionnelle de l'échantillon. L'épaisseur totale observable dépend de la densité et des propriétés d'absorptivité de l'échantillon (Cheng et al., 1994).

La microscopie confocale est bien adaptée à l'observation des petites cellules. Les cellules végétales, souvent de grande taille, peuvent être bien observées en 2D (Travis et al., 1993; Konstankiewicz et al., 1995), et il est parfois possible de reconstruire un ensemble cellulaire complet (Gray et al., 1999).

### 2.6.3 Assemblage d'images en microscopie

Les cellules de parenchyme sont généralement très grandes, et peu d'entre elles sont visibles sur une image. Le champ de vue peut être agrandi artificiellement en observant plusieurs images adjacentes, et en reconstituant l'image complète de l'échantillon observé. Si ces montages sont courants pour des images en 2 dimensions, la technique pour rassembler deux piles d'images 3D a nécessité des développements méthodologiques spécifiques (Çapek et Krekule, 1999; Karen et al., 2003).

Une procédure basée sur une décomposition pyramidale des images a été utilisée pour assembler des images de tomate et a permis de visualiser une traversée complète de péricarpe de tomate depuis l'épiderme externe du fruit jusqu'à l'épiderme interne délimitant les loges (Fromont et al., 2005).

## Conclusion

Nous avons décrit dans ce chapitre la nature complexe et hétérogène du péricarpe de tomate. Cette hétérogénéité se traduit par une grande variabilité de ses caractéristiques. L'étude des relations entre les propriétés mécaniques ou sensorielles et la morphologie cellulaire nécessite de quantifier cette dernière. Cette morphologie n'a pas encore été décrite globalement mais de manière partielle ou indirecte. Nous avons choisi la microscopie confocale pour observer et décrire en 3 dimensions les espaces cellulaires du péricarpe à partir d'images mosaïques de traversées de péricarpe. Le prochain chapitre s'attachera à présenter de manière formelle la structure observée, ce qui permettra de décrire sa morphologie.

## Chapitre 3

# Structures cellulaires et ensembles aléatoires

### Contenu

---

<b>3.1</b>	<b>Représentation ensembliste</b>	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>Caractérisation morphométrique</b>	<b>31</b>
3.2.1	Volume et surface	31
3.2.2	Courbures d'un ensemble	31
3.2.3	Épaisseur moyenne	32
3.2.4	Caractéristique d'Euler-Poincaré	33
3.2.5	Relations entre les paramètres	34
3.2.6	Caractérisation locale	34
<b>3.3</b>	<b>Modélisation stochastique</b>	<b>36</b>
3.3.1	Ensembles aléatoires	36
3.3.2	Paramètres globaux	36
3.3.3	Paramètres locaux	37
3.3.4	Paramètres directionnels	38

---



## Introduction

Un matériau cellulaire peut être défini comme un ensemble interconnecté de poutres (au sens mécanique) ou de plaques, qui forment les arêtes ou les faces des cellules composant le matériau. Dans le cas du péricarpe de tomate, composé de cellules concaténées, cette approche est naturelle. Mais la notion de milieu cellulaire peut aussi s'appliquer à des structures dont les cellules ne sont pas fermées par des parois pleines, telle que la structure osseuse, formée d'un ensemble de travées soudées les unes aux autres, ou des produits alimentaires transformés, comme la mie de pain.

Dans ces exemples, la géométrie des structures est complexe, et difficile à appréhender de manière simple. Pour définir des mesures morphométriques, nous utilisons le formalisme mathématique des ensembles géométriques de l'espace pour représenter les structures. Cette représentation peut concerner différentes régions de la structure à étudier. Pour une structure biphasique telle que le pain, on peut s'intéresser soit à l'espace alvéolaire, soit à la structure complémentaire formée par la pâte. Dans le cas du péricarpe, il peut s'agir de l'ensemble des parois des cellules, des cellules elles-mêmes, ou encore des espaces situés en dehors des cellules et des parois (espaces intercellulaires). Nous choisissons de décrire l'ensemble des particules du péricarpe, qui comprend les cellules et les espaces intercellulaires. Ce choix sera justifié par les résultats des acquisitions.

Nous décrirons cette structure par des caractéristiques classiques : volume, surface, élongation, nombre, paramètres directionnels. Les méthodes morphométriques seront applicables à une grande classe d'ensembles, mais leur interprétation sera faite ensuite en fonction des connaissances *a priori* sur le matériau. Ces caractéristiques ont également été choisies pour leur propriété d'additivité, qui permet de les estimer à partir d'observations partielles.

Il est ensuite nécessaire de prendre en compte la variabilité naturelle des matériaux biologiques. Dans le cadre de la tomate, on ne cherchera pas à décrire le péricarpe d'une tomate ou d'une observation en particulier, mais à appréhender la morphologie générale du péricarpe de la population (ici la variété ou la lignée) dans son ensemble. Nous utiliserons la théorie des ensembles aléatoires, qui fournit un cadre théorique adapté à cette approche en prenant en compte la variabilité biologique de la tomate.

### 3.1 Représentation ensembliste

On s'intéresse à l'organisation spatiale des cellules à l'intérieur du péricarpe. Celui-ci varie en forme et en taille d'une tomate à l'autre. On a donc besoin de se situer relativement au péricarpe. On considère deux ensembles :

- l'ensemble  $X$  des particules (cellules et espaces intercellulaires) du péricarpe,
- l'ensemble  $Y$  des points à l'intérieur du péricarpe.

On a l'inclusion  $X \subset Y$ , avec le volume de  $X$  qui est quasiment équivalent au volume de  $Y$ , mais la structure  $X$  est un ensemble de particules individualisées, tandis que le péricarpe  $Y$  consiste en une seule structure connexe.

La localisation à l'intérieur du péricarpe  $Y$  est assurée par des fonctions dites de localisation. Par exemple, on peut considérer la fonction  $B$  définie par :

$$B(Y) = \{\text{points du péricarpe situés à une certaine distance de sa surface externe}\}$$

La définition formelle des paramètres morphométriques nécessite d'abord de préciser la classe d'ensembles considérés. Une première approche consiste à se restreindre aux ensembles dont les frontières sont des variétés différentielles (surfaces lisses partout). Une autre approche considère les ensembles convexes (la frontière d'un convexe est nécessairement lisse par morceaux), et se généralise aux unions d'ensembles convexes. Cette dernière représentation est bien adaptée au réseau alvéolaire du pain. En revanche, elle convient moins pour les cellules du péricarpe, qui ne sont pas nécessairement convexes.

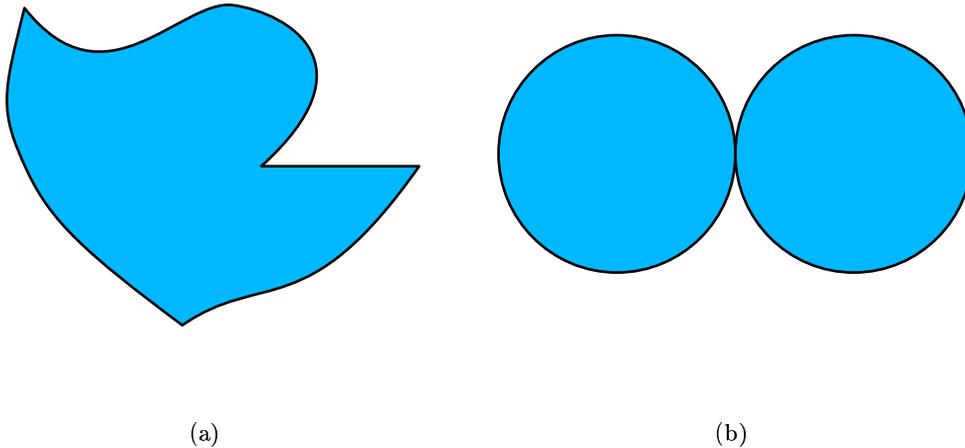


FIG. 3.1 – La figure (a) présente une structure du plan qui peut être représentée par une union d'ensembles de portée positive. La figure (b), en revanche, ne le peut pas du fait de la singularité entre les disques.

Une approche unifiée a été proposée par Federer, avec les ensembles de portée positive (Federer, 1969). Ces ensembles peuvent présenter des convexités et des concavités, et leurs frontières sont lisses par morceaux. La définition de base implique que les arêtes ou les sommets soient saillants, mais les unions d'ensembles de portée positive, introduits par Zähle, peuvent avoir des sommets ou des arêtes rentrants (Zähle, 1984, 1986, 1987). Dans la suite, nous appelons “ensembles de Federer” les unions d'ensembles de portée positive.

La figure 3.1-a présente un ensemble appartenant à cette classe. Certains ensembles ne sont cependant pas adaptés à cette représentation : les ensembles dont la frontière est trop irrégulière (fractals), ou les cas particuliers d'ensembles qui sont en contact uniquement par la frontière (figure 3.1-b). La condition formelle, qui porte sur le cône tangent aux points de contact, est donnée dans un article de M. Zähle (Zähle, 1987).

Les cellules et les espaces intercellulaires du péricarpe sont bien modélisés par les ensembles de Federer : leurs frontières sont lisses, et chaque composante connexe est clairement séparée de ses voisines par la paroi cellulaire.

## 3.2 Caractérisation morphométrique

Nous choisissons de décrire les structure par des caractéristiques facilement interprétables, et nous nous assurons qu'elles peuvent être représentées sous la forme d'intégrales. Cela permet de les estimer à partir d'observations partielles de l'espace.

### 3.2.1 Volume et surface

Parmi les caractéristiques géométriques qui décrivent une structure 3D représentée par un ensemble de Federer  $X$ , les plus simples à appréhender sont le volume et la surface. Elle sont définies par les relations intégrales suivantes :

$$V = \int_X dx \quad , \quad S = \int_{\partial X} dx$$

où  $\partial X$  représente la frontière de  $X$ . D'autres mesures peuvent être introduites en utilisant la notion de courbure.

### 3.2.2 Courbures d'un ensemble

En trois dimensions, si la frontière est lisse, on peut définir pour chacun de ses points deux courbures principales  $\kappa_1$  et  $\kappa_2$ , qui décrivent la forme locale de la surface. Suivant le signe de ces courbures (positif, négatif ou nul), on retrouve plusieurs configurations types. Si les deux courbures sont nulles, la surface est localement plane. Si les deux courbures sont positives, le point est situé sur une sorte de "bosse" (Figure 3.2-a).

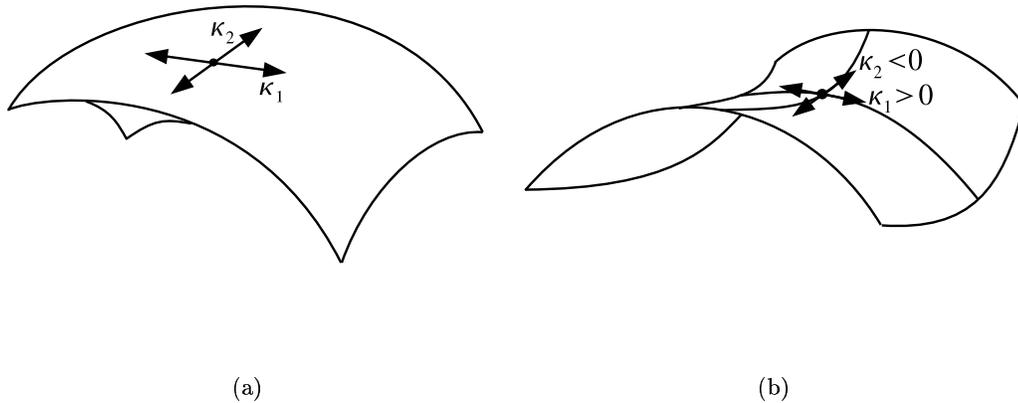


FIG. 3.2 – Courbures principales d'un morceau de surface. (a) Les deux courbures sont positives. (b) Configuration dite en "selle de cheval" : une courbure est positive et l'autre négative.

Une configuration particulière, appelée en selle de cheval, apparaît lorsque les deux courbures sont de signe opposé : un fourmi se déplaçant sur cette surface descendrait le

long de la courbure positive, et remonterait le long de la courbure négative. C'est l'équivalent topographique d'un col (Figure 3.2-b).

La notion de courbure peut être étendue aux ensembles de Federer, en les définissant non plus sur la surface, mais sur le fibré normal, qui possède de meilleures propriétés de régularité (Zähle, 1986, 1987).

### 3.2.3 Épaisseur moyenne

La longueur d'une courbe de l'espace est obtenue en intégrant son abscisse curviligne. Les structures biologiques fibreuses s'apparentent à des courbes de l'espace ayant une épaisseur. En intégrant la courbure moyenne sur leur surface, on obtient une caractéristique qui se rapproche de leur longueur (voir la figure 3.3).

$$L = \frac{1}{\pi} \int_{\partial X} \frac{\kappa_1(x) + \kappa_2(x)}{2} dx \quad (3.1)$$

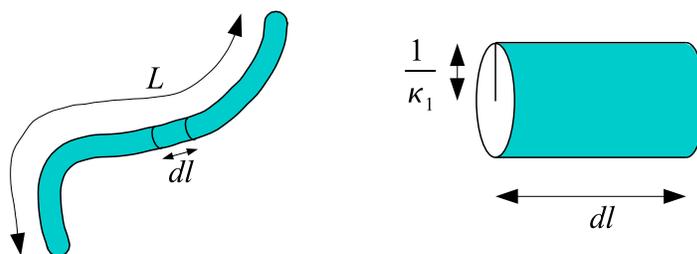


FIG. 3.3 – Calcul de l'élongation d'une fibre épaisse. Pour chaque point de la surface, on considère que  $\kappa_2$ , la courbure longitudinale, est très petite devant  $\kappa_1$ , la courbure transversale, qui est constante. La courbure moyenne d'un point est donc égale à  $\kappa_1/2$ . On considère un élément cylindrique de longueur  $dl$ . S'il est suffisamment petit, sa surface est égale à  $2\pi dl/\kappa_1$ . En intégrant la courbure moyenne sur tous les éléments de surface  $dx$ , on retrouve bien la longueur de la fibre

Pour des structures telles que des cellules, on cherche à mesurer des dimensions telles que leur épaisseur moyenne. Pour une cellule convexe de frontière lisse, l'épaisseur moyenne est proportionnelle à l'intégrale de la courbure moyenne. La justification sera donnée grâce à la formule de Crofton (3.6), donnée plus loin.

$$\bar{b} = \frac{1}{2\pi} \int_{\partial X} m(x) dx \quad , \quad m(x) = \frac{\kappa_1(x) + \kappa_2(x)}{2} \quad (3.2)$$

Ces définitions ne sont valables que dans le cas de variétés différentielles. Leurs extensions aux ensembles de Federer ont la forme d'intégrales sur le fibré normal.

On peut noter aussi un paramètre moins connu, l'intégrale de la courbure mixte  $K$ , lui aussi défini à partir des courbures principales, qui a trouvé des applications en science des

matériaux (Gokhale, 1998).

$$K = \int_{\partial X} 3\kappa_1^2(x) + 2\kappa_1(x)\kappa_2(x) + 3\kappa_2^2(x) dx$$

### 3.2.4 Caractéristique d'Euler-Poincaré

Une dernière classe de caractéristiques décrit la topologie des structures. Les caractéristiques topologiques sont invariantes pour les déformations régulières de la structure. Par exemple, une tasse à café a la même topologie qu'un anneau, car on peut passer de l'une à l'autre sans faire de coupure ni de soudure.

Pour les structures cellulaires, le nombre de composantes connexes (cellules) est une caractéristique topologique intéressante. Pour des structures telles que la mie de pain en début de fermentation, ou de fromage, on considère plutôt le nombre de composantes connexes de la phase formée par les bulles ou les cavités. Pour des structures fortement connectées, comme le cartilage osseux, on peut compter le nombre de tunnels, qui correspond au nombre de coupes que l'on peut faire dans la structure sans augmenter le nombre de composantes connexes (voir la figure 3.4).

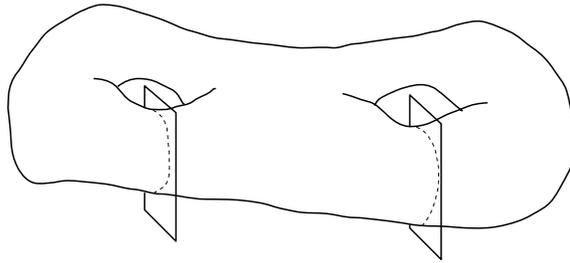


FIG. 3.4 – Nombre de tunnels d'une structure. On peut couper la structure en deux endroits, sans la séparer. Le genre, ou nombre de tunnels est donc égal à 2. La caractéristique d'Euler-Poincaré vaut  $-1$  : une composante connexe moins 2 tunnels.

La caractéristique d'Euler-Poincaré est une caractéristique topologique qui combine ces trois paramètres. Elle correspond au nombre de composantes connexes et de bulles dans ces structures, moins le nombre de tunnels. Pour le péricarpe, il est naturel de supposer que les cellules sont des ensembles de forme simple, et que la caractéristique d'Euler-Poincaré de l'ensemble des cellules du péricarpe sera égale au nombre de cellules qu'il contient.

Pour des variétés différentielles, la caractéristique d'Euler-Poincaré est définie à partir de l'intégrale de la courbure gaussienne, égale au produit des courbures principales de chaque point :

$$\chi = \frac{1}{4\pi} \int_{\partial X} g(x) dx \quad , \quad g(x) = \kappa_1(x)\kappa_2(x) \quad (3.3)$$

Pour les ensembles de Federer, la caractéristique d'Euler-Poincaré peut être exprimée en fonction d'une intégrale de la courbure gaussienne le long du fibré normal (Zähle, 1986, 1987). Les sommets et les points le long des arêtes contribuent à cette intégrale. Dans le cas particulier d'un polyèdre, la courbure gaussienne sur les faces et les arêtes est nulle, et seules les courbures associées aux sommets contribuent à la caractéristique d'Euler-Poincaré :

$$\chi = \frac{1}{4\pi} \sum_{x \in \partial_0 X} k(x) \quad (3.4)$$

où  $\partial_0 X$  représente l'ensemble des sommets de  $X$ . Le cas polyédral a été traité par Banchoff (1967, 1970). Nous donnerons la forme explicite de la courbure  $k(x)$  dans le chapitre 5, où la formule (3.4) est utilisée pour calculer la caractéristique d'Euler-Poincaré dans des images discrètes.

### 3.2.5 Relations entre les paramètres

Tous les paramètres vus précédemment peuvent en fait être unifiés dans le cadre des fonctionnelles de Minkowski, qui permettent de caractériser une structure quelle que soit sa dimension.

La formule de Crofton permet de relier les fonctionnelles définies dans une dimension à des mesures faites dans des espaces de dimensions inférieures. En particulier, on a les relations suivantes :

$$S = 4 \int_{\mathcal{L}} \chi(X \cap L) dL \quad (3.5)$$

$$\bar{b} = \int_{\mathcal{P}} \chi(X \cap P) dP \quad (3.6)$$

où  $\mathcal{L}$  représente l'ensemble de toutes les lignes du plan ou de l'espace, et  $\mathcal{P}$  l'ensemble des plans de l'espace. Les intégrales sont normalisées telles que  $\int_{\mathcal{L}} dL$  et  $\int_{\mathcal{P}} dP$  valent 1.

La relation (3.6) peut se réécrire :

$$\bar{b} = \int_{\Omega_2} D_\omega(X) d\omega \quad , \quad D_\omega(X) = \int_{L_\omega} \chi(X \cap P_{x,\omega}) dx \quad (3.7)$$

où  $L_\omega$  est la droite de direction  $\omega$  passant par l'origine,  $P_{x,\omega}$  le plan de normale  $\omega$  contenant  $x$ , et  $\Omega_2$  l'ensemble des directions de l'espace. Pour une particule convexe,  $\chi(X \cap P_{x,\omega})$  vaut 0 ou 1 selon que le plan  $P_{x,\omega}$  intersecte  $X$  ou non. L'intégration de  $\chi$  sur tous les plans de normale  $\omega$  donne le diamètre projeté total  $D_\omega(X)$  (Figure 3.5). En moyennant  $D_\omega(X)$  sur toutes les directions de l'espace, on obtient une expression de  $\bar{b}$ , équivalente à l'épaisseur moyenne.

### 3.2.6 Caractérisation locale

Plutôt que de caractériser globalement un ensemble, on peut ne s'intéresser qu'à une zone particulière. Le formalisme de la théorie de la mesure permet d'exprimer les paramètres géométriques localement, soit en utilisant les définitions des intégrales limitées à

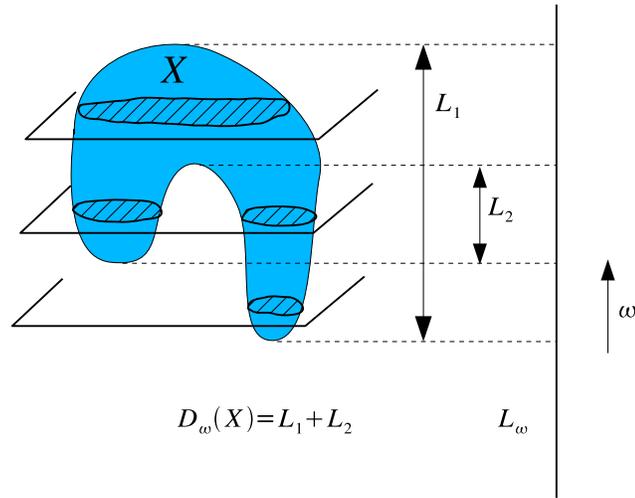


FIG. 3.5 – Diamètre projeté d'un ensemble non convexe. On intègre le nombre de connexité des sections de  $X$  sur tous les plans orthogonaux à  $L_\omega$ .

un ensemble particulier, soit de manière plus générale, en introduisant une fonction de localisation  $\varphi$  de  $\mathbb{R}^3$  dans  $\mathbb{R}$ . La caractérisation géométrique devient :

$$V(\varphi) = \int_X \varphi(x) dx \quad (3.8)$$

$$S(\varphi) = \int_{\partial X} \varphi(x) dx \quad (3.9)$$

$$\bar{b}(\varphi) = \frac{1}{2\pi} \int_{\partial X} \varphi(x) m(x) dx \quad (3.10)$$

$$\chi(\varphi) = \frac{1}{4\pi} \int_{\partial X} \varphi(x) g(x) dx \quad (3.11)$$

Lorsque la fonction  $\varphi$  vaut 1 quel que soit  $x$ , on retrouve les définitions classiques. Par contre,  $\varphi$  peut aussi être la fonction indicatrice d'un ensemble  $B$ , et on obtient une caractérisation localisée à l'ensemble  $B$ . Pour éviter les ambiguïtés, on utilisera aussi les notations  $S(Y, \varphi)$ ,  $\chi(Y, \varphi)$ ... pour préciser l'ensemble caractérisé.

Les formules de Crofton s'étendent pour la surface et l'épaisseur moyenne de la façon suivante :

$$S(\varphi) = 4 \int_{\mathcal{L}} \chi(X \cap L, \varphi) dL \quad (3.12)$$

$$\bar{b}(\varphi) = \int_{\mathcal{P}} \chi(X \cap P, \varphi) dP \quad (3.13)$$

### 3.3 Modélisation stochastique

Nous avons vu comment caractériser une structure déterministe. Mais cette représentation ne tient pas compte de la variabilité inhérente aux matériaux biologiques. Nous utilisons la théorie des ensembles aléatoires, qui permet de formaliser cette variabilité, et qui fournit les outils pour décrire des structures dont la morphologie est variable.

#### 3.3.1 Ensembles aléatoires

La théorie des ensembles aléatoires remonte à des développements de Matheron (Matheron, 1975), mais des ouvrages plus récents offrent de bonnes synthèses des modèles et méthodes utilisés (Stoyan et al., 1995; Ohser et Mücklich, 2000). On utilise une notation en caractères gras pour distinguer les variables et ensembles aléatoires des variables et ensembles déterministes.

Un ensemble aléatoire peut être défini comme une variable aléatoire, qui prend ses valeurs dans un espace particulier : chaque valeur est un ensemble. Dans notre cas, l'espace des valeurs de la variable aléatoire  $\mathbf{Y}$  correspond à tous les péricarpes des tomates d'une variété.

La loi d'un ensemble aléatoire se définit similairement à celle d'une variable aléatoire à valeurs numérique. On peut caractériser la loi d'un ensemble aléatoire via la capacité. À un ensemble donné, dit de test, la capacité associe la probabilité que l'intersection l'ensemble aléatoire avec cet ensemble de test soit non vide. En pratique, on se limite à des ensembles simples comme des boules ou des segments.

#### 3.3.2 Paramètres globaux

Pour un ensemble aléatoire, les caractéristiques géométriques telles que le volume, la surface... deviennent des variables aléatoires numériques. Un paramètre simple des lois de ces variables aléatoires est leur espérance :

$$V = \mathbb{E}[V(\mathbf{X})] \quad (3.14)$$

$$S = \mathbb{E}[S(\mathbf{X})] \quad (3.15)$$

$$\bar{b} = \mathbb{E}[\bar{b}(\mathbf{X})] \quad (3.16)$$

$$\chi = \mathbb{E}[\chi(\mathbf{X})] \quad (3.17)$$

Si l'on souhaite s'affranchir de l'effet de la taille du péricarpe, il est possible de se ramener au volume de celui-ci. Le péricarpe  $\mathbf{Y}$  étant lui aussi représenté par un ensemble aléatoire, on utilise l'espérance de son volume. On définit donc les densités de volume, de

surface, d'épaisseur et de nombre des cellules de la manière suivante :

$$V_V = \frac{\mathbb{E}[V(\mathbf{X})]}{\mathbb{E}[V(\mathbf{Y})]} \quad (3.18)$$

$$S_V = \frac{\mathbb{E}[S(\mathbf{X})]}{\mathbb{E}[V(\mathbf{Y})]} \quad (3.19)$$

$$\bar{b}_V = \frac{\mathbb{E}[\bar{b}(\mathbf{X})]}{\mathbb{E}[V(\mathbf{Y})]} \quad (3.20)$$

$$\chi_V = \frac{\mathbb{E}[\chi(\mathbf{X})]}{\mathbb{E}[V(\mathbf{Y})]} \quad (3.21)$$

### 3.3.3 Paramètres locaux

Dans le cas de la tomate, il peut être intéressant de caractériser localement la morphologie des cellules du péricarpe. En effet, on remarque que les cellules ont une morphologie et une organisation qui varie en grande partie avec la profondeur dans le péricarpe. Il est possible de transformer la définition des paramètres de densités pour qu'ils dépendent de la profondeur. Il nous faut cependant tenir compte que du fait que le péricarpe est lui-même représenté par un ensemble aléatoire  $\mathbf{Y}$ , l'ensemble des points situés à une distance donnée de la frontière externe du péricarpe est aussi un ensemble aléatoire.

Une approche simple pour analyser l'hétérogénéité spatiale en fonction de la profondeur consiste à diviser le péricarpe  $\mathbf{Y}$  en couches d'égales épaisseurs et à comparer les densités de ces couches telles qu'elles sont définies par les équations (3.18) à (3.21) : on obtient une représentation de la densité par bande. On note  $B_{[p_1 p_2]}(\mathbf{Y})$  l'ensemble des points de  $\mathbf{Y}$  qui sont situés à une distance comprise entre  $p_1$  et  $p_2$  de la frontière externe du péricarpe  $\mathbf{Y}$  (voir la figure 3.6). Une division du péricarpe en bandes  $B_{[p_i p_{i+1}]}(\mathbf{Y})$ , avec  $p_i$  représentant une série ordonnée de profondeurs par rapport à la cuticule, permet d'exprimer les densités dans chaque bande. La densité surfacique, par exemple, s'exprime par :

$$S_V(p_i, p_{i+1}) = \frac{\mathbb{E}[S(\mathbf{X}, B_{[p_i p_{i+1}]}(\mathbf{Y}))]}{\mathbb{E}[V(B_{[p_i p_{i+1}]}(\mathbf{Y}))]} \quad (3.22)$$

On utilise ici la notation  $S(\mathbf{X}, B)$ , qui signifie que la surface de la structure  $\mathbf{X}$  n'est mesurée que dans la fenêtre formée par  $B$ , sans ajouter la contribution de l'intersection des bords de  $B$  avec  $\mathbf{X}$ . En utilisant la somme pondérée sur toutes les classes de profondeur, on retrouve bien une expression de la surface de  $\mathbf{X}$  :

$$\sum_i S_V(\mathbf{X}, B_{[p_i p_{i+1}]}(\mathbf{Y})) \mathbb{E}V(B_{[p_i p_{i+1}]}(\mathbf{Y})) = \mathbb{E}[S(\mathbf{X})] \quad (3.23)$$

D'une discrétisation par classes, on peut passer à une définition continue de la densité. On utilise pour cela des fonctions de localisation  $\varphi(p)$  qui ne dépendent que de la profondeur  $p$ . On note  $S_{\mathbf{Y}}(p)$  l'aire de la surface formée par les points à une profondeur donnée du péricarpe. C'est une variable aléatoire numérique, d'espérance  $\mathbb{E}[S_{\mathbf{Y}}(p)]$ . Les densités volumique  $V_V(p)$ , surfacique  $S_V(p)$ , d'épaisseur  $\bar{b}_V(p)$  et numérique  $\chi_V(p)$ , sont des fonctions qui à une profondeur  $p$  associent une densité. Elles sont définies de façon à vérifier

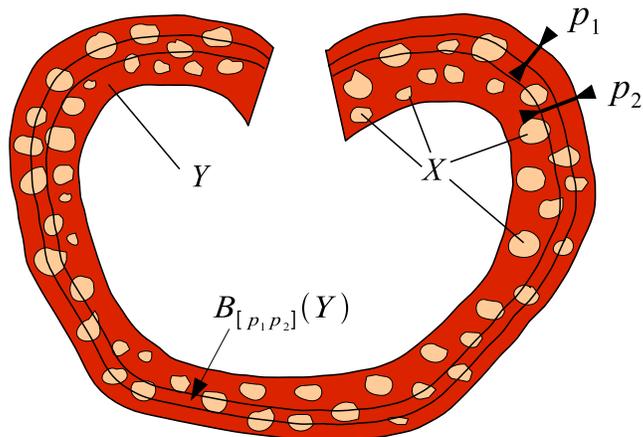


FIG. 3.6 – Définition des densités dans le cas du péricarpe de tomate

pour toute fonction de localisation  $\varphi(p)$  :

$$\int_0^\infty \varphi(p) V_V(p) \mathbb{E}[S_{\mathbf{Y}}(p)] dp = V_V(\varphi) = \mathbb{E} \int_{\mathbf{X}} \varphi(p(x)) dx \quad (3.24)$$

$$\int_0^\infty \varphi(p) S_V(p) \mathbb{E}[S_{\mathbf{Y}}(p)] dp = S_V(\varphi) = \mathbb{E} \int_{\partial \mathbf{X}} \varphi(p(x)) dx \quad (3.25)$$

$$\int_0^\infty \varphi(p) \bar{b}_V(p) \mathbb{E}[S_{\mathbf{Y}}(p)] dp = \bar{b}_V(\varphi) = \mathbb{E} \frac{1}{2\pi} \int_{\partial \mathbf{X}} \varphi(p(x)) m(x) dx \quad (3.26)$$

$$\int_0^\infty \varphi(p) \chi_V(p) \mathbb{E}[S_{\mathbf{Y}}(p)] dp = \chi_V(\varphi) = \mathbb{E} \frac{1}{4\pi} \int_{\partial \mathbf{X}} \varphi(p(x)) g(x) dx \quad (3.27)$$

Les fonctions  $m(x)$  et  $g(x)$  sont les courbures moyennes et gaussiennes définies en (3.2) et (3.3). Si on considère des fonctions indicatrices de la forme  $\varphi(p) = I_{[p_i; p_{i+1}]}(p)$ , on retrouve les densités par classe définies en (3.22). Si par contre on considère  $\varphi(p) = 1$  pour tout  $p$ , on retrouve une expression de l'espérance des paramètres globaux de  $\mathbf{X}$ .

Les notions de densités (volumique, surfacique...) sont surtout utilisées dans le contexte de structures homogènes (voir par exemple le livre de Stoyan et al. (1995)). Le cas de structures présentant un gradient selon la profondeur a été considéré par Hahn, dans le cas particulier où  $X$  est un ensemble aléatoire invariant par translation horizontale (Hahn et Stoyan, 1998; Hahn et al., 1999).

### 3.3.4 Paramètres directionnels

Les densités vues précédemment ne prennent pas en compte l'orientation générale de la structure. Or, une structure biologique telle que le péricarpe de tomate peut présenter une

certaine anisotropie : certaines cellules peuvent être allongées selon l'axe radial. Il est donc pertinent de vouloir quantifier cette anisotropie.

La rose des intercepts est une méthode couramment employée pour quantifier l'anisotropie de structures. Elle consiste à compter le nombre d'intersections de la frontière de la structure avec des droites, et de tracer l'évolution du nombre d'intersections en fonction de l'orientation des droites. Cette méthode a été largement employée du fait de sa facilité de mise en œuvre.

La rose des intercepts souffre cependant de quelques défauts. L'interprétation lorsqu'il y a plusieurs directions préférentielles est assez difficile. Un exemple est donné sur la figure 3.7 : pour une structure caractérisée par deux directions principales (ici horizontale et verticale), la rose des intercepts est minimale pour ces directions. De plus, l'écart entre les valeurs maximales et minimales de la rose est peu important. L'utilisation de la rose des intercepts est donc difficile à interpréter dès qu'il y a plusieurs directions principales (Coster et Chermant, 1989).

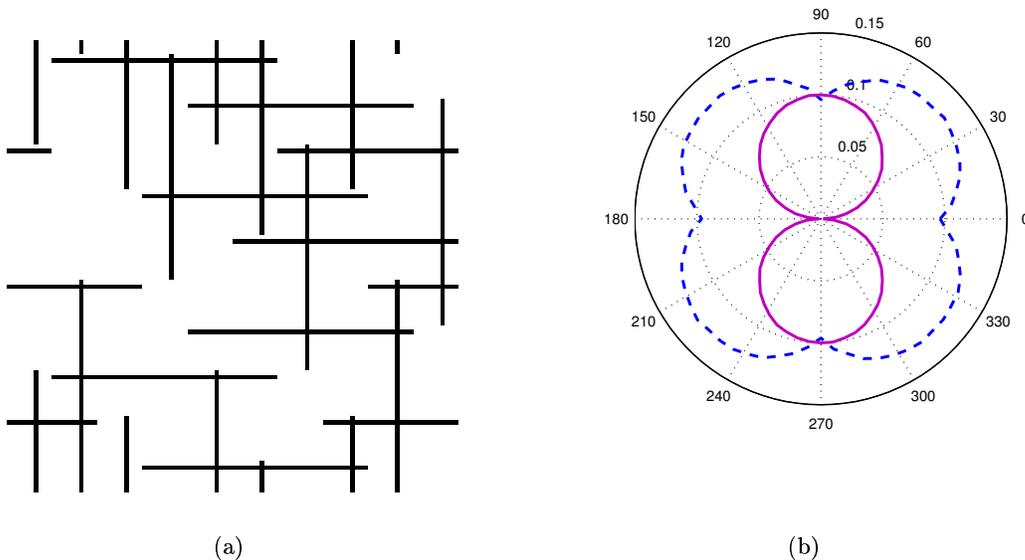


FIG. 3.7 – Méthode de la rose des intercepts pour un ensemble composé de fibres horizontales et verticales. En tirets bleus, rose des intercepts (b) pour un ensemble composé de fibres horizontales et verticales (a). En continu violet, la rose des intercepts calculée pour les fibres horizontales uniquement.

La rose des normales qui a eu un regain d'intérêt dans les travaux de Weil (Weil, 1997, 1996), est basée sur une mesure de longueur de la frontière. Elle consiste à associer, pour chaque direction du cercle unité (ou de la sphère unité en 3D), la longueur de la frontière  $\partial\mathbf{X}$  qui admet cette direction pour normale (voir la figure 3.8 pour un exemple dans le plan).

Plus formellement, si on considère un sous-ensemble mesurable  $C$  appartenant au cercle unité, et que l'on définit  $N_{\mathbf{X}}(C)$  l'ensemble des points de  $\partial\mathbf{X}$  tels que  $n(x) \in C$ , alors la

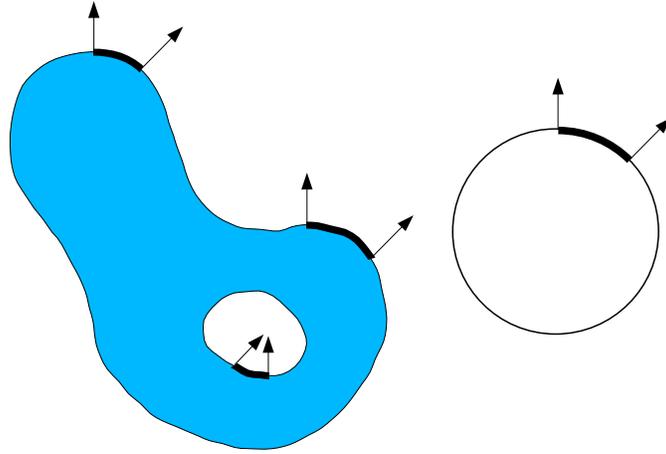


FIG. 3.8 – Rose des normales d'un ensemble. À chaque arc  $C$  du cercle unité, on associe la longueur des arcs de courbe de  $\partial\mathbf{X}$  dont la normale est comprise dans  $C$ .

rose des normales de  $\mathbf{X}$  est exprimée par :

$$\mathcal{L}(C) = \mathbb{E}L(N_{\mathbf{X}}(C)) \quad (3.28)$$

où  $L(\cdot)$  est une mesure de longueur. L'extension au cas tridimensionnel est immédiate en considérant une mesure définie non pas sur le cercle, mais sur la sphère unité (Gutkowski et al., 2004) :

$$\mathcal{S}(C) = \mathbb{E}S(N_{\mathbf{X}}(C)) \quad (3.29)$$

où  $C$  est un sous-ensemble mesurable de la sphère unité, et  $S(\cdot)$  une mesure de surface.

L'avantage de cette approche par rapport à la rose des intercepts est qu'elle est beaucoup plus facile à interpréter. Dans l'exemple de la figure 3.7, la rose des normales est la somme de 4 masses atomiques. Toutefois, les structures biologiques ont en général des orientations qui varient continûment. On peut alors écrire la rose des normales sous la forme :

$$\mathcal{S}(C) = \int_C s(\omega) d\omega$$

pour tout sous-ensemble  $C$  de la sphère  $\Omega_2$ . C'est donc plutôt la densité  $s$  de la rose des normales que l'on cherchera à estimer. Son estimation dans le cas d'images discrètes est détaillée dans le chapitre 5.

# Chapitre 4

## Estimation dans le cas d'un échantillonnage non uniforme

### Contenu

---

<b>4.1</b>	<b>Protocole d'échantillonnage</b>	<b>44</b>
4.1.1	Acquisition perpendiculaire à la surface	44
4.1.2	Formalisation mathématique	44
4.1.3	Distribution des points à la surface	45
<b>4.2</b>	<b>Estimation des paramètres morphométriques</b>	<b>46</b>
4.2.1	Paramètres globaux	46
4.2.2	Paramètres locaux	47
<b>4.3</b>	<b>Cas d'une sonde perpendiculaire à une surface</b>	<b>47</b>
4.3.1	Démarche	48
4.3.2	Projection sur la frontière	48
4.3.3	Localisation du calcul	48
<b>4.4</b>	<b>Calcul pour une structure du plan</b>	<b>49</b>
4.4.1	Condition d'échantillonnage	49
4.4.2	Paramétrisation locale	50
4.4.3	Calcul de la distance à la normale dans le repère local	51
4.4.4	Encadrement de la surface d'échantillonnage	52
4.4.5	Expression de la probabilité d'échantillonnage	53
<b>4.5</b>	<b>Extension au cas tridimensionnel</b>	<b>53</b>
4.5.1	Probabilité d'échantillonnage conditionnelle	54
4.5.2	Paramétrisation locale	55
4.5.3	Approximation de la distance à la normale	56
4.5.4	Intégration de la probabilité conditionnelle	57
4.5.5	Expression de la probabilité d'échantillonnage	60
<b>4.6</b>	<b>Vérification sur un exemple simple</b>	<b>61</b>
<b>4.7</b>	<b>Cas d'une surface de révolution</b>	<b>62</b>
4.7.1	Courbe génératrice	63
4.7.2	Paramétrisation de la surface	63
4.7.3	Calcul des courbures	64
4.7.4	Probabilités d'échantillonnage	64

4.7.5	Densité surfacique des points d'acquisition . . . . .	65
4.7.6	Surfaces équivalentes . . . . .	65

---

## Introduction

L'échantillonnage de structures 3D a été l'objet de nombreuses études. C'est en particulier la problématique principale de la stéréologie, domaine à l'intersection de la géométrie stochastique, des statistiques spatiales, et de la géométrie intégrale (voir par exemple les ouvrages de Weibel (1979), Baddeley et Jensen (2005), ou les articles de Gundersen et al. (1988b,a)).

La plupart des méthodes d'estimations utilisées en stéréologie utilisent un échantillonnage uniforme de la structure à observer. Mais ce type d'échantillonnage n'est pas toujours très facile à mettre en œuvre. De plus, dans certains cas, il semble judicieux de vouloir tirer parti de la forme de la structure à observer, quitte à privilégier certaines zones, qui seront observées avec une plus forte probabilité.

Ceci a conduit par exemple à des systèmes d'échantillonnage de coupes verticales, et au développement d'estimateurs prenant en compte la non-isotropie des coupes (Baddeley et al., 1986; Hahn et al., 1999; Gokhale, 1998). Un autre exemple est l'échantillonnage d'une structure à partir d'un point fixe, ce qui permet malgré tout des estimations de volume (Kiéu et Jensen, 1991; Jensen et Gundersen, 1989; Jensen, 1998).

Dans le cas de la tomate, on cherche à caractériser les paramètres morphométriques en fonction de la profondeur. Il importe donc de connaître cette profondeur pour tous les points observés. Un échantillonnage adapté à cette situation consiste à acquérir des carottes de périsperme perpendiculaires à la surface. Dans chaque carotte, la surface est identifiable, et on peut facilement déterminer la profondeur de chaque point.

Ce protocole d'échantillonnage semble simple à mettre en œuvre, mais pose deux problèmes. Le premier est qu'il est difficile de générer des points uniformément sur une surface quelconque. Ce problème n'admet des solutions que pour des cas simples comme la sphère.

Le deuxième problème est relatif à la profondeur des acquisitions : les points situés en profondeur dans le périsperme ont une probabilité d'échantillonnage plus élevée que les points de la surface. Cela peut s'illustrer avec l'exemple de la figure 4.1.

Si la probabilité d'échantillonnage des observations est connue, une estimation non biaisée est quand même possible. Le principe d'Horvitz-Thompson consiste à pondérer chaque observation par l'inverse de sa probabilité d'échantillonnage (Horvitz et Thompson, 1952). Ce principe est déjà assez ancien, et a déjà été utilisé pour des applications diverses, notamment en stéréologie (Jensen, 1998). L'originalité de notre travail est d'utiliser un protocole d'échantillonnage, et donc des probabilités d'échantillonnage, qui dépendent de la structure étudiée.

Nous présentons d'abord le protocole d'échantillonnage du périsperme de tomate. Puis nous utilisons le principe d'Horvitz-Thompson pour estimer les paramètres géométriques globaux ou locaux du périsperme de tomate. Nous développons ensuite une méthode originale d'approximation locale de la probabilité d'échantillonnage de chaque point. Le développement est conduit d'abord sur des structures du plan, puis sur des structures tridimensionnelles. Nous détaillons finalement le principe du calcul des probabilités d'échantillonnage dans le cas d'une surface de révolution. L'application au périsperme de tomate sera détaillée dans le chapitre 7.

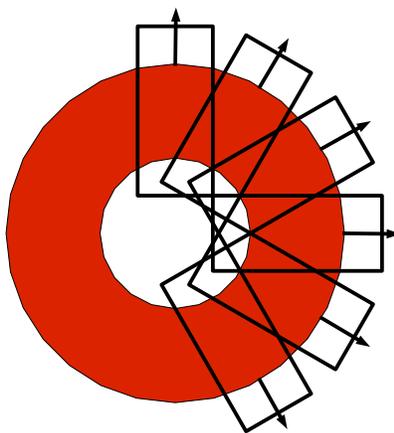


FIG. 4.1 – Illustration du concept d'échantillonnage non uniforme. En plaçant les acquisitions perpendiculairement à la frontière de la structure à échantillonner, un point situé en profondeur sera observé plus souvent qu'un point situé à la surface.

## 4.1 Protocole d'échantillonnage

### 4.1.1 Acquisition perpendiculaire à la surface

Un protocole d'échantillonnage consisterait à débiter la tomate en coupes sériées de même épaisseur, et à acquérir sur chaque coupe des piles d'images 3D disposées de manière à avoir un espacement constant. Toutefois, pour estimer les paramètres locaux définis au chapitre 3 (densités surfacique, volumique...), il est nécessaire de localiser les points observés par rapport à leur distance à la cuticule.

Dans ce contexte, un échantillonnage naturel consiste à prélever des carottes de péri-carpe, perpendiculaires à la surface, et aléatoirement distribuées à la surface (figure 4.2-a). Un échantillon correspondra à un parallélépipède dont l'ordre de grandeur de taille est de  $100 \mu\text{m} \times 1,28 \text{ mm} \times$  l'épaisseur locale du péri-carpe.

### 4.1.2 Formalisation mathématique

De manière générale, on considère deux ensembles aléatoires  $\mathbf{X}$  et  $\mathbf{Y}$ , tels que  $\mathbf{X} \subset \mathbf{Y}$ , et un échantillonnage de  $\mathbf{X}$  qui dépend de la forme de  $\mathbf{Y}$ . Pour un ensemble  $\mathbf{Y}$  donné, on considère un sous-ensemble  $\mathbf{M}$  de la surface externe de  $\mathbf{Y}$  :  $\mathbf{M} \subset \partial\mathbf{Y}$ . Dans le cas de la tomate, on définit  $\mathbf{M}$  comme un sous-ensemble de la surface du péri-carpe qui évite la zone du pédoncule.

On suppose que  $\mathbf{M}$  est une variété deux fois continûment différentiable. Cela permet de définir une normale  $\mathbf{N}(m)$  et deux courbures principales  $\kappa_1(m)$  et  $\kappa_2(m)$  pour tout point  $m \in \mathbf{M}$ . L'hypothèse est raisonnable dans le cas du péri-carpe des tomates que nous avons utilisées, mais devrait être précisée si on travaillait sur des variétés aux formes plus complexes comme les tomates coeur-de-boeuf, aux nombreuses circonvolutions.

Un point  $\mathbf{m}$  est choisi de manière aléatoire dans  $\mathbf{M}$ , puis une sonde  $\mathbf{T}$ , en forme de pavé, est placée parallèlement à la normale  $\mathbf{N}(\mathbf{m})$  et centrée en  $\mathbf{m}$ . L'orientation de la sonde est

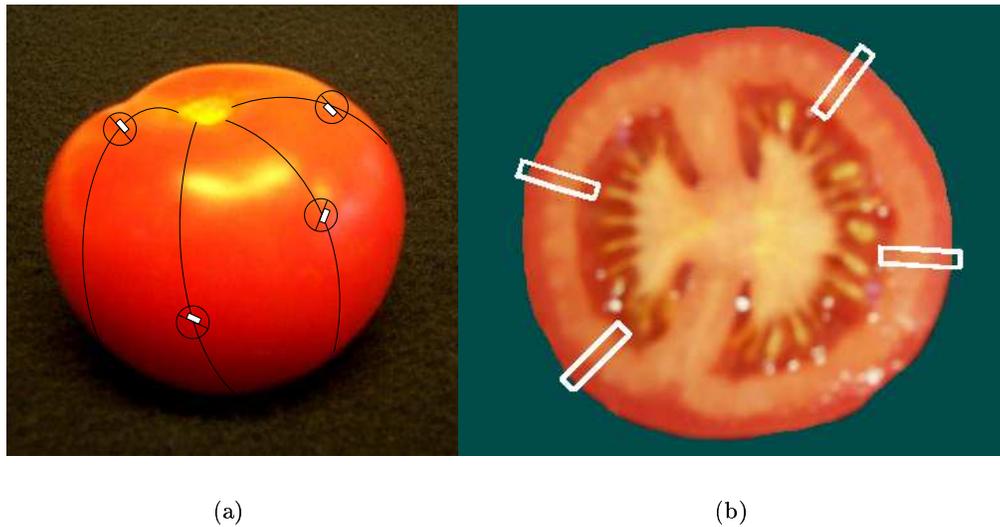


FIG. 4.2 – Échantillonnage du péricarpe de tomate. (a) Les points sont d'abord choisis aléatoirement à la surface de la tomate. (b) Pour chaque position, les images sont acquises séquentiellement, de manière à former une traversée complète depuis la cuticule jusqu'à l'intérieur du péricarpe.

aussi tirée aléatoirement, de manière à assurer l'invariance de la distribution pour toute rotation autour de la normale.

Les traversées obtenues sont donc des réalisations de l'ensemble aléatoire  $\mathbf{X} \cap \mathbf{T}$ .

### 4.1.3 Distribution des points à la surface

Afin de limiter les sources de biais, le point  $\mathbf{m}$  devrait être distribué uniformément à la surface de la tomate. Cependant, échantillonner uniformément une surface quelconque est un problème complexe, qui n'a pas de solution simple, sauf pour des surfaces classiques comme la sphère.

Le péricarpe peut être assez bien représenté par un solide de révolution, dont l'axe passe par l'attache du pédoncule et l'extrémité apicale de la tomate. On utilise cette symétrie pour définir la distance géodésique d'un point à la surface de la tomate : c'est la plus courte distance de ce point au pôle de la tomate, qui correspond à la position du pédoncule. Pour uniformiser en fonction des tomates, qui peuvent avoir des calibres différents, on utilise aussi la distance géodésique relative, exprimée en fraction de la distance géodésique maximale.

La solution que nous avons adoptée est d'échantillonner uniformément par rapport à la distance géodésique, et de choisir la position longitudinale de manière uniforme. Nous verrons dans la section 4.7 que pour une surface de révolution, on peut déterminer la densité surfacique des points d'acquisition notée  $\lambda(m)$ , en fonction de leur distance géodésique.

## 4.2 Estimation des paramètres morphométriques

Nous présentons ici l'estimation des paramètres morphométriques lorsque l'échantillonnage n'est pas uniforme. Plus de détails sur la théorie de l'échantillonnage peuvent être trouvés dans Jensen (1998); Cochran (1977); Snedecor et Cochran (1971, chap. 17), et des exemples d'applications sont donnés dans Overton et Stehman (1995).

### 4.2.1 Paramètres globaux

On veut estimer des paramètres globaux ou locaux de la structure  $\mathbf{X}$  à partir de l'information contenue dans une sonde d'échantillonnage  $\mathbf{T}$ . Les ensembles  $\mathbf{T}$  et  $\mathbf{X}$  ne sont pas nécessairement indépendants, mais on suppose que l'on connaît, pour chaque point  $x$  de  $\mathbf{X}$ , la probabilité conditionnelle  $\mathbb{P}[x \in \mathbf{T} \mid \mathbf{M}]$  qu'il appartienne à la sonde en connaissant la forme de la surface d'échantillonnage  $\mathbf{M}$ . On peut ainsi estimer l'espérance de la surface de  $\mathbf{X}$  en pondérant par la probabilité d'échantillonnage :

$$\widehat{\mathbf{S}} = \int_{\partial\mathbf{X} \cap \mathbf{T}} \mathbb{P}[x \in \mathbf{T} \mid \mathbf{M}]^{-1} dx$$

La notation (3.9) permet de réécrire cet estimateur sous la forme :

$$\widehat{\mathbf{S}} = S\left(\mathbf{X}, I_{\mathbf{T}}(x) \mathbb{P}[x \in \mathbf{T} \mid \mathbf{M}]^{-1}\right) \quad (4.1)$$

On peut vérifier que c'est un estimateur non biaisé, en calculant son espérance sachant  $\mathbf{X}$  et  $\mathbf{M}$  :

$$\begin{aligned} \mathbb{E}\left[\widehat{\mathbf{S}} \mid \mathbf{X}, \mathbf{M}\right] &= \mathbb{E}\left[\int_{\partial\mathbf{X}} \varphi(x) dx \mid \mathbf{X}, \mathbf{M}\right] \\ &= \mathbb{E}\left[\int_{\partial\mathbf{X}} I_{\mathbf{T}}(x) \mathbb{P}[x \in \mathbf{T} \mid \mathbf{M}]^{-1} dx \mid \mathbf{X}, \mathbf{M}\right] \end{aligned}$$

Le conditionnement par rapport à  $\mathbf{X}$  permet de considérer  $\mathbf{X}$  comme un ensemble déterministe. Nous changeons l'ordre de l'intégrale et de l'espérance, en isolant la fonction indicatrice sur  $\mathbf{T}$  :

$$\mathbb{E}\left[\widehat{\mathbf{S}} \mid \mathbf{X}, \mathbf{M}\right] = \int_{\partial\mathbf{X}} \mathbb{E}[I_{\mathbf{T}}(x) \mid \mathbf{X}, \mathbf{M}] \mathbb{P}[x \in \mathbf{T} \mid \mathbf{M}]^{-1} dx$$

Or, la valeur de  $I_{\mathbf{T}}(x)$  ne dépend pas de  $\mathbf{X}$ , son espérance conditionnelle sachant  $\mathbf{X}$  et  $\mathbf{M}$  ne dépend que de son espérance conditionnelle sachant  $\mathbf{M}$ , ce qui permet de simplifier ce terme avec  $\mathbb{P}[x \in \mathbf{T} \mid \mathbf{M}]^{-1}$ . On obtient la formule :

$$\mathbb{E}\left[\widehat{\mathbf{S}} \mid \mathbf{X}, \mathbf{M}\right] = \int_{\partial\mathbf{X}} dx = \mathbf{S}$$

ce qui prouve que l'estimateur est sans biais. De manière similaire, on estime le volume, l'épaisseur moyenne et le nombre de cellules d'un péricarpe par :

$$\widehat{\mathbf{V}} = V\left(\mathbf{X}, I_{\mathbf{T}}(\cdot) \mathbb{P}[\cdot \in \mathbf{T} \mid \mathbf{M}]^{-1}\right) \quad (4.2)$$

$$\widehat{\mathbf{b}} = \bar{b} \left( \mathbf{X}, I_{\mathbf{T}}(\cdot) \mathbb{P}[\cdot \in \mathbf{T} \mid \mathbf{M}]^{-1} \right) \quad (4.3)$$

$$\widehat{\chi} = \chi \left( \mathbf{X}, I_{\mathbf{T}}(\cdot) \mathbb{P}[\cdot \in \mathbf{T} \mid \mathbf{M}]^{-1} \right) \quad (4.4)$$

Dans le cas des paramètres  $\bar{\mathbf{b}}$  et  $\chi$ , on a besoin de mesurer localement les courbures principales d'un point. Cela est difficile lorsque le point est situé au bord de la sonde  $\mathbf{T}$ . En pratique, on se restreindra donc à des mesures sur un ensemble contenu dans  $\mathbf{T}$ , mais qui ne touche pas ses bords.

### 4.2.2 Paramètres locaux

Pour les densités, on obtient facilement des estimateurs sans biais pour les intégrales du type  $V_V(\varphi)$ ,  $S_V(\varphi)$ ,  $\bar{b}_V(\varphi)$ ,  $\chi_V(\varphi)$ , telles que définies en section 3.3.3. Par exemple, la densité surfacique locale  $S_V(\varphi)$ , définie par la relation (3.25), peut être estimée à partir de ce qu'on observe dans  $\mathbf{T}$  :

$$\widehat{S}_V(\varphi) = \int_{\partial \mathbf{X}} \varphi(p(x)) I_{\mathbf{T}}(x) \mathbb{P}[x \in \mathbf{T} \mid \mathbf{M}]^{-1} dx \quad (4.5)$$

On peut vérifier que l'estimateur est sans biais. Son espérance sachant  $\mathbf{X}$  et  $\mathbf{M}$  s'exprime en effet par :

$$\begin{aligned} \mathbb{E} \left[ \widehat{S}_V(\varphi) \mid \mathbf{X}, \mathbf{M} \right] &= \mathbb{E} \left[ \int_{\partial \mathbf{X} \cap \mathbf{T}} \varphi(p(x)) I_{\mathbf{T}}(x) \mathbb{P}[x \in \mathbf{T} \mid \mathbf{M}]^{-1} dx \mid \mathbf{X}, \mathbf{M} \right] \\ &= \int_{\partial \mathbf{X}} \varphi(p(x)) \mathbb{E}[I_{\mathbf{T}}(x) \mid \mathbf{M}] \mathbb{P}[x \in \mathbf{T} \mid \mathbf{M}]^{-1} dx \\ &= \int_{\partial \mathbf{X}} \varphi(p(x)) dx \end{aligned}$$

En pratique, on préfère estimer la forme ponctuelle  $S_V(p)$  de la densité plutôt que sa forme fonctionnelle  $S_V(\varphi)$ , car elle est plus facile à représenter graphiquement. Cela est possible si on arrive à exprimer l'estimateur (4.5) sous la forme :

$$\widehat{S}_V(\varphi) = \int_0^\infty \varphi(p) \alpha(\partial \mathbf{X} \cap \mathbf{T}, p) dp \quad (4.6)$$

Par identification avec la définition (3.25), nous pourrions ainsi estimer la densité surfacique par :

$$\widehat{S}_V(p) = \frac{\alpha(\partial \mathbf{X} \cap \mathbf{T}, p)}{\mathbb{E}[S_{\mathbf{Y}}(p)]}$$

Nous verrons dans le chapitre 5 comment exprimer l'estimateur (4.5) sous la forme (4.6) lorsque les données se présentent sous la forme d'images discrètes.

## 4.3 Cas d'une sonde perpendiculaire à une surface

Nous avons vérifié que l'on pouvait estimer les paramètres morphométriques globaux (volume, surface,...) ainsi que locaux (densités) dans le cas d'un échantillonnage non uniforme, en corrigeant par la probabilité d'échantillonnage de chaque point. Nous allons maintenant montrer que pour des sondes perpendiculaires à une surface, cette probabilité peut être approchée en utilisant des propriétés locales autour des points d'échantillonnage.

### 4.3.1 Démarche

Nous conduirons le raisonnement successivement pour des structures du plan et de l'espace, en suivant trois étapes :

1. Calcul de la probabilité d'échantillonnage conditionnelle à la position  $\mathbf{m}$  de la sonde :

$$\mathbb{P}[x \in \mathbf{T} \mid \mathbf{m}] \quad (4.7)$$

Cette probabilité ne dépend que de la distance de  $x$  à  $\mathbf{N}(\mathbf{m})$ , la normale à  $\mathbf{M}$  en  $\mathbf{m}$ , et des dimensions de la sonde.

2. Caractérisation du morceau de surface formé par tous les points  $m \in \mathbf{M}$  tels que la probabilité que  $x$  appartienne à une sonde centrée sur  $m$  ne soit pas nulle. On appelle  $\mathbf{M}(x)$  ce morceau de surface :

$$\mathbf{M}(x) = \{m \in \mathbf{M} : \mathbb{P}[x \in \mathbf{T} \mid \mathbf{m} = m] > 0\} \quad (4.8)$$

3. Intégration de la probabilité d'échantillonnage conditionnelle sur  $\mathbf{M}(x)$ . On doit prendre en compte à ce niveau la densité  $\lambda(m)$  des points d'acquisition à la surface du péricarpe. On obtient la probabilité d'échantillonnage du point  $x$  :

$$\mathbb{P}[x \in \mathbf{T} \mid \mathbf{M}] = \int_{\mathbf{M}(x)} \mathbb{P}[x \in \mathbf{T} \mid \mathbf{m} = m] \lambda(m) dm \quad (4.9)$$

### 4.3.2 Projection sur la frontière

Afin de simplifier le raisonnement de la deuxième étape, il est pratique de considérer que le morceau de surface  $\mathbf{M}(x)$  est d'un seul tenant, simplement connexe. Cette simplification est assurée par une hypothèse de régularité.

**Hypothèse :** Tout point de  $\mathbf{X}$  se situe à une distance de  $\mathbf{M}$  inférieure à l'inverse de la plus grande courbure principale de  $\mathbf{M}$ .

$$\max_{x \in \mathbf{X}} d(x, \mathbf{M}) < \min_{m \in \mathbf{M}} \min_i \kappa_i(m)^{-1} \quad (4.10)$$

Cette hypothèse permet de s'assurer que le point  $x$  se projette orthogonalement de manière unique sur  $\mathbf{M}$ . On appelle  $m_0(x)$  ce projeté.

### 4.3.3 Localisation du calcul

Nous allons montrer maintenant que l'on peut travailler dans un voisinage local de  $m_0(x)$ . On raisonne ici conditionnellement à  $\mathbf{M}$ .

On considère des sondes convexes  $\mathbf{T}_\delta$ , de même géométrie à un facteur d'échelle  $\delta$  près. On note  $\mathbf{M}_\delta(x)$  le morceau de surface défini par l'équation (4.8) pour la sonde  $\mathbf{T}_\delta$ . On a la suite d'implications suivantes :

$$\begin{aligned} \delta_1 < \delta_2 &\Rightarrow \mathbb{P}[x \in \mathbf{T}_{\delta_1} \mid \mathbf{m} = m] \leq \mathbb{P}[x \in \mathbf{T}_{\delta_2} \mid \mathbf{m} = m] \\ &\Rightarrow (x \in \mathbf{M}_{\delta_1}(x) \Rightarrow x \in \mathbf{M}_{\delta_2}(x)) \end{aligned}$$

ce qui amène finalement :

$$\delta_1 < \delta_2 \Rightarrow \mathbf{M}_{\delta_1}(x) \subset \mathbf{M}_{\delta_2}(x) \quad (4.11)$$

Si on considère des sondes dont la taille est de plus en plus petite, les domaines correspondants seront de moins en moins étendus, tout en étant inclus les uns dans les autres.

Le point  $x$  se situe le long de la normale  $\mathbf{N}(m_0(x))$ , il appartient donc à la sonde quelle que soit son épaisseur, même si elle est nulle. On a ainsi pour une sonde de largeur  $\delta = 0$  :

$$\mathbf{M}_0(x) = \{m_0(x)\} \quad (4.12)$$

Si  $\delta_n$  est une suite décroissante tendant vers 0, alors on a :

$$\mathbf{M}_{\delta_n}(x) \downarrow \{m_0(x)\} \quad (4.13)$$

Une conséquence importante est que pour tout voisinage  $V_0$  autour de  $m_0(x)$ , il existe un  $\delta$  suffisamment petit tel que  $\mathbf{M}_\delta(x) \subset V_0$ . Cette propriété nous permet de travailler dans un voisinage local de  $m_0(x)$ .

Cette localisation permettra d'utiliser une paramétrisation locale de la surface  $\mathbf{M}_\delta$ , afin de simplifier les calculs. Une autre simplification concerne la densité  $\lambda(m)$ , qui peut être considérée constante sur  $\mathbf{M}_\delta(x)$  et égale à  $\lambda(m_0(x))$ .

## 4.4 Calcul pour une structure du plan

Dans le plan, la sonde  $\mathbf{T}$  se ramène à un rectangle, de largeur  $\delta$ , et de longueur arbitrairement grande devant l'épaisseur de la structure. De plus, pour un point  $\mathbf{m} \in \mathbf{M}$  fixé, l'orientation de la sonde est fixe (voir la figure 4.3).

### 4.4.1 Condition d'échantillonnage

La probabilité conditionnelle  $\mathbb{P}[x \in \mathbf{T} | \mathbf{m}]$  est simplement égale à 1 si  $x \in \mathbf{T}$  et à 0 sinon (voir la figure 4.3). Il faut caractériser l'ensemble  $\mathbf{M}_\delta(x)$  des points  $m$  pour lesquels cette probabilité n'est pas nulle. Cela revient à poser une condition sur la distance entre le point et la normale au point  $m$  :

$$\begin{aligned} \mathbf{M}_\delta(x) &= \{m \in M : x \in \mathbf{T}\} \\ &= \left\{ m \in M : d(x, \mathbf{N}(m)) \leq \frac{\delta}{2} \right\} \end{aligned} \quad (4.14)$$

La probabilité d'échantillonnage de  $x$  s'obtient en intégrant  $\lambda(m)$  sur l'ensemble  $\mathbf{M}_\delta(x)$ . En considérant que la taille de la sonde est suffisamment petite, la densité  $\lambda(m)$  est constante sur  $\mathbf{M}_\delta(x)$ , et égale à  $\lambda(m_0(x))$ . La probabilité d'échantillonnage s'exprime à partir de la longueur de  $\mathbf{M}_\delta(x)$ , notée  $\mathbf{L}_\delta(x)$ , et de la densité surfacique des points d'acquisition autour de  $m_0(x)$  :

$$\mathbb{P}[x \in \mathbf{T} | \mathbf{M}] \simeq \lambda(m_0(x)) \mathbf{L}_\delta(x) \quad (4.15)$$

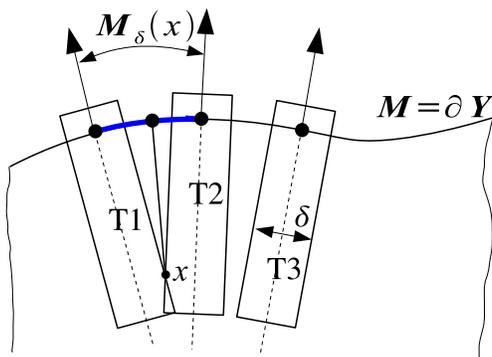


FIG. 4.3 – Échantillonnage d'un point dans une structure du plan. Les sondes **T1** et **T2** représentent les deux cas limites d'échantillonnage de  $x$  : la distance de  $x$  à leur axe central est de  $\delta/2$ . Une sonde située plus loin, telle **T3**, n'échantillonne pas le point  $x$ . Le domaine  $\mathbf{M}_\delta(x)$ , contenant tous les points échantillonnant  $x$  est représenté en bleu.

Pour une distribution uniforme des points d'acquisition sur  $\mathbf{M}$ , la densité  $\lambda(m)$  est égale à  $1/\mathbf{L}$  pour tout point  $\mathbf{m}$ , où  $\mathbf{L}$  est la longueur de  $\mathbf{M}$ . La probabilité s'exprime comme un rapport de longueurs multipliée par le nombre de points d'acquisition :

$$\mathbb{P}[x \in \mathbf{T} \mid \mathbf{M}] \simeq \frac{N_p \mathbf{L}_\delta(x)}{\mathbf{L}} \quad (4.16)$$

#### 4.4.2 Paramétrisation locale

Nous allons utiliser une approximation locale de la courbe au voisinage de  $m_0(x)$ . On se place pour cela dans le système de coordonnées centré sur  $m_0(x)$ , dont le premier axe correspond à la tangente en  $m_0(x)$ , et le deuxième axe à la normale en  $m_0(x)$ . L'axe normal est orienté vers l'intérieur de  $\mathbf{Y}$ . Le point  $x$  a pour coordonnées  $(0, p)$ , où  $p$  est la distance de  $x$  à  $\mathbf{M}$  (voir la figure 4.4).

Grâce à l'hypothèse de régularité, il existe un voisinage  $V_0$  de  $m_0(x)$  où  $\mathbf{M}$  admet une paramétrisation locale sous la forme

$$u \rightarrow (u, f(u)) \quad (4.17)$$

La propriété (4.13) implique que  $\mathbf{M}_\delta(x) \subset V_0$  pour  $\delta$  assez petit. Pour caractériser  $\mathbf{M}_\delta(x)$ , on peut donc se focaliser uniquement sur les  $m$  dans  $V_0$  où la paramétrisation locale est valide. Comme  $\mathbf{M}$  est supposée deux fois continûment différentiable en  $m_0(x)$ , on peut faire un développement de Taylor à l'ordre 2 de  $f$

$$f(u) = f(0) + u f'(0) + \frac{u^2}{2} f''(0) + O(u^3)$$

Du fait du choix du système de coordonnées, on a  $f(0) = f'(0) = 0$ . De plus,  $f''(0)$  est

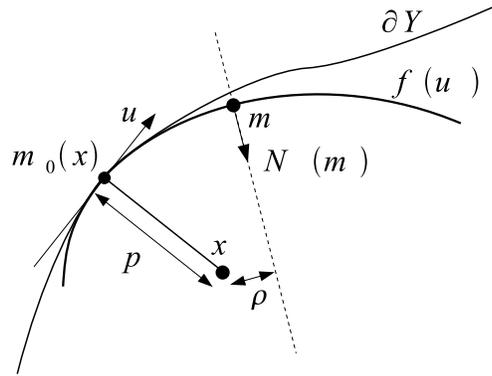


FIG. 4.4 – Paramétrisation locale de la courbe d'échantillonnage. On projette le point  $x$  sur  $\mathbf{M}$ , ici confondu avec  $\partial\mathbf{Y}$ , puis on remplace  $\mathbf{M}$  par une approximation parabolique autour de  $m_0(x)$ , orientée selon la normale  $\mathbf{N}(m)$ , et de même dérivée seconde que  $\mathbf{M}$  en  $m_0(x)$ .

égale à la courbure de  $\mathbf{M}$  en  $m_0(x)$ , que l'on note  $\kappa$ . On a donc :

$$f(u) = \frac{\kappa}{2}u^2 + O(u^3)$$

et :

$$f'(u) = \kappa u + O(u^2)$$

### 4.4.3 Calcul de la distance à la normale dans le repère local

On est maintenant prêt à calculer une approximation locale de la distance entre  $x$  et l'axe principal de la sonde :

$$d(x, \mathbf{N}(m))$$

La direction de la droite tangente en  $m$  est donnée par le gradient de la fonction (4.17) :

$$\begin{pmatrix} 1 \\ f'(u) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 \\ \kappa u + O(u^2) \end{pmatrix}$$

La normale en  $\mathbf{N}(m)$  a donc pour direction

$$v = \begin{pmatrix} -\kappa u + O(u^2) \\ 1 \end{pmatrix}$$

Un point sur  $\mathbf{N}(m)$  a des coordonnées de la forme  $m + vt$ , où  $t$  est un réel :

$$\begin{pmatrix} u - \kappa ut + O(u^2) \\ t + \frac{\kappa}{2}u^2 + O(u^3) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} u - \kappa ut + O(u^2) \\ t + O(u^2) \end{pmatrix}$$

Pour trouver la distance de  $x$  à  $\mathbf{N}(m)$ , il suffit de calculer la projection de  $x$  sur  $\mathbf{N}(m)$  et la distance entre cette projection et  $x$ . Les coordonnées de  $x$  sont de la forme :

$$\begin{pmatrix} 0 \\ p \end{pmatrix}$$

où  $p$  est la profondeur de  $x$ . Pour calculer la projection de  $x$  sur  $\mathbf{N}(m)$ , on exprime la condition d'orthogonalité  $(x_p - x) \perp v$  entre le vecteur joignant  $x$  à son projeté, et le vecteur directeur de la normale :

$$\begin{pmatrix} u - \kappa ut + O(u^2) \\ t - p + \frac{\kappa}{2}u^2 + O(u^3) \end{pmatrix} \perp \begin{pmatrix} -\kappa u + O(u^2) \\ 1 \end{pmatrix}$$

C'est-à-dire

$$-p - \frac{\kappa}{2}u^2 + (1 + \kappa^2 u^2)t + O(u^3) = 0$$

On résout l'équation en  $t$  et on fait un développement limité du dénominateur :

$$t = p + \frac{\kappa}{2} - \kappa^2 u^2 + O(u^3) = p + O(u^2)$$

En réinjectant  $t$  dans la paramétrisation de la normale, on obtient les coordonnées du projeté de  $x$  sur  $N(m)$  :

$$\begin{pmatrix} u(1 - \kappa p) + O(u^2) \\ p + O(u^2) \end{pmatrix}$$

Le carré de la distance de  $x$  à  $\mathbf{N}(m)$  est donc :

$$d^2(x, \mathbf{N}(m)) = (1 - \kappa p)^2 u^2 + O(u^3) \quad (4.18)$$

Ceci nous permet d'exprimer la condition d'échantillonnage sous la forme :

$$(1 - \kappa p)^2 u^2 + O(u^3) \leq \frac{\delta^2}{4} \quad (4.19)$$

#### 4.4.4 Encadrement de la surface d'échantillonnage

Nous cherchons à donner une expression de la surface  $\mathbf{M}_\delta(x)$ , l'ensemble de tous les points de  $\mathbf{M}$  qui échantillonnent  $x$ . Par définition, le terme  $O(u^3)$  admet un encadrement du type

$$-a|u|^3 \leq O(u^3) \leq a|u|^3, \quad a \geq 0$$

On a les implications suivantes :

$$\begin{aligned} u^2 + O(u^3) \leq \frac{\delta^2}{4(1 - \kappa p)^2} &\Rightarrow u^2 - a|u|^3 \leq \frac{\delta^2}{4(1 - \kappa p)^2} \\ u^2 + O(u^3) \leq \frac{\delta^2}{4(1 - \kappa p)^2} &\Leftarrow u^2 + a|u|^3 \leq \frac{\delta^2}{4(1 - \kappa p)^2} \end{aligned}$$

Les ensembles  $\mathbf{M}_\delta^-(x)$  et  $\mathbf{M}_\delta^+(x)$ , définis par la relation (4.20), encadrent  $\mathbf{M}_\delta(x)$  :

$$\mathbf{M}_\delta^\pm(x) = \left\{ (u, f(u)) : u^2 \pm a|u|^3 \leq \frac{\delta^2}{4(1 - \kappa p)^2} \right\} \quad (4.20)$$

On a ainsi :

$$\mathbf{M}_\delta^-(x) \subset \mathbf{M}_\delta(x) \subset \mathbf{M}_\delta^+(x)$$

On peut résoudre l'équation de troisième degré en  $u$ , et faire un développement de Taylor de la solution. On trouve ainsi :

$$\mathbf{M}_\delta^-(x) = \left\{ (u, f(u)) : |u| \leq \frac{\delta}{2(1-\kappa p)} + O(\delta^2) \right\}$$

$$\mathbf{M}_\delta^+(x) = \left\{ (u, f(u)) : |u| \leq \frac{\delta}{2(1-\kappa p)} + O(\delta^2) \right\}$$

On calcule la longueur de  $\mathbf{M}_\delta^\pm(x)$  par intégration sur cet ensemble du jacobien de la fonction de paramétrisation (4.17). Le jacobien s'exprime par  $\sqrt{1 + (\kappa u)^2 + O(u^2)}$ , mais un développement limité de la racine le ramène à  $1 + O(u^2)$ . L'intégrale devient donc :

$$\mathbf{L}_\delta^\pm(x) = \int_{\mathbf{M}_\delta^\pm(x)} (1 + O(u^2)) du$$

Après intégration sur le domaine  $\mathbf{M}_\delta^\pm(x)$ , on en déduit le résultat :

$$\mathbf{L}_\delta(x) = \frac{\delta}{1-\kappa p} + O(\delta^2) \quad (4.21)$$

Lorsque la sonde est de petite taille, la probabilité d'échantillonnage d'un point dans une structure 2D ne dépend ainsi que de la profondeur du point, de la courbure locale de la courbe  $\mathbf{M}$ , et bien sûr de la taille de la sonde.

#### 4.4.5 Expression de la probabilité d'échantillonnage

D'après la formule (4.15), la probabilité d'échantillonnage s'exprime à partir de la longueur de l'ensemble  $\mathbf{M}_\delta(x)$ , et de la densité locale des points d'acquisition. On obtient donc la probabilité d'échantillonnage d'un point  $x$  :

$$\mathbb{P}[x \in \mathbf{T} \mid \mathbf{M}] = \lambda(m_0(x)) \frac{\delta}{1-\kappa p} + O(\delta^2) \quad (4.22)$$

### 4.5 Extension au cas tridimensionnel

Le dispositif d'échantillonnage est maintenant une sonde de base rectangulaire et dont l'axe central est aligné sur la normale en un point  $\mathbf{m}$  de  $\mathbf{M}$ . On note  $\delta$  et  $f\delta$  les côtés de la sonde :  $\delta$  est la taille du plus petit côté, et  $f$  est le facteur de forme, défini comme le rapport du plus grand côté sur le plus petit. Donc  $f > 1$ , et  $f$  est fini.

Nous allons comme pour le cas 2D exprimer la probabilité d'échantillonnage conditionnelle  $\mathbb{P}[x \in \mathbf{T} \mid \mathbf{m}]$ , et trouver une paramétrisation locale de la surface  $\mathbf{M}$ . Nous calculerons ensuite la distance du point à la normale en  $\mathbf{m}$ , ce qui nous permettra d'intégrer la probabilité conditionnelle sur  $\mathbf{M}$ , et finalement d'exprimer la probabilité d'échantillonnage de  $x$ .

### 4.5.1 Probabilité d'échantillonnage conditionnelle

La probabilité d'échantillonnage conditionnellement à  $m$  d'un point  $x$  de  $\mathbb{R}^3$  s'exprime par :

$$p(m) = \mathbb{P}[x \in \mathbf{T} \mid \mathbf{m} = m] \quad (4.23)$$

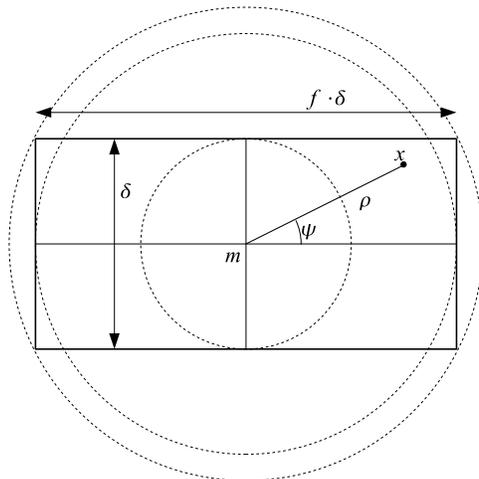


FIG. 4.5 – Condition d'échantillonnage en 3D. La normale  $\mathbf{N}(m)$  est perpendiculaire au plan de la figure. Le bord de la sonde  $\mathbf{T}$  est représenté par le rectangle en traits pleins. La position d'un point  $x$  de l'espace par rapport à  $\mathbf{N}(m)$  est entièrement déterminée par ses coordonnées polaires  $(\rho, \psi)$  dans le plan perpendiculaire à la normale.

Cette probabilité ne dépend que de la distance  $\rho$  entre  $x$  et  $\mathbf{N}(m)$  et des longueurs  $\delta$  et  $f\delta$ . La condition d'échantillonnage est illustrée par la figure 4.5. La probabilité conditionnelle d'échantillonnage est égale à la fraction de l'arc de cercle de rayon  $\rho$  centré en  $m$  et à l'intérieur du rectangle de la sonde. Pour calculer ces fractions, on distingue quatre zones de l'espace délimitées par les cercles concentriques en traits discontinus. Le calcul des fractions d'arcs de cercle est basé sur des opérations trigonométriques élémentaires qu'on ne détaille pas ici. On obtient les expressions suivantes de la probabilité conditionnelle d'échantillonnage  $\mathbb{P}[x \in \mathbf{T} \mid \mathbf{m} = m]$  :

$$\mathbb{P}[x \in \mathbf{T} \mid \mathbf{m} = m] = \begin{cases} 1 & \text{si } \rho \leq \frac{\delta}{2} \\ \frac{2}{\pi} \arcsin \frac{\delta}{2\rho} & \text{si } \frac{\delta}{2} \leq \rho \leq \frac{f\delta}{2} \\ \frac{2}{\pi} \left( \arcsin \frac{\delta}{2\rho} - \arccos \frac{f\delta}{2\rho} \right) & \text{si } \frac{f\delta}{2} \leq \rho \leq \frac{\delta}{2} \sqrt{1+f^2} \\ 0 & \text{si } \rho \geq \frac{\delta}{2} \sqrt{1+f^2} \end{cases} \quad (4.24)$$

La probabilité conditionnelle d'échantillonnage d'un point sachant la position de la sonde dépend uniquement des dimensions de la sonde et de la distance du point à la

normale. Un exemple pour une sonde de dimension  $8 \times 10$  est montré sur la figure 4.6. On a deux “décrochements”, qui correspondent au passage d’une zone circulaire à l’autre. Si la sonde est carrée ( $f = 1$ ), on n’a qu’un seul décrochement.

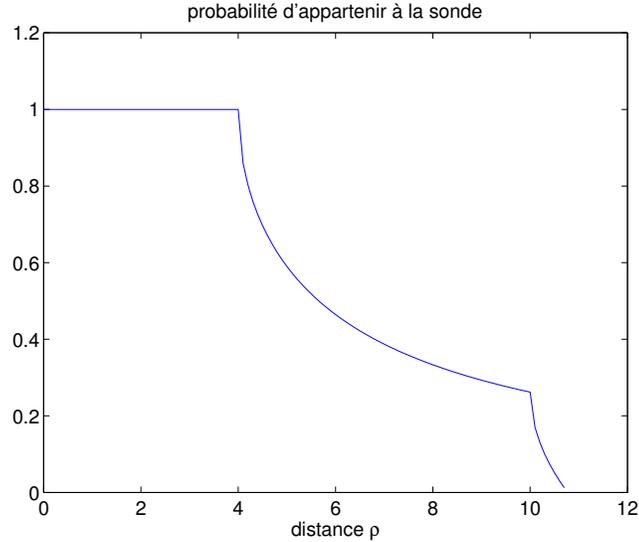


FIG. 4.6 – Probabilité d’appartenir à la sonde, en fonction de  $\rho$ , la distance du point à la normale.

Le calcul des probabilités d’échantillonnage nécessite donc de pouvoir exprimer analytiquement la distance  $\rho$ , ce qui est possible en utilisant une paramétrisation locale de la surface autour du point  $m_0(x)$ .

#### 4.5.2 Paramétrisation locale

Pour effectuer un certain nombre de calculs sur la surface  $\mathbf{M}$ , on utilise une paramétrisation locale autour du point  $x_0$  de la forme

$$u = \begin{pmatrix} u_1 \\ u_2 \end{pmatrix} \rightarrow m = \begin{pmatrix} u_1 \\ u_2 \\ f(u) \end{pmatrix} \quad (4.25)$$

Les coordonnées sont spécifiées par rapport à un référentiel orthonormé, centré en  $m_0(x)$  dont les 2 premiers axes correspondent aux directions des courbures principales et le troisième à la normale en  $m_0(x)$  à  $\mathbf{M}$ .

La paramétrisation de la surface peut s’écrire en fonction des 2 courbures principales  $\kappa_1$  et  $\kappa_2$  :

$$f(u) = \frac{\kappa_1}{2}u_1^2 + \frac{\kappa_2}{2}u_2^2 + O(\|u\|^3)$$

Le jacobien de cette paramétrisation permet de calculer des intégrales le long de  $\mathbf{M}$ . Son développement à l’ordre 2 est le suivant :

$$J(u) = 1 + O(\|u\|^2) \quad (4.26)$$

On retrouve une forme similaire au cas 2D. Le calcul de l'intégrale de la probabilité d'échantillonnage, définie pour tout élément de surface  $dm$ , sur le domaine  $\mathbf{M}$ , s'écrira donc de la façon suivante :

$$\begin{aligned}\mathbb{P}[x \in \mathbf{T} \mid \mathbf{M}] &= \int_{\mathbf{M}} p(m) \lambda(m) dm \\ &= \lambda(m_0(x)) \int_{\mathbf{M}} p(u) (1 + O(\|u\|^2)) du\end{aligned}$$

### 4.5.3 Approximation de la distance à la normale

Le calcul de la probabilité conditionnelle de  $x$  dépend de la distance de  $x$  à la normale. Nous allons exprimer cette distance. Le point situé en  $m = (u_1, u_2, f(u))$  admet une normale  $\mathbf{N}(m)$  de vecteur directeur :

$$v = \frac{\partial}{\partial u_1} f(u) \wedge \frac{\partial}{\partial u_2} f(u) = \begin{pmatrix} -\kappa_1 u_1 + O(\|u\|^2) \\ -\kappa_2 u_2 + O(\|u\|^2) \\ 1 \end{pmatrix}$$

Un point de la normale peut être défini par l'équation paramétrique  $y = m + tv$ , soit :

$$y = \begin{pmatrix} (1 - t\kappa_1) u_1 + O(\|u\|^2) \\ (1 - t\kappa_2) u_2 + O(\|u\|^2) \\ t + O(\|u\|^2) \end{pmatrix}$$

Il est donc possible de calculer les coordonnées de  $x_p$ , la projection de  $x$  sur  $\mathbf{N}(m)$ , en résolvant l'équation  $(x_p - x) \cdot v = 0$  pour  $t$ , et en injectant la solution dans la représentation paramétrique de  $\mathbf{N}(m)$ . La condition d'orthogonalité s'exprime sous la forme

$$0 = \begin{pmatrix} (1 - t\kappa_1) u_1 + O(\|u\|^2) \\ (1 - t\kappa_2) u_2 + O(\|u\|^2) \\ t - p + O(\|u\|^2) \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} -\kappa_1 u_1 + O(\|u\|^2) \\ -\kappa_2 u_2 + O(\|u\|^2) \\ 1 \end{pmatrix}$$

ce qui donne comme solution pour  $t$  :

$$t = \frac{p + \kappa_1 u_1^2 + \kappa_2 u_2^2 + O(\|u\|^3)}{1 + \kappa_1 u_1^2 + \kappa_2 u_2^2}$$

Cette expression se simplifie ensuite grâce au développement limité  $(1+x)^{-1} = 1-x+x^2 \dots$ . Il n'y a aucun terme linéaire, ce qui nous donne

$$t = p + O(\|u\|^2)$$

On obtient finalement les coordonnées du projeté de  $x$  sur  $\mathbf{N}(m)$  :

$$\begin{pmatrix} (1 - \kappa_1 p) u_1 + O(\|u\|^2) \\ (1 - \kappa_2 p) u_2 + O(\|u\|^2) \\ p + O(\|u\|^2) \end{pmatrix}$$

La distance de  $x$  à la normale se calcule ensuite classiquement :

$$d(x, \mathcal{N}(m))^2 = (1 - \kappa_1 p)^2 u_1^2 + (1 - \kappa_2 p)^2 u_2^2 + O(\|u\|^3) \quad (4.27)$$

#### 4.5.4 Intégration de la probabilité conditionnelle

Nous avons vu avec l'équation (4.24) que la probabilité d'échantillonnage de  $x$  par  $\mathbf{T}$  dépend de la distance entre  $x$  et la normale en  $\mathbf{m}$ , la position de la sonde. La formule (4.27) permet d'exprimer cette distance en fonction de la paramétrisation locale de  $\mathbf{M}$ . Il reste à intégrer la probabilité conditionnelle par rapport à  $m$  sur tous les points de  $\mathbf{M}$  :

$$\mathbb{P}[x \in \mathbf{T}|\mathbf{M}] = \int_{\mathbf{M}} \mathbb{P}[x \in \mathbf{T}|\mathbf{m} = m] \lambda(m) dm$$

L'hypothèse de localisation permet de considérer que la densité des points d'acquisition  $\lambda(m)$  est constante, et égale à  $\lambda(m_0(x))$  :

$$\mathbb{P}[x \in \mathbf{T}|\mathbf{M}] = \lambda(m_0(x)) \int_{\mathbf{M}} \mathbb{P}[x \in \mathbf{T}|\mathbf{m} = m] dm \quad (4.28)$$

D'après la formule (4.24), on peut décomposer  $\mathbf{M}$  en quatre domaines, en forme de disques et d'anneaux, correspondant aux différentes conditions de distance. En fait, il est plus astucieux de regrouper les termes en arcsin, qui sont identiques pour  $\rho \in \left[\frac{\delta}{2}; \frac{\delta}{2}\sqrt{f^2+1}\right]$ . Ceci conduit à utiliser des domaines qui se recouvrent :

$$\begin{aligned} \int_{\mathbf{M}} \mathbb{P}[x \in \mathbf{T}|\mathbf{m} = m] dm &= \int_{\mathcal{A}} dm \\ &+ \frac{2}{\pi} \int_{\mathcal{B}} \arcsin \frac{\delta}{2d(x, \mathbf{N}(m))} dm \\ &- \frac{2}{\pi} \int_{\mathcal{C}} \arccos \frac{f\delta}{2d(x, \mathbf{N}(m))} dm \end{aligned}$$

avec les trois domaines suivants :

$$\mathcal{A} = \left\{ m \in \mathbf{M} : d(x, \mathbf{N}(m)) \leq \frac{\delta}{2} \right\} \quad (4.29)$$

$$\mathcal{B} = \left\{ m \in \mathbf{M} : \frac{\delta}{2} \leq d(x, \mathbf{N}(m)) \leq \frac{\delta}{2}\sqrt{f^2+1} \right\} \quad (4.30)$$

$$\mathcal{C} = \left\{ m \in \mathbf{M} : \frac{f\delta}{2} \leq d(x, \mathbf{N}(m)) \leq \frac{\delta}{2}\sqrt{f^2+1} \right\} \quad (4.31)$$

##### 4.5.4.1 Domaine A

Le domaine  $\mathcal{A}$  est défini par l'ensemble des points  $m$  qui vérifient :  $d(x, \mathbf{N}(m)) \leq \frac{\delta}{2}$ . En exprimant la distance à la normale en fonction des variables de paramétrisation (4.27), nous avons :

$$(1 - \kappa_1 p)^2 u_1^2 + (1 - \kappa_2 p)^2 u_2^2 + O(\|u\|^3) \leq \frac{\delta^2}{4}$$

Si on pose

$$\tilde{u} = ((1 - \kappa_1 p)u_1, (1 - \kappa_2 p)u_2)$$

l'inégalité ci-dessus se réécrit

$$\|\tilde{u}\|^2 + O(\|u\|^3) \leq \frac{\delta^2}{4}$$

Le rapport des normes  $\|\tilde{u}\|$  et  $\|u\|$  est borné (ellipse rapportée à un cercle) :

$$\inf((1 - \kappa_1 p)^2, (1 - \kappa_2 p)^2) \leq \frac{\|\tilde{u}\|^2}{\|u\|^2} \leq \sup((1 - \kappa_1 p)^2, (1 - \kappa_2 p)^2)$$

On en déduit

$$O(\|u\|^3) = O(\|\tilde{u}\|^3)$$

On a donc

$$\mathcal{A} = \left\{ (u_1, u_2, f(u)) : \|\tilde{u}\|^2 + O(\|\tilde{u}\|^3) \leq \frac{\delta^2}{4} \right\}$$

On peut encadrer cet ensemble par  $\mathcal{A}^-$  et  $\mathcal{A}^+$  où

$$\mathcal{A}^\pm = \left\{ (u_1, u_2, f(u)) : \|\tilde{u}\|^2 + a \|\tilde{u}\|^3 \leq \frac{\delta^2}{4} \right\}$$

$a$  étant un réel positif fini. Un développement de Taylor de la racine de l'équation du 3<sup>ème</sup> degré en  $\|\tilde{u}\|$  donne

$$\begin{aligned} \mathcal{A}^\pm &= \left\{ (u_1, u_2, f(u)) : \|\tilde{u}\| \leq \frac{\delta}{2} + O(\delta^2) \right\} \\ &= \left\{ (u_1, u_2, f(u)) : \sqrt{(1 - \kappa_1 p)^2 u_1^2 + (1 - \kappa_2 p) u_2^2} \leq \frac{\delta}{2} + O(\delta^2) \right\} \end{aligned}$$

On doit ensuite intégrer la probabilité d'échantillonnage (constamment égale à 1) sur le domaine  $\mathcal{A}^\pm$ . Le jacobien de la paramétrisation étant aussi égal à 1, l'intégrale sur  $\mathcal{A}^\pm$  est simplement une aire d'ellipse. On obtient au final

$$\int_{\mathcal{A}^\pm} dm = \frac{\pi}{4} \frac{\delta^2}{(1 - \kappa_1 p)(1 - \kappa_2 p)} + O(\delta^3)$$

et donc

$$A = \int_{\mathcal{A}} dm = \frac{\pi}{4} \frac{\delta^2}{(1 - \kappa_1 p)(1 - \kappa_2 p)} + O(\delta^3) \quad (4.32)$$

#### 4.5.4.2 Domaine B

Le domaine défini par l'équation (4.30) peut être réécrit sous la forme :

$$\mathcal{B} = \left\{ m \in \mathbf{M} : \frac{\delta}{2} \leq d(x, \mathcal{N}(m)) \leq \frac{\delta}{2} \sqrt{f^2 + 1} \right\}$$

$$\mathcal{B} = \left\{ (u_1, u_2, f(u)) : \frac{\delta^2}{4} \leq (1 - \kappa_1 p)^2 u_1^2 + (1 - \kappa_2 p)^2 u_2^2 + O(\|u\|^3) \leq \frac{\delta^2}{4} (1 + f^2) \right\}$$

On utilise exactement la même technique que pour  $\mathcal{A}$  développée en section 4.5.4.1.  $\mathcal{B}$  est encadré par deux ensembles  $\mathcal{B}^+$  et  $\mathcal{B}^-$  définis par :

$$\mathcal{B}^\pm = \left\{ (u_1, u_2, f(u)) : \frac{\delta^2}{4} \leq \sqrt{(1 - \kappa_1 p)^2 u_1^2 + (1 - \kappa_2 p)^2 u_2^2} \leq \frac{\delta}{2} \sqrt{1 + f^2} + O(\delta^2) \right\}.$$

On veut intégrer la fonction suivante :

$$h(u, v) = \frac{2}{\pi} \arcsin \frac{\delta/2}{\sqrt{(1 - \kappa_1 p)^2 u_1^2 + (1 - \kappa_2 p)^2 u_2^2 + O(\|u\|^3)}}$$

On fait un changement de variable pour se ramener à une intégrale sur le disque unité, suivi d'un passage en coordonnées polaires. Comme le jacobien de la paramétrisation est égal à 1, on obtient :

$$\begin{aligned} B &= \frac{2/\pi}{(1 - \kappa_1 p)(1 - \kappa_2 p)} \int_0^{2\pi} \int_{\frac{\delta}{2}}^{\frac{\delta}{2} \sqrt{f^2+1} + O(\delta^2)} \arcsin \frac{\delta}{2\rho} \rho \, d\rho \, d\theta \\ &= \frac{\delta^2}{2\pi (1 - \kappa_1 p)(1 - \kappa_2 p)} \int_0^{2\pi} \int_1^{\sqrt{f^2+1} + O(\delta^2)} \arcsin \frac{1}{\rho} \rho \, d\rho \, d\theta. \end{aligned}$$

L'intégrale sur  $\theta$  se résume à multiplier par  $2\pi$ . La fonction

$$\rho \rightarrow \arcsin \frac{1}{\rho} \rho$$

admet pour primitive

$$\frac{1}{2} \left( \sqrt{\rho^2 - 1} + \rho^2 \arcsin \frac{1}{\rho} \right)$$

On obtient ainsi :

$$B = \frac{\delta^2}{2(1 - \kappa_1 p)(1 - \kappa_2 p)} \left( f + (1 + f^2) \arcsin \frac{1}{\sqrt{1 + f^2}} - \frac{\pi}{2} + O(\delta) \right)$$

La dernière expression a été obtenue par un développement à l'ordre 0 du terme entre parenthèse. On retient comme expression finale :

$$B = \frac{\delta^2}{2(1 - \kappa_1 p)(1 - \kappa_2 p)} \left( f + (f^2 + 1) \arcsin \frac{1}{\sqrt{1 + f^2}} - \frac{\pi}{2} \right) + O(\delta^3) \quad (4.33)$$

#### 4.5.4.3 Domaine C

Le domaine défini par l'équation (4.31) peut être réécrit sous la forme :

$$\mathcal{C} = \left\{ m \in \mathbf{M} : \frac{f\delta}{2} \leq d(x, \mathbf{N}(m)) \leq \frac{\delta}{2} \sqrt{f^2 + 1} \right\}$$

$$\mathcal{C} = \left\{ (u_1, u_2) : \frac{f\delta}{4} \leq (1 - \kappa_1 p)^2 u_1^2 + (1 - \kappa_2 p)^2 u_2^2 + O(\|u\|^3) \leq \frac{\delta^2}{4} (f^2 + 1) \right\}$$

La fonction à intégrer est cette fois un arccosinus, avec un terme en  $f\delta$  au numérateur au lieu de  $\delta$  :

$$h(u, v) = \frac{2}{\pi} \arccos \frac{f\delta/2}{\sqrt{(1 - \kappa_1 p)^2 u_1^2 + (1 - \kappa_2 p)^2 u_2^2 + O(\|u\|^3)}}$$

On fait les mêmes changements de variables que précédemment, et on obtient une intégrale en coordonnées polaires :

$$C = \frac{2/\pi}{(1 - \kappa_1 p)(1 - \kappa_2 p)} \int_0^{2\pi} \int_{\frac{f\delta}{2}}^{\frac{\delta}{2}\sqrt{f^2+1}+O(\delta^2)} \arccos \frac{f\delta}{2\rho} \rho d\rho d\theta$$

Cette expression admet aussi une primitive, qui se développe analytiquement pour donner :

$$C = \frac{\delta^2}{2(1 - \kappa_1 p)(1 - \kappa_2 p)} (1 + f^2) \arccos \frac{f}{\sqrt{1 + f^2}} - f + O(\delta^3) \quad (4.34)$$

#### 4.5.4.4 Intégration totale

L'intégrale globale s'obtient en sommant les 3 intégrales partielles  $A$ ,  $B$  et  $C$  :

$$\int_{\mathbf{M}} P[x \in \mathbf{T} \mid \mathbf{m} = m] dm = \frac{\delta^2}{2(1 - \kappa_1 p)(1 - \kappa_2 p)} \times \left( 2f + (1 + f^2) \left( \arcsin \frac{1}{\sqrt{f^2 + 1}} - \arccos \frac{f}{\sqrt{f^2 + 1}} \right) \right) + O(\delta^3)$$

Les arguments de l'arcsin et de l'arccos peuvent être interprétés comme les coordonnées cartésiennes d'un point sur le cercle unité (la somme de leurs carrés est égale à 1). L'arcsin est donc simplement égale à la coordonnée angulaire du point ainsi défini. De même, l'arccos est égal à cette même coordonnée angulaire. La différence de l'arcsin et de l'arccos s'annulent, ce qui donne finalement :

$$\int_{\mathbf{M}} P[x \in \mathbf{T} \mid \mathbf{m} = m] dm = \frac{f\delta^2}{(1 - \kappa_1 p)(1 - \kappa_2 p)} + O(\delta^3) \quad (4.35)$$

#### 4.5.5 Expression de la probabilité d'échantillonnage

La formule (4.9) exprime la probabilité d'échantillonnage d'un point à partir de l'intégrale (4.35) et de la densité surfacique des points d'acquisition. On obtient la probabilité d'échantillonnage d'un point  $x$  dans une structure 3D :

$$\mathbb{P}[x \in \mathbf{T} \mid \mathbf{M}] = \lambda(m_0(x)) \frac{f\delta^2}{(1 - \kappa_1 p)(1 - \kappa_2 p)} + O(\delta^3) \quad (4.36)$$

Dans le cas simplifié où la densité surfacique des points d'acquisition est constante,  $\lambda(m_0(x))$  est égal à  $1/S(\mathbf{M})$ , où  $S(\mathbf{M})$  est l'aire de la surface  $\mathbf{M}$ .

$$\mathbb{P}[x \in \mathbf{T} \mid \mathbf{M}] = \frac{1}{S(\mathbf{M})} \frac{f\delta^2}{(1 - \kappa_1 p)(1 - \kappa_2 p)} + O(\delta^3) \quad (4.37)$$

## 4.6 Vérification sur un exemple simple

Nous effectuons une vérification dans le cas d'une structure déterministe échantillonnée de manière simple. Nous considérons le cas où  $X$  est un ensemble délimité par deux sphères emboîtées et centrées en un même point (considéré comme l'origine). Pour  $M$ , on prend la sphère extérieure. L'exemple est un peu restrictif du fait qu'il n'existe pas deux courbures distinctes en un point sur la sphère. De plus, du fait de la symétrie de la sphère, on n'a pas de variation en fonction de l'orientation de la sonde d'échantillonnage. Mais, dès qu'on s'éloigne de ce cas, les choses se compliquent très rapidement.

Considérons un point  $x \in X$ . On veut calculer sa probabilité d'échantillonnage. On note  $\Omega$  la sphère de rayon  $r = \|x\|$ , centrée à l'origine. L'aire de  $\mathbf{T} \cap \Omega$  est évidemment constante. On la note  $s$ . On a alors :

$$\begin{aligned} s &= \mathbb{E}[S(\mathbf{T} \cap \Omega)] \\ &= \int_M \int_{\Omega} I_{T(m)}(\omega) d\omega dP(m), \end{aligned}$$

où  $T(m)$  désigne n'importe quelle sonde centrée en  $m$  (son orientation autour de la normale en  $m$  n'importe pas) et  $P$  désigne la loi de probabilité uniforme sur  $M$ . En inversant l'ordre d'intégration, on obtient :

$$\begin{aligned} s &= \int_{\Omega} \int_M I_{T(m)}(\omega) dP(m) d\omega \\ &= \int_{\Omega} \mathbb{P}[\omega \in T] d\omega. \end{aligned}$$

Il est évident que  $\mathbb{P}[\omega \in T] = \mathbb{P}[x \in T]$ . On en déduit donc l'égalité :

$$s = 4\pi^2 r^2 \mathbb{P}[x \in T]$$

Le calcul de la probabilité d'échantillonnage se ramène donc au calcul de :

$$\frac{s}{4\pi^2 r^2}$$

et donc à celui de  $s$  (aire de l'intersection d'une sphère de rayon  $r$  avec une sonde qui lui est normale). Comme on se place dans le cadre où  $\delta$  tend vers 0, on peut supposer que la sonde ne déborde pas de la sphère :

$$\frac{\delta\sqrt{1+f^2}}{2} \leq \rho$$

Ce calcul peut se faire analytiquement, et donne l'expression suivante pour  $s$  :

$$\frac{s}{r^2} = 2\pi \int_0^{\arcsin \frac{f\delta}{2r}} \sin \theta \, d\theta - 4 \int_{\arcsin \frac{\delta}{2r}}^{\arcsin \frac{\delta\sqrt{1+f^2}}{2r}} \arccos \frac{\delta}{2r \sin \theta} \sin \theta \, d\theta +$$

$$4 \int_{\arcsin \frac{f\delta}{2r}}^{\arcsin \frac{\delta\sqrt{1+f^2}}{2r}} \arcsin \frac{f\delta}{2r \sin \theta} \sin \theta \, d\theta$$

On peut comparer numériquement avec l'approximation donnée par l'équation (4.35), via une représentation graphique du rapport :

$$\frac{\frac{s}{4\pi^2 r^2} - \frac{f\delta^2}{4\pi^2 r^2}}{\frac{f\delta^2}{4\pi^2 r^2}}$$

Ce rapport se réécrit sous la forme :

$$\frac{s - f\delta^2}{f\delta^2}$$

Le résultat est illustré en figure 4.7. On voit que l'erreur d'approximation peut être grande si la taille de la sonde est de l'ordre de celle de la sphère  $\Omega$ . Mais l'approximation converge assez vite : si la sonde est deux fois plus petite que la sphère, l'erreur d'approximation n'est plus que d'environ 5 %. On a aussi des résultats convergents lorsque la sonde n'est pas carrée ( $f \neq 1$ ).

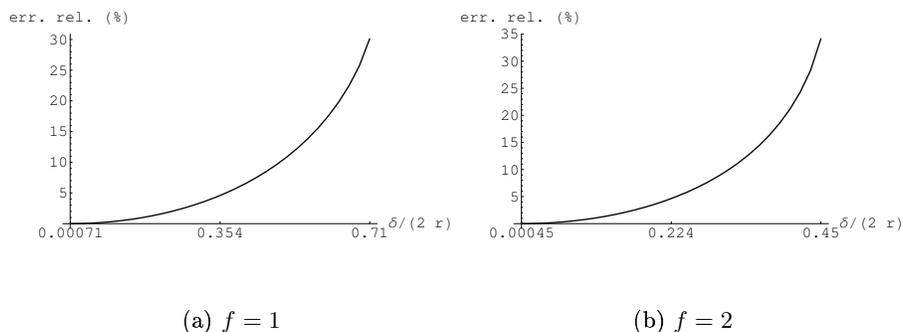


FIG. 4.7 – Évaluation numérique de l'approximation de la probabilité d'échantillonnage dans le cas particulier de la sphère. En abscisse, différentes valeurs de  $\delta/(2r)$ ,  $r$  étant fixé à 1. Le calcul exact est valide pour  $\delta/(2r) \leq \sqrt{2}/2$ . En ordonnée, l'erreur relative de l'approximation.

## 4.7 Cas d'une surface de révolution

Nous allons détailler ici le cas où la surface  $\mathbf{M}$  peut être représentée par une surface de révolution.

### 4.7.1 Courbe génératrice

Une surface de révolution est obtenue en faisant tourner une courbe génératrice plane autour d'un axe de révolution. On utilise pour la courbe génératrice la paramétrisation suivante :

$$t \rightarrow \begin{cases} \psi(t) \\ \phi(t) \end{cases}$$

où  $\psi(t)$  et  $\phi(t)$  sont les coordonnées de la courbe dans son plan de définition. L'axe de révolution est une droite qui appartient au même plan que la courbe. On suppose que les deux fonctions de paramétrisation sont deux fois continûment différentiables (voir la figure 4.8). Pour simplifier les calculs, on suppose que l'axe de révolution est confondu avec le premier axe du repère.

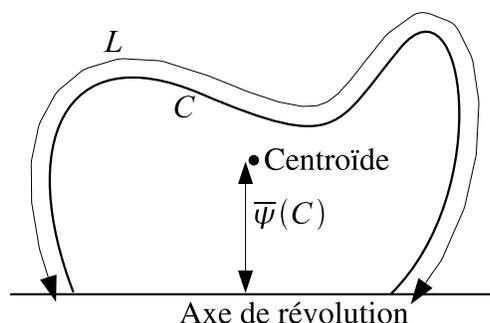


FIG. 4.8 – Courbe génératrice d'une surface de révolution. La courbe est paramétrée selon deux coordonnées. Le périmètre de la courbe est donné par  $L$ , et  $\bar{\psi}$  représente la distance du centroïde de la courbe  $C$  à l'axe de révolution.

La longueur de courbe se calcule en intégrant selon  $mt$  la longueur de l'élément de courbe de longueur géodésique  $dt$  :

$$L = \int \sqrt{\psi'^2(t) + \phi'^2(t)} dt$$

### 4.7.2 Paramétrisation de la surface

Une surface de révolution s'obtient en faisant tourner la courbe paramétrée  $(\psi(t), \phi(t))$  autour d'un axe (voir la figure 4.9 pour un exemple). Une représentation paramétrée standard d'une surface de révolution autour de l'axe  $(Ox)$  est la suivante :

$$\begin{aligned}x(t, u) &= \psi(t) \\y(t, u) &= \phi(t) \cos u \\z(t, u) &= \phi(t) \sin u\end{aligned}$$

Le paramètre  $u$  représente la 'longitude' sur la surface.

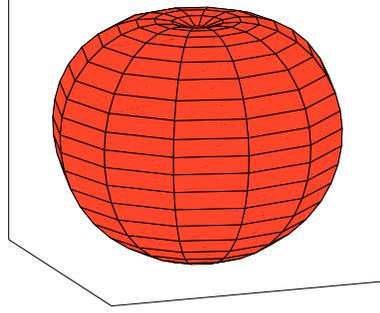


FIG. 4.9 – Surface de révolution obtenue à partir d'une courbe.

#### 4.7.3 Calcul des courbures

En connaissant les deux fonctions de paramétrisation du contour  $\psi(t)$  et  $\phi(t)$ , les relations de géométrie intégrale permettent d'exprimer les deux courbures principales en fonctions des dérivées premières et secondes de ces fonctions (Thorpe, 1979; Berger et Gostiaux, 1992) :

$$\kappa_1 = \frac{\text{sgn}(\phi) (\phi''\psi' - \phi'\psi'')}{(\phi'^2 + \psi'^2)^{3/2}} \quad (4.38)$$

$$\kappa_2 = \frac{\psi'}{|\phi| \sqrt{\phi'^2 + \psi'^2}} \quad (4.39)$$

#### 4.7.4 Probabilités d'échantillonnage

Le calcul des probabilités d'échantillonnage selon l'estimateur (4.36) fait intervenir les courbures locales, la profondeur du point et la densité surfacique des points d'acquisition  $\lambda(m)$ . Dans le cas d'un échantillonnage uniforme de la surface, cette densité est égale à :

$$\lambda_{\text{unif}}(m) = \frac{N}{S(\mathbf{M})}$$

où  $S(\mathbf{M})$  est la surface de  $\mathbf{M}$ . Cette surface peut être calculée à partir du modèle de surface de révolution. L'aire d'une surface de révolution est égale à la longueur  $L$  de la courbe génératrice, multipliée par  $2\pi\bar{\psi}$ , où  $\bar{\psi}$  est la distance entre l'axe de rotation et le barycentre de la courbe génératrice (voir la figure 4.8). On obtient donc :

$$S(\mathbf{M}) = 2\pi L\bar{\psi}$$

### 4.7.5 Densité surfacique des points d'acquisition

Distribuer uniformément des points sur une surface quelconque est un problème difficile. Pour une surface de révolution, une alternative est de distribuer les points uniformément en fonction de la distance géodésique, et de calculer la densité surfacique correspondante.

On peut montrer que pour une surface de révolution, la densité surfacique  $\lambda_{\text{surf}}$  ne varie qu'en fonction de la distance à l'axe de révolution :

$$\lambda_{\text{surf}}(m) = \frac{N}{2\pi y(m)L} \quad (4.40)$$

où  $N$  est le nombre de points d'acquisition,  $L$  la longueur géodésique totale de la courbe génératrice, et  $y(m)$  la distance d'un point  $m \in \mathbf{M}$ .

### 4.7.6 Surfaces équivalentes

Pour calculer les densités locales en fonction de la profondeur, les équations (3.24) à (3.27) nécessitent de connaître la surface de l'ensemble des points situé à une profondeur donnée  $p$ .

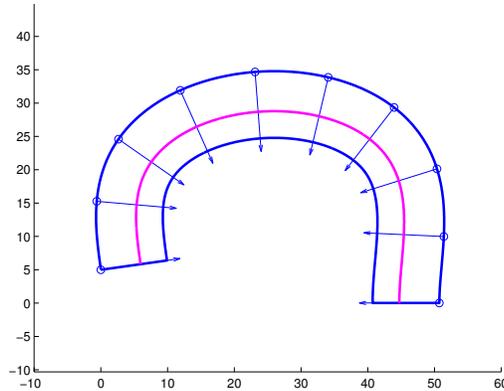


FIG. 4.10 – Surface des points à une profondeur  $p$ . Pour chaque point  $m$  du contour, on calcule le point situé sur la normale  $N(m)$  à la profondeur  $p$ . La surface de révolution permet de calculer la surface des points situés à une profondeur  $p$ .

Une méthode simple consiste à trouver, pour chaque point de la courbe génératrice, le point situé le long de la normale à une distance  $p$  vers l'intérieur du péricarpe. On obtient une suite de points, qui forment une courbe à une profondeur  $p$  (figure 4.10). Le calcul de l'aire de la surface de révolution engendrée par cette courbe permet de connaître  $\mathbb{E}[S_{\mathbf{Y}}(p)]$ .

## Conclusion

Ce chapitre a nous a permis de montrer que des caractéristiques géométriques peuvent être estimées dans des observations partielles, même si l'échantillonnage n'est pas effectué de manière uniforme. Nous avons développé le cas où la structure est échantillonnée

perpendiculairement à sa surface, ce qui convient particulièrement bien à des structures présentant une hétérogénéité en fonction de la profondeur. Nous avons détaillé le cas d'une surface de révolution, qui sera utilisée pour modéliser le péricarpe de tomate.

Il suffit de quelques conditions de régularité pour pouvoir utiliser cette méthode de correction. La première est que la surface de la structure à échantillonner soit suffisamment lisse pour pouvoir calculer la normale et les courbures principales en chaque point de la surface. La deuxième condition concerne la profondeur maximale des points à échantillonner : celle-ci doit être inférieure au plus petit rayon de courbure de la surface.

La forme finale de l'estimateur est assez simple, et fait intervenir uniquement des propriétés locales : la profondeur du point, la taille et la forme de la sonde, et les courbures principales.

# Chapitre 5

## Mesures dans des images discrètes

### Contenu

---

<b>5.1</b>	<b>Discrétisation de l'espace</b>	<b>69</b>
5.1.1	Grille discrète	69
5.1.2	Voisinages utilisés	70
5.1.3	Effets de bord	70
5.1.4	Reconstruction par complexe cellulaire	71
<b>5.2</b>	<b>Mesure du volume</b>	<b>72</b>
<b>5.3</b>	<b>Mesure de la caractéristique d'Euler-Poincaré</b>	<b>72</b>
<b>5.4</b>	<b>Surface et épaisseur moyenne</b>	<b>74</b>
5.4.1	Surface	74
5.4.2	Épaisseur moyenne	76
<b>5.5</b>	<b>Implémentation algorithmique</b>	<b>77</b>
5.5.1	Caractéristique d'Euler-Poincaré	77
5.5.2	Surface	79
5.5.3	Épaisseur moyenne	80
5.5.4	Synthèse des mesures 3D dans le cas global	81
<b>5.6</b>	<b>Rose des normales</b>	<b>81</b>
5.6.1	Direction associée à une configuration de pixels	81
5.6.2	Estimation de la rose des normales	82
5.6.3	Représentation par le zonoïde équivalent	83
5.6.4	Extension au cas 3D	83
<b>5.7</b>	<b>Exemple d'application sur le pain</b>	<b>85</b>
5.7.1	Évolution des densités de Minkowski	86
5.7.2	Analyse directionnelle 3D	87

---



## Introduction

L'objet de ce chapitre est de mesurer les paramètres  $V(X, \varphi)$ ,  $S(X, \varphi)$ ,  $\bar{b}(X, \varphi)$ ,  $\chi(X, \varphi)$  sous leur forme fonctionnelle dans des images discrètes. L'avantage de la forme fonctionnelle est sa généralité. Elle couvre le cadre global, en posant  $\varphi(x) = 1$ , et le cas local, en utilisant pour  $\varphi$  une fonction indicatrice  $\varphi(x) = I_B(x)$ . Pour un échantillonnage non uniforme, il suffit d'utiliser pour  $\varphi(x)$  une fonction dépendant de la probabilité d'échantillonnage de  $x$ . L'utilisation des estimateurs (4.1) à (4.4) sera alors immédiate.

Si la mesure discrète de ces paramètres dans un cadre global est bien établie (notamment par Serra (1982) ou Ohser et Mücklich (2000); Lang et al. (2001)), elles n'ont jamais été établies dans un cadre local. Pour simplifier les notations, nous nous plaçons ici dans le cas où la structure  $X$  est déterministe.

Nous verrons d'abord comment exprimer la mesure de  $\chi(X, \varphi)$  en utilisant une reconstruction sous la forme d'un complexe cellulaire de la structure. Nous détaillerons ensuite les mesures de surface et d'épaisseur moyenne dans le cas discret à partir d'une somme de mesures de la caractéristique d'Euler-Poincaré. On verra comment implémenter les différents estimateurs en parcourant les mailles de la grille de discrétisation.

Nous présenterons ensuite la discrétisation de la rose des normales, ainsi qu'un exemple d'application de ces mesures dans un cadre stationnaire, sur des observations de pâte à pain en cours de fermentation.

## 5.1 Discrétisation de l'espace

### 5.1.1 Grille discrète

Nous ne considérons plus la structure  $X$ , mais son intersection avec un réseau régulier de points. L'image produite sera un ensemble de points régulièrement espacés, appartenant ou non à l'intérieur de la structure (cf. figure 5.1). Nous passons donc d'une représentation continue, dans l'espace euclidien, à une représentation discrète.

On utilise généralement un réseau carré, pour les images planes, ou cubique pour les images 3D, pour des raisons techniques (c'est le format de données fourni par la plupart des appareils d'acquisition). Pour le calcul de la surface ou de l'épaisseur moyenne, nous aurons aussi besoin de considérer des grilles rectangulaires ou hexagonales. Enfin d'autres types de grilles ont été étudiées, basées par exemple sur les empilements possibles de sphères dans l'espace (Meyer, 1992; McAndrew et Osborne, 1997).

On définit la grille de discrétisation à partir d'une base  $\{u_1, u_2, u_3\}$  de  $\mathbb{R}^3$  de la manière suivante :

$$\mathbb{L}^3 = u_1\mathbb{Z} \times u_2\mathbb{Z} \times u_3\mathbb{Z}$$

On se restreint dans la suite aux grilles formées par des bases orthonormées de  $\mathbb{R}^3$  ( $u_1 = u_2 = u_3 = 1$ ). On appelle maille de  $\mathbb{L}^3$  tout ensemble formé par la somme de Minkowski des segments élémentaires de la grille :

$$[k_1; k_1 + 1[ \oplus [k_2; k_2 + 1[ \oplus [k_3; k_3 + 1[, \quad k_i \in \mathbb{Z}$$

On considère aussi les faces élémentaires formées par la somme de deux segments :

$$[k_i; k_i + 1[ \oplus [k_j; k_j + 1[, \quad k_i, k_j \in \mathbb{Z}, \quad i, j = 1, 2, 3$$

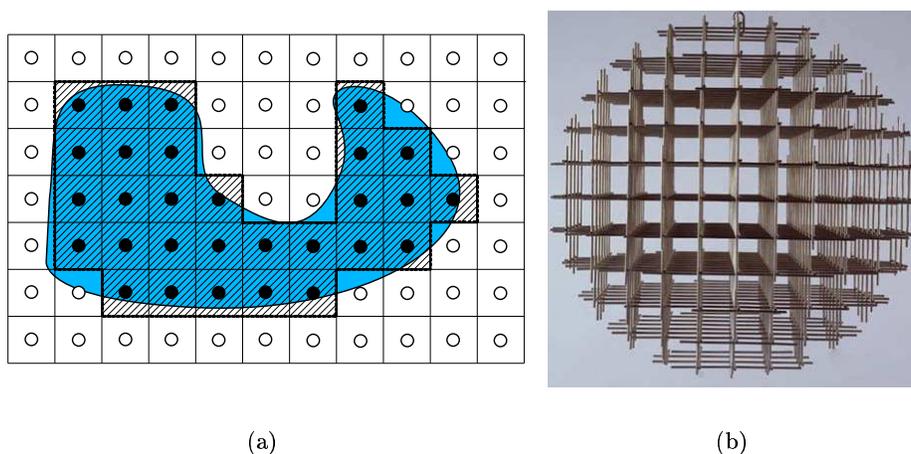


FIG. 5.1 – Exemples de discrétisations. (a) Discrétisation gaussienne d'un ensemble. On considère les points de  $\mathbb{L}^2$  qui appartiennent (points noirs) ou pas (points blancs) à la structure. (b) Représentation artistique d'une sphère discrète (F. Morellet ADAGP, Paris and DACS, London 2005). On a ici les sommets et les arêtes en suivant une grille cubique.

### 5.1.2 Voisinages utilisés

La discrétisation de l'espace nous permet de connaître la présence ou l'absence de la structure pour certaines positions (les points de la grille), mais entre ces points nous n'avons aucune information. On utilise donc une règle de voisinage, qui spécifie quels pixels de la grille sont voisins, et qui permet de reconstruire une approximation par complexe cellulaire de la structure.

Nous ne considérerons ici que les systèmes basés sur les 6 ou 26 plus proches voisins, qu'on appelle aussi connexités 6 et 26. Les 6 plus proches voisins correspondent aux pixels orthogonaux selon les directions isothétiques (parallèles aux directions principales de la grille). Pour une relation d'adjacence basée sur les 26 plus proches voisins, on considère en plus les pixels situés selon les diagonales des faces élémentaires, et selon les diagonales des mailles.

### 5.1.3 Effets de bord

Les images discrètes sont bornées. On n'observe pas la totalité de la grille  $\mathbb{L}^3$ , mais une fenêtre  $W$ , qui est un sous-ensemble en forme de pavé de  $\mathbb{L}^3$ . On appelle pixels les sommets de  $W$ . On distingue les pixels de  $\overset{\circ}{W}$ , l'intérieur de la fenêtre, comme étant ceux dont tous les voisins appartiennent à  $W$ . La frontière de  $W$  est définie par  $\partial W = W \setminus \overset{\circ}{W}$ .

Le fait que l'image soit bornée pose des problèmes pour les mesures des paramètres. En particulier, il n'est pas possible de mesurer précisément la contribution des pixels du bord de  $W$  à la surface, l'épaisseur moyenne ou la caractéristique d'Euler-Poincaré.

Il nous faut introduire une condition sur  $\varphi$  pour être capable de mesurer les paramètres  $S(\varphi)$ ,  $\bar{b}(\varphi)$  et  $\chi(\varphi)$ . Le support de la fonction de localisation est nul pour les pixels qui ne sont pas à l'intérieur de la fenêtre :

$$\forall x \in \mathbb{L}^3 \setminus \overset{\circ}{W}, \varphi(x) = 0$$

### 5.1.4 Reconstruction par complexe cellulaire

On utilise dans la suite une reconstruction de la structure par un ensemble  $\mathcal{C}$  (dit complexe) de cellules convexes élémentaires, de différentes dimensions, défini de la manière suivante :

- $\mathcal{C} = \bigcup_{k=0}^3 \mathcal{C}^k$  où  $\mathcal{C}^k$  est un ensemble de cellules de dimension  $k$
- les faces des cellules de dimension  $k$  appartiennent au complexe
- l'intersection de deux cellules de dimension  $k$  est soit vide, soit une cellule de dimension  $k - 1$ , qui est la face commune de ces cellules

Pour les images discrètes, on se restreint à des complexes cellulaires dont les cellules vérifient de plus les conditions suivantes :

- chaque cellule est incluse dans un cube élémentaire de  $W$
- les sommets de chaque cellule appartiennent à  $X$  et à  $W$

La discrétisation d'une structure en suivant la connexité 6 est la suivante. On considère pour  $\mathcal{C}^3$  l'ensemble des mailles de la fenêtre de discrétisation  $W$  dont tous les sommets appartiennent à la structure  $X$ . De même,  $\mathcal{C}^2$  est l'ensemble des carrés élémentaires de  $W$  dont les sommets appartiennent à  $X$ , et  $\mathcal{C}^1$  est l'ensemble des arêtes joignant deux points voisins de  $X \cap W$ . Enfin,  $\mathcal{C}^0$  est l'ensemble des points de  $W$  inclus dans  $X$ .

Pour la connexité 26, on considère individuellement pour chaque maille de  $W$ , l'enveloppe convexe des pixels de ce cube qui appartiennent à  $X$ . Cette enveloppe peut être un polyèdre, une face carrée ou triangulaire, une arête ou simplement un sommet.

Le complexe cellulaire obtenu en connexité 26 est l'ensemble de ces polytopes convexes, ainsi que de leurs faces de dimensions inférieures. L'ensemble des polyèdres convexes de chaque maille définit ainsi  $\mathcal{C}^3$ . L'ensemble  $\mathcal{C}^2$  est quant à lui composé des faces des polyèdres de  $\mathcal{C}^3$ , ainsi que des faces triangulaires ou carrées isolées.  $\mathcal{C}^1$  contient les arêtes des polytopes de  $\mathcal{C}^3$  et  $\mathcal{C}^2$ , mais peut aussi contenir des arêtes qui ne sont associées à aucune face ou polyèdre. Enfin l'ensemble  $\mathcal{C}^0$  est défini comme pour la connexité 6, et correspond à l'ensemble des points de  $W$  appartenant à  $X$ .

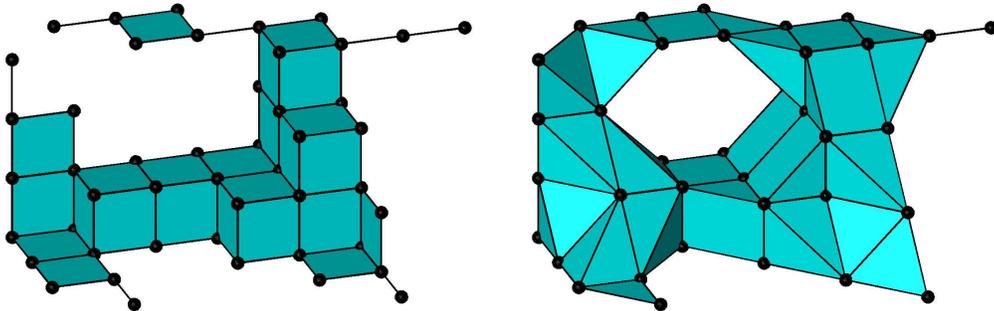


FIG. 5.2 – Reconstruction par des complexes cellulaires en utilisant les connexités 6 et 26.

Deux exemples de reconstruction basées sur les connexités 6 et 26 sont donnés dans la figure 5.2. Nous ne considérons ici que les discrétisations basées sur ces voisinages. Dans les travaux de Ohser et al. (2002), on trouve une méthode qui considère une classe plus grande de voisinage, ainsi qu'un formalisme plus détaillé pour créer les reconstructions par ensembles de polytopes convexes.

## 5.2 Mesure du volume

La mesure de volume ne pose pas de problème particulier dans des images discrètes. La définition du volume par intégration de la fonction indicatrice de  $X$  sur  $\mathbb{R}^3$  est remplacée par une somme sur les sommets de la grille de discrétisation :

$$V(X, \varphi) \simeq \sum_{x \in X \cap W} \varphi(x) \quad (5.1)$$

## 5.3 Mesure de la caractéristique d'Euler-Poincaré

La caractéristique d'Euler-Poincaré est non seulement l'une des caractéristiques principales pour décrire la géométrie d'une structure, mais nous verrons dans la section suivante qu'elle permet aussi d'exprimer la surface et l'épaisseur moyenne d'une structure. Il est donc nécessaire de pouvoir la mesurer précisément à partir d'images discrètes.

On définit  $\mathcal{C}(x)$  comme l'ensemble des cellules de  $\mathcal{C}$  dont  $x$  est un des sommets, et  $\mathcal{C}^r(x)$  l'ensemble des cellules de dimension  $r$  dont  $x$  est un sommet. Pour le calcul de la caractéristique d'Euler-Poincaré sous la forme fonctionnelle, on assimile la structure  $X$  à sa reconstruction sous la forme de complexe cellulaire :

$$\chi(X, \varphi) \simeq \chi(\mathcal{C}, \varphi) \quad (5.2)$$

et on calcule  $\chi(\mathcal{C}, \varphi)$  en sommant les courbures définies pour les tous les sommets du complexe cellulaire :

$$\chi(\mathcal{C}, \varphi) = \frac{1}{4\pi} \sum_{x \in \mathcal{C}^0} k(\mathcal{C}, x) \varphi(x) \quad (5.3)$$

La courbure gaussienne pour un point  $x$  est définie par Banchoff à partir de la somme alternée des angles normaux extérieurs  $\alpha(C, x)$  de toutes les cellules  $C$  contenant le point  $x$  (Banchoff, 1967) :

$$k(\mathcal{C}, x) = \sum_{r=0}^3 (-1)^r \sum_{C \in \mathcal{C}^r(x)} \alpha(C, x) \quad (5.4)$$

L'angle normal  $\alpha(C, x)$  se calcule facilement pour des ensembles convexes. Quelques exemples d'angles normaux calculés pour des cellules élémentaires sont donnés dans la figure 5.3.

La courbure gaussienne  $k(\mathcal{C}, x)$  est une extension additive de l'angle normal extérieur  $\alpha(C, x)$ . En particulier, si on considère deux complexes cellulaires  $\mathcal{C}$  et  $\mathcal{C}'$ , tels que l'union

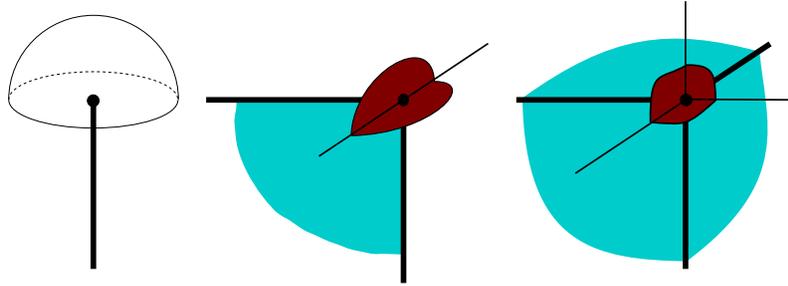


FIG. 5.3 – Angles normaux extérieurs de différentes cellules. L'angle du cône normal d'une extrémité d'arête est égal à  $2\pi$ , celui d'un coin de carré est de  $\pi$ , et l'angle normal d'un coin de cube est égal à  $\pi/2$ .

des cellules contenant un point est la même, alors (voir la figure 5.4) :

$$\bigcup_{C \in \mathcal{C}(x)} C = \bigcup_{C \in \mathcal{C}'(x)} C \Rightarrow k(\mathcal{C}, x) = k(\mathcal{C}', x)$$

On en déduit facilement que les sommets internes d'un complexe cellulaire ne contribuent pas à sa caractéristique d'Euler-Poincaré.

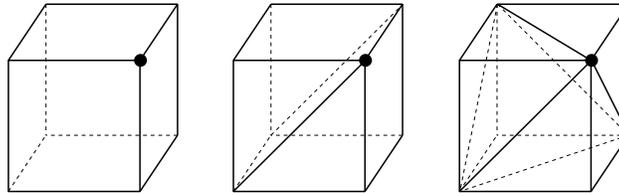


FIG. 5.4 – Indépendance de la division des complexes. L'angle normal du point marqué en noir est le même si la division cellulaire consiste en un cube (à gauche), en deux prismes à base triangulaire (au centre), ou en une division à base de tétraèdres (à droite).

On obtient une expression de la caractéristique d'Euler-Poincaré à partir des angles normaux des sommets mesurés sur chaque cellule du complexe :

$$\chi(\mathcal{C}, \varphi) = \frac{1}{4\pi} \sum_{x \in \mathcal{C}^0} \sum_{r=0}^3 (-1)^r \sum_{C \in \mathcal{C}^r(x)} \alpha(C, x) \varphi(x) \tag{5.5}$$

Dans particulier où  $\varphi = 1$  (caractéristique d'Euler-Poincaré globale), si on inverse l'ordre de sommation dans l'équation (5.5), en sommant d'abord sur la dimension  $r$ , puis sur les cellules, et enfin sur les sommets des cellules, on obtient :

$$\chi(\mathcal{C}) = \frac{1}{4\pi} \sum_{r=0}^3 (-1)^r \sum_{C \in \mathcal{C}^r} \sum_{x \in C^0} \alpha(C, x) \quad (5.6)$$

où  $C^0$  est défini comme l'ensemble des sommets de la cellule  $C$ . Comme les cellules du complexe sont convexes, la somme des angles normaux extérieurs sur tous les sommets d'une cellule  $C$  est toujours égale à  $4\pi$ . On obtient ainsi :

$$\chi(X) \simeq \sum_{r=0}^3 (-1)^r \#\mathcal{C}^r \quad (5.7)$$

où  $\#\mathcal{C}^r$  désigne le nombre de cellules de dimension  $r$ . On retombe ainsi sur l'extension tridimensionnelle de la formule d'Euler déjà proposée par Serra (1982) pour des images discrètes 2D. La convergence de l'approximation (5.7) lorsque le pas de discrétisation tend vers 0 a été établie sous certaines conditions dans le cas 2D (Serra, 1982). Ces résultats de convergence ont été étendus au 3D et pour différents types de voisinages (Nagel et al., 2000; Ohser et Nagel, 1996; Rataj, 2004).

## 5.4 Surface et épaisseur moyenne

La mesure de la caractéristique d'Euler-Poincaré nécessite de passer par une reconstruction polyédrale. Il est tentant de mesurer la surface des facettes de cette reconstruction pour estimer la surface de la structure. En fait, le biais engendré par cette méthode est très important. On considère par exemple une sphère de rayon  $R$  et sa reconstruction cubique : chaque point d'une grille cubique est associé à un cube si ce point appartient à la sphère. On vérifie facilement que la surface de la reconstruction est approchée par 6 fois l'aire d'un disque de rayon  $R$ . On observe ainsi un écart entre la valeur mesurée et la valeur réelle qui est de

$$\Delta S = \frac{6\pi R^2 - 4\pi R^2}{4\pi R^2} = 50\%$$

L'écart est moins important avec une reconstruction basée sur les 26 plus proches voisins, mais le biais reste constant, même lorsque la résolution de la grille augmente.

Pour mesurer la surface et l'épaisseur moyenne, on préfère donc utiliser la formule de Crofton, qui donne des résultats plus précis. Cette approche est donnée dans le cas simplifié où  $\varphi(\cdot) = 1$  dans les ouvrages de Serra (1982) ou plus récemment dans les travaux de Lang et al. (2001) et Ohser et Mücklich (2000).

### 5.4.1 Surface

Nous utilisons l'équation (3.12), qui exprime la surface sous sa forme fonctionnelle à partir d'un comptage d'intercepts sur des droites :

$$S(\varphi) = 4 \int_{\mathcal{L}} \chi(X \cap L, \varphi) dL$$

L'intégrale sur les droites de l'espace  $\mathcal{L}$  se décompose en une intégrale sur  $\Omega_2$ , l'ensemble des directions de l'espace, et une intégrale sur toute les droites parallèles à cette direction. En notant  $P_\omega(o)$  le plan de normale  $\omega$  passant par l'origine  $o$ , et  $L_\omega(x)$  la droite de direction  $\omega$  passant par  $x$ , cette intégrale s'exprime comme :

$$S(\varphi) = 4 \int_{\Omega_2} \int_{P_\omega(o)} \chi(X \cap L_\omega(x), \varphi) dx d\omega \quad (5.8)$$

Une fois la direction fixée, l'intégrale sur les droites parallèles se transforme facilement en somme sur les droites discrètes de l'image. Par contre la discrétisation des directions de l'espace n'est pas aussi simple.

Une première solution consiste à choisir les 3 directions orthogonales aux axes principaux de l'image. Elle a l'avantage de donner le même poids  $c_i = \frac{1}{3}$  aux différentes directions, mais est relativement pauvre en précision directionnelle. On remplace alors l'intégrale précédente par une moyenne sur les 3 directions principales :

$$S_3(\varphi) = \frac{4}{3} \sum_{i=1}^3 \sum_{x \in P_{\omega_i}(o) \cap \mathbb{L}^3} \chi(X \cap L_{\omega_i}(x), \varphi) \quad (5.9)$$

Une deuxième solution considère les directions de tous les couples de pixels dans le cube unité. Un pixel dans une grille cubique ayant 26 voisins, on arrive ainsi à 13 directions non orientées. On note  $\omega_i$  ces directions.

Cependant, ces directions ne sont pas également distribuées à la surface de la sphère. Il faut donc accorder une pondération différente à chaque direction. Ohser et Mücklich (Ohser et Mücklich, 2000) ont choisi d'attribuer à chaque direction la fraction de surface occupée par une cellule de Voronoï sphérique, lorsque les germes sont les directions projetées sur la sphère (voir la figure 5.5).

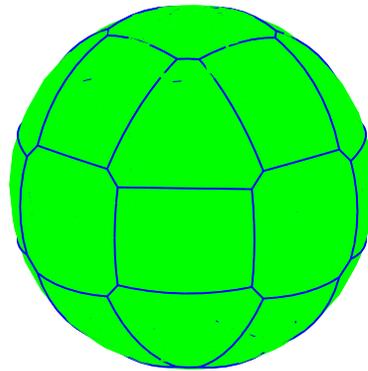


FIG. 5.5 – Découpage de la sphère unité en 26 secteurs correspondants aux directions du cube unité

Notons  $\omega_1, \omega_2$  et  $\omega_3$  les 3 directions principales,  $\omega_4, \dots, \omega_9$  les 6 diagonales des carrés parallèles aux faces des mailles, et  $\omega_{10}, \dots, \omega_{13}$  les 4 directions diagonales joignant les sommets opposés d'une maille. Les fractions de surface de la sphère associées aux 13 directions sont  $c_1 = c_2 = c_3 = 2 \times 0.04577789$ ,  $c_4 = \dots = c_9 = 2 \times 0.03698062$ , et  $c_{10} = \dots = c_{13} = 2 \times 0.03519563$ .

De plus, la densité des lignes dépend de la direction choisie. Elle est de  $\lambda_i = 1$  pour les 3 directions isothétiques,  $\lambda_i = \sqrt{2}$  pour les 6 directions parallèles aux diagonales des carrés unité, et  $\lambda_i = \sqrt{3}$  pour les 4 directions parallèles aux diagonales du cube unité. On obtient ainsi une expression de la surface en fonction des mesures pondérées des  $\chi(\varphi)$  :

$$S_{13}(\varphi) = 4 \sum_{i=1}^{13} \frac{c_i}{\lambda_i} \sum_{x \in P_{\omega_i}(o) \cap \mathbb{L}^3} \chi(X \cap L_{\omega_i}(x), \varphi) \quad (5.10)$$

La mesure de la surface par  $S_{13}$  discrétise mieux les directions de l'espace, elle est donc *a priori* plus précise. Mais les deux méthodes reposent sur des mesures de  $\chi$ . Or, la résolution sur les lignes diagonales est plus faible que pour les 3 directions principales. Si la résolution de l'image est assez faible, on risque une sous-évaluation de la caractéristique d'Euler-Poincaré, et donc de la surface. Dans ce cas il est alors préférable d'utiliser la version  $S_3$ .

#### 5.4.2 Épaisseur moyenne

Pour le calcul de l'épaisseur moyenne, on utilise là aussi la formule de Crofton, mais en intégrant la caractéristique pondérée d'Euler-Poincaré sur tous les plans de l'espace. Cette intégrale se décompose en une intégrale sur les directions, et une intégrale sur tous les plans perpendiculaires à une direction donnée. Ainsi, en reprenant les notations du calcul de surface appliquée à l'équation (3.13) on a :

$$\bar{b}(\varphi) = \int_{\Omega_2} \int_{\mathcal{L}_\omega(o)} \chi(X \cap P_\omega(x), \varphi) dx d\omega \quad (5.11)$$

Pour la discrétisation des directions, nous avons les mêmes choix que pour la surface. La première possibilité est de n'utiliser que les plans orthogonaux à l'une des trois directions principales. Cela revient à moyenner  $\chi(\varphi)$  sur ces 3 directions :

$$\bar{b}_3(\varphi) = \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 \sum_{x \in \mathcal{L}_{\omega_i}(o) \cap \mathbb{L}^3} \chi(X \cap P_{\omega_i}(x), \varphi) \quad (5.12)$$

Si l'on cherche à utiliser les 13 directions du cube unité, cela devient plus compliqué. Les plans discrets peuvent être de 3 types : parallèles à une des faces du cube unité, parallèles à une seule direction du repère (le plan coupe l'image en diagonale), et perpendiculaires à la diagonale du cube unité. On doit de plus gérer des grilles discrètes qui ne sont plus carrées, mais rectangulaires, voire triangulaires pour les plans orthogonaux aux directions diagonales (voir la figure 5.6). On a :

$$\bar{b}_{13}(\varphi) = \sum_{i=1}^{13} c_i \delta_i \sum_{x \in \mathcal{L}_{\omega_i}(o) \cap \mathbb{L}^3} \chi(X \cap P_{\omega_i}(x), \varphi) \quad (5.13)$$

avec les  $c_i$  définis pour calculer la surface, et les  $\delta_i$  qui correspondent à la distance minimum entre deux plans de normale  $\omega_i$ . On  $\delta_i = 1$  pour les trois directions principales,  $\delta_i = \frac{\sqrt{2}}{2}$  pour les directions parallèles aux diagonales des carrés, et  $\delta_i = \frac{\sqrt{3}}{3}$  pour les directions parallèles aux diagonales du cube unité.

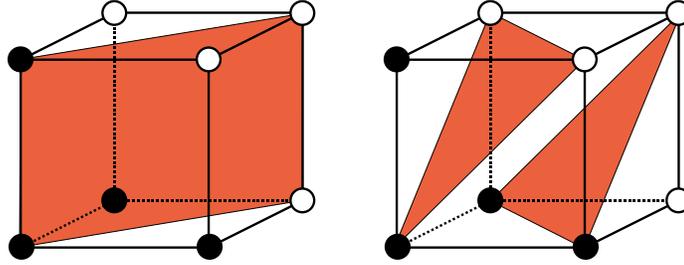


FIG. 5.6 – Configurations diagonales dans un cube

On obtient ainsi une expression de l'épaisseur moyenne à partir de caractéristiques d'Euler-Poincaré mesurées sur des plans de l'image.

## 5.5 Implémentation algorithmique

### 5.5.1 Caractéristique d'Euler-Poincaré

Il est possible de calculer  $\chi(\mathcal{C}, \varphi)$  telle qu'elle est définie par les équations (5.3) et (5.4), en itérant sur chaque sommet de la reconstruction, et en sommant les courbures discrètes de chaque sommet. La courbure discrète dépend des 26 voisins du sommet, ce qui implique de considérer chaque sommet 27 fois.

Une approche plus judicieuse est d'utiliser une formulation de  $\chi(\mathcal{C}, \varphi)$  du type de celle fournie par l'équation (5.6), mais étendue à des fonctions  $\varphi$  non constantes. Cette généralisation s'écrit :

$$\chi(\mathcal{C}, \varphi) = \frac{1}{4\pi} \sum_{C \in \mathcal{C}} (-1)^{\dim C} \sum_{x \in C^0} \alpha(C, x) \varphi(x) \quad (5.14)$$

La caractéristique  $\chi(\mathcal{C}, \varphi)$  peut donc se calculer en parcourant les cellules de la reconstruction et les sommets de chaque cellule. Cela permet de parcourir les mailles de l'image, et de sommer pour chaque maille la courbure partielle des pixels qu'elle contient. Chaque pixel ne sera ainsi visité que 8 fois.

Une maille ne coupe jamais une cellule en deux. Par contre, une cellule peut appartenir à plusieurs mailles. Pour toute maille  $y$ , on note  $\mathcal{C}(y)$  l'ensemble des cellules  $C$  dont les sommets appartiennent à  $y$ . Pour toute cellule  $C \in \mathcal{C}$  on note  $m(C)$  la multiplicité de  $C$ , définie comme le nombre de cellules auxquelles elle appartient. On peut alors réécrire la

caractéristique d'Euler-Poincaré en sommant des contributions de chaque maille de la grille :

$$\chi(\mathcal{C}, \varphi) = \frac{1}{4\pi} \sum_y \sum_{C \in \mathcal{C}(y)} \frac{(-1)^{\dim C}}{m(C)} \sum_{x \in C^0 \cap \overset{\circ}{W}} \alpha(C, x) \varphi(x)$$

Dans le cas où la fonction  $\varphi$  varie lentement à l'intérieur de son support, on peut faire l'approximation :

$$\varphi(x) \simeq \varphi(\bar{y})$$

pour tout  $x \in y \cap \overset{\circ}{W}$ , où  $\bar{y}$  est le barycentre des sommets de la maille  $y$ . On a alors :

$$\chi(\mathcal{C}, \varphi) = \frac{1}{4\pi} \sum_y d_\chi(y) \varphi(\bar{y}) \quad (5.15)$$

où :

$$d_\chi(y) = \sum_{C \in \mathcal{C}(y)} \frac{(-1)^{\dim C}}{m(C)} \sum_{x \in C^0 \cap \overset{\circ}{W}} \alpha(C, x) \quad (5.16)$$

On peut caractériser de manière unique (à une translation près)  $y \cap X$  en associant à  $y$  l'étiquette  $g(y)$  définie par

$$g(y) = \sum_{i=0}^7 2^i I_X(x_i)$$

où  $x_i$  est le pixel numéroté comme indiqué sur la figure 5.7.

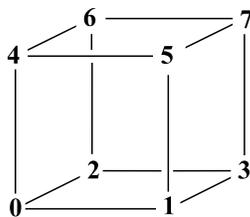


FIG. 5.7 – Numérotation des pixels d'une maille 3D. Cela correspond à une numérotation pour  $u_1$  croissant,  $u_2$  croissant, et  $u_3$  croissant, dans cet ordre.

Si  $y \in \overset{\circ}{W}$  (maille interne), la seconde somme dans la formule (5.16) porte sur tous les sommets de  $C^0$  sans restriction. Il est alors facile de vérifier que la contribution  $d_\chi(y)$  de la maille  $y$  ne dépend que de son étiquette  $g(y)$ . En effet,  $g(y)$  détermine à une translation près  $y \cap X$  et donc  $\mathcal{C}(y)$ . De plus, la dimension, la multiplicité et les angles normaux sont invariants par translation.

Pour calculer la contribution des mailles internes à  $\overset{\circ}{W}$ , on peut donc précalculer les  $d_\chi$  pour les 256 valeurs possibles des étiquettes, et le calcul de  $d_\chi(y)$  se ramène au calcul de  $g(y)$ .

Reste à traiter le cas des mailles dont au moins un des sommets est au bord de la fenêtre. Cet ensemble de mailles peut être partitionné comme montré sur la figure 5.8. À l'intérieur d'une région, la contribution  $d_\chi(y)$  est entièrement déterminée par son étiquette  $g(y)$ .

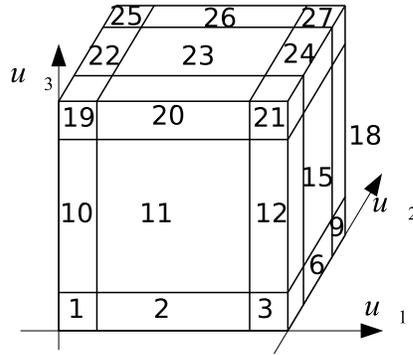


FIG. 5.8 – Numérotation des configurations en fonction de leur position dans l'image. L'étiquette 1 correspond au coin inférieur gauche avant, l'étiquette 2 à une maille sur l'arête inférieure avant... jusqu'à l'étiquette 27, qui correspond au pixel du coin supérieur droit vers l'arrière. La position centrale, qui ne touche aucun bord, correspond à l'étiquette 14.

### 5.5.2 Surface

Pour le calcul de la surface, on utilise la discrétisation de la formule locale de Crofton donnée par les équations (5.9) et (5.10). On considère les pixels appartenant à la structure qui sont situés sur une droite  $L_{\omega_i}(x)$  d'orientation  $\omega_i$  et passant par un point  $x$  de  $\mathbb{L}^3$ . Pour chaque droite  $L_{\omega_i}(x)$  on obtient une reconstruction à base d'arêtes et de sommets. L'union de toutes les reconstructions pour une direction  $\omega_i$  est notée  $\mathcal{C}_i$ . On note de plus  $\mathcal{C} = \{\mathcal{C}_i\}$  l'ensemble des reconstructions pour les 3 ou 13 directions discrètes.

On introduit ensuite dans les équations (5.9) ou (5.10) la mesure de la caractéristique d'Euler-Poincaré faite sur les  $\mathcal{C}_i$  d'après la formule (5.14) :

$$S(X, \varphi) \simeq 4 \sum_i \frac{c_i}{\lambda_i} \sum_{y \in P_{\omega_i}(o)} \frac{1}{4\pi} \sum_{C \in \mathcal{C}_i} (-1)^{\dim C} \sum_{x \in C^0} \alpha(C, x) \varphi(x)$$

Comme pour la caractéristique d'Euler-Poincaré, la somme ci-dessus peut se réécrire comme une somme sur les mailles  $y$  :

$$S(X, \varphi) \simeq \frac{1}{\pi} \sum_y \sum_i \frac{c_i}{\lambda_i} \sum_{C \in \mathcal{C}(y)} \frac{(-1)^{\dim C}}{m(C)} \sum_{x \in C^0 \cap \dot{W}} \alpha(C, x) \varphi(x)$$

De la même manière que pour la caractéristique d'Euler-Poincaré, certaines cellules seront comptées plusieurs fois, et doivent être pondérées en conséquence. En utilisant les trois directions principales, chaque arête est comptée dans 4 mailles, et a donc une pondération de  $\frac{1}{4}$ . Si on raisonne sur 13 directions, les diagonales des carrés orthogonaux sont communes à 2 mailles, et sont pondérées par  $\frac{1}{2}$ . Enfin, les 4 configurations diagonales ne sont comptées que dans une maille, et n'ont pas de pondération autre que celle des densités de droite.

Dans le cas où la fonction  $\varphi$  varie lentement à l'intérieur de son support, on peut encore approcher  $\varphi(x)$  par  $\varphi(\bar{y})$  pour  $x \in \dot{W}$  :

$$S(X, \varphi) \simeq \sum_y d_S(y) \varphi(\bar{y}) \quad (5.17)$$

avec :

$$d_S(y) = \frac{1}{\pi} \sum_i \frac{c_i}{\lambda_i} \sum_{C \in \mathcal{C}(y)} \frac{(-1)^{\dim C}}{m(C)} \sum_{x \in C^0 \cap \dot{W}} \alpha(C, x) \quad (5.18)$$

En pratique, on peut précalculer les valeurs de  $d_S(y)$ , qui dépendent à la fois de la configuration des pixels de la maille et de la position de la maille par rapport aux bords de l'image. Dans le cas d'une maille au centre de l'image (pas d'effet de bord), ou si on a  $\varphi = 1$ , on obtient les contributions qui sont listées dans le tableau 5.1.

### 5.5.3 Épaisseur moyenne

La discrétisation de l'épaisseur moyenne en utilisant la formule (5.11) fait intervenir une mesure de la caractéristique d'Euler-Poincaré sur  $X \cap P_\omega(y)$ , où  $P_\omega(y)$  est un plan discret de normale  $\omega_i$  et passant par un point  $y$ .

En utilisant 3 directions, les plans sont parallèles aux faces des cubes élémentaires de la grille. On associe à  $X \cap \mathbb{L}^3 \cap P$  un complexe cellulaire composé de faces carrées et d'arêtes isothétiques. Pour 13 directions, les plans discrets peuvent être de 3 types : parallèles à une des faces du cube unité, parallèles à une seule direction du repère (le plan coupe l'image en diagonale), et perpendiculaires à une des diagonales du cube unité. On utilise selon les cas soit une reconstruction à base de faces carrées (ou rectangulaires) et triangulaires, soit une reconstruction basée uniquement sur des faces triangulaires.

On associe à chaque direction  $\omega_i$  la reconstruction  $\mathcal{C}_i$  constituée par l'union des reconstructions sur tous les plans discrets de normale  $\omega_i$  contenant un point de  $\mathbb{L}^3$ . L'ensemble  $\{\mathcal{C}_i\}$  de toutes ces reconstructions est noté  $\mathcal{C}$ . On introduit ensuite dans l'équation (5.11) la caractéristique d'Euler-Poincaré mesurée sur chaque reconstruction  $\mathcal{C}_i$ , en utilisant un voisinage adéquat (6 plus proches voisins pour les grilles hexagonales, 4 ou 8 plus proches voisins pour les grilles carrées ou rectangulaires) :

$$\bar{b}(X, \varphi) = \sum_i c_i \delta_i \sum_{x \in \mathcal{L}_{\omega_i}(o) \cap \dot{W}} \frac{1}{4\pi} \sum_{C \in \mathcal{C}_i} (-1)^{\dim C} \sum_{x \in C^0} \alpha(C, x) \varphi(x) \quad (5.19)$$

Un développement similaire au cas de la surface permet d'obtenir une somme sur les mailles de l'image :

$$\bar{b}(X, \varphi) = \sum_y \sum_i c_i \delta_i \frac{1}{4\pi} \sum_{C \in \mathcal{C}(y)} \frac{(-1)^{\dim C}}{m(C)} \sum_{x \in C^0 \cap \dot{W}} \alpha(C, x) \varphi(x_i) \quad (5.20)$$

La multiplicité des arêtes ( $\dim C = 1$ ) est la même que précédemment. La multiplicité des facettes ( $\dim C = 2$ ) peut être de 1 (face à l'intérieur d'une maille) ou de 2 (face à l'intersection de deux mailles).

Toujours avec l'hypothèse que la fonction de localisation varie lentement sur  $\dot{W}$ , l'équation précédente peut se réécrire en isolant la contribution  $d_{\bar{b}}(y)$  de chaque maille à l'épaisseur moyenne :

$$\bar{b}(X, \varphi) = \sum_y d_{\bar{b}}(y) \varphi(\bar{y}) \quad (5.21)$$

avec :

$$d_{\bar{b}}(y) = \sum_i c_i \delta_i \frac{1}{4\pi} \sum_{C \in \mathcal{C}(y)} \frac{(-1)^{\dim C}}{m(C)} \sum_{x \in C^0 \cap \dot{W}} \alpha(C, x) \quad (5.22)$$

### 5.5.4 Synthèse des mesures 3D dans le cas global

Dans le cas global, lorsque  $\varphi = 1$  pour tout  $x$ , on peut simplifier les calculs et utiliser les symétries et rotations pour grouper les configurations en différents types. Toutes les configurations d'un même type vont donner la même contributions aux paramètres recherchés. Les tableaux 5.1 et 5.2 donnent une synthèse des différentes contributions de chaque type.

## 5.6 Rose des normales

Nous allons détailler dans cette section la discrétisation de la rose des normales d'un ensemble. Elle permet de caractériser l'anisotropie d'un ensemble, tout en ne nécessitant que des mesures locales. Son avantage principal par rapport à une mesure comme les longueurs moyennes d'intercepts est que son interprétation est beaucoup plus directe. Il s'agit principalement des travaux de Jensen et Kiderlen (Jensen et Kiderlen, 2003; Kiderlen et Jensen, 2003), que nous avons implémentés, testés sur des images synthétiques et appliqués à nos images, en 2 et 3 dimensions.

### 5.6.1 Direction associée à une configuration de pixels

La méthode proposée par Kiderlen et Jensen permet d'associer à une configuration de pixels la direction la plus probable de la normale. Elle ne s'applique pas à toutes les configurations possibles de pixels, mais seulement à celles qui sont susceptibles d'appartenir à la frontière de la structure. On ne considère donc pas les configurations où tous les pixels appartiennent soit à la structure, soit à son complémentaire.

Une condition suffisante pour déterminer si une configuration donnée peut représenter la frontière d'un ensemble discrétisé est de pouvoir tracer une droite qui sépare totalement les pixels de la structure, et les pixels du fond. La figure 5.9 présente différentes configurations de  $3 \times 3$  pixels, dont certaines sont informatives.

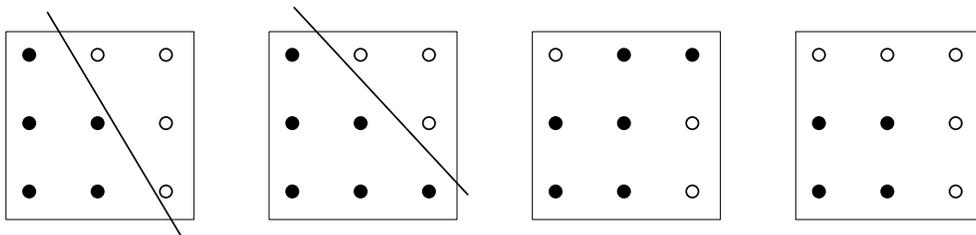


FIG. 5.9 – Exemples de configurations  $3 \times 3$  pixels. Les deux premières configurations sont informatives, car on peut séparer entièrement les deux ensembles. La troisième n'est pas informative, car aucune droite ne peut séparer les deux ensembles de pixels. La dernière configuration n'est pas considérée comme informative, car la largeur de la bande séparant les pixels est nulle.

Étant donné une configuration informative de pixels, on cherche à connaître la direction qui a le plus de chance de correspondre à la direction de la normale locale de l'ensemble

discrétisé. Pour chaque direction, on cherche quelle est la largeur de la bande, orthogonale à la direction considérée, qui sépare les deux ensembles tout en les touchant (voir la figure 5.10-a). La largeur de cette bande dépend de la direction. La direction pour laquelle cette valeur est maximum correspond à l'angle le plus probable pour la normale de l'ensemble.

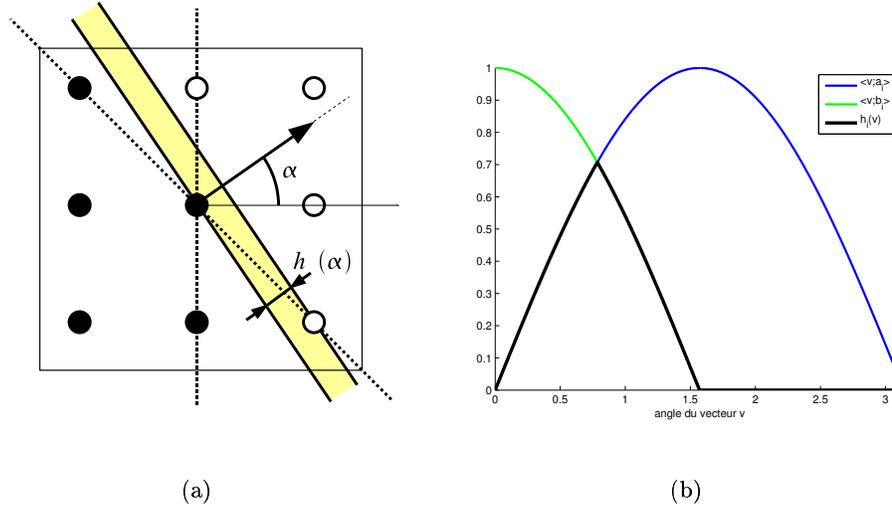


FIG. 5.10 – Calcul de la direction la plus probable. Pour une direction donnée, on calcule la largeur de la bande séparant les deux ensembles. Cette largeur peut se calculer analytiquement, à partir du produit scalaire du vecteur de direction avec 2 vecteurs  $a_i$  et  $b_i$  dépendant de la configuration.

Kiderlen et Jensen ont en fait montré que pour chaque configuration  $2 \times 2$  et  $3 \times 3$ , on peut exprimer la largeur de la bande pour une direction donnée en fonction de 2 vecteurs  $a_i$  et  $b_i$ , spécifiques à la configuration :

$$h_i(v) = \min \{ \langle a_i, v \rangle^+, \langle b_i, v \rangle^+ \}$$

où  $\langle a_i, v \rangle$  est le produit scalaire de deux vecteurs,  $x^+ = \max(x, 0)$ , et  $v$  est le vecteur de direction, normal à la bande de séparation. Les vecteurs  $a_i$  et  $b_i$  associés à chaque configuration sont donnés dans Jensen et Kiderlen (2003). Cela permet de calculer analytiquement le vecteur  $v_i$  associé à chaque configuration (voir la figure 5.10-b). On note ensuite  $h_i$  la quantité  $h_i(v_i)$ .

Les différentes configurations informatives peuvent ensuite être regroupées en classe lorsqu'elles ont en commun le même angle associé (tableaux 1 et 2 de Jensen et Kiderlen (2003)). Toutes les classes ne rassemblent pas le même nombre de configurations.

### 5.6.2 Estimation de la rose des normales

On peut chercher à estimer la rose des normales  $\mathcal{L}$  lorsque celle-ci est paramétrée par un ensemble fini. On note  $\mathcal{L}_\theta$  la rose des normales paramétrée par  $\theta = (\theta_1, \dots, \theta_n)$ , où chaque  $\theta_i$  correspond à une direction de la grille discrète  $2 \times 2$  ou  $3 \times 3$ . Pour une résolution de grille

$t$  suffisamment petite, Kiderlen et Jensen (2003) ont montré que la probabilité d'observer une configuration de type  $i$  était :

$$p_i(\theta) = t m_i I_i(\theta)$$

où  $m_i$  est le nombre de configurations appartenant à la classe  $i$ , et  $I_i(\theta)$  est donné par :

$$I_i(\theta) = h_i \theta_i$$

La paramétrisation  $\theta$  peut ensuite être estimée à partir des fréquences d'observation de chaque classe de configuration :  $p_i = n_i/n_{\text{total}}$ , où  $n_i$  est le nombre de configurations de classe  $i$  observé, et  $n_{\text{total}}$  est le nombre total de mailles observé, y compris les mailles non informatives. On estime la fréquence des configurations non informatives par  $p_0 = 1 - \sum_i p_i$ . Jensen et Kiderlen (2003) recommandent d'estimer  $\theta$  par une procédure de maximisation de la fonction  $\sum_i \theta_i \cos v_i = 0$ , en incorporant des contraintes de centrage de la paramétrisation.

Nous avons utilisé l'estimation suivante donnée par Gutkowski et al. (2004), plus simple :

$$\hat{\theta}_i = \frac{n_i}{t m_i h_i n_{\text{total}}}$$

Cet estimateur est valide lorsque les intégrales  $I_i(\theta)$  ne se recouvrent pas. Cette condition est vérifiée pour des configurations  $2 \times 2$ .

### 5.6.3 Représentation par le zonoïde équivalent

Différentes représentations sont possibles pour les roses de directions planaires. La plus naturelle est de représenter un histogramme en coordonnées polaires, où la longueur de chaque barre représente la mesure directionnelle dans cette direction. Une autre possibilité est de représenter chaque mesure par un secteur angulaire, dont l'aire est proportionnelle à la mesure directionnelle. Cette représentation permet de mieux appréhender les cas où la mesure n'est pas répartie uniformément sur le cercle unité.

L'approche par histogramme n'est pas toujours très facile à interpréter. Une possibilité est donc de représenter la mesure par un ensemble convexe, appelé corps de Blaschke, ou zonoïde équivalent, qui présente la même mesure directionnelle que l'ensemble à caractériser. Le zonoïde équivalent représente l'anisotropie de la frontière de la structure. La figure 5.11 montre la reconstruction du zonoïde équivalent pour des formes convexes simples. On constate qu'avec des informations très localisées (ici ce sont des configurations de  $3 \times 3$  pixels), on représente très bien la mesure directionnelle de la structure d'origine.

La densité de la mesure directionnelle permet de décrire l'anisotropie de structure stationnaire. La figure 5.12 présente une application sur une image d'origine biologique (coupe de feuilles) qui présente une forte anisotropie.

### 5.6.4 Extension au cas 3D

La méthode peut être étendue au cas tridimensionnel. Cela a été présenté récemment par Gutkowski et al. (2004). Le principe reste similaire : il s'agit de considérer, pour une direction donnée de l'espace, l'étendue maximale entre deux plans parallèles qui séparent les pixels de la structure et ceux du complémentaire. En exprimant analytiquement la distance

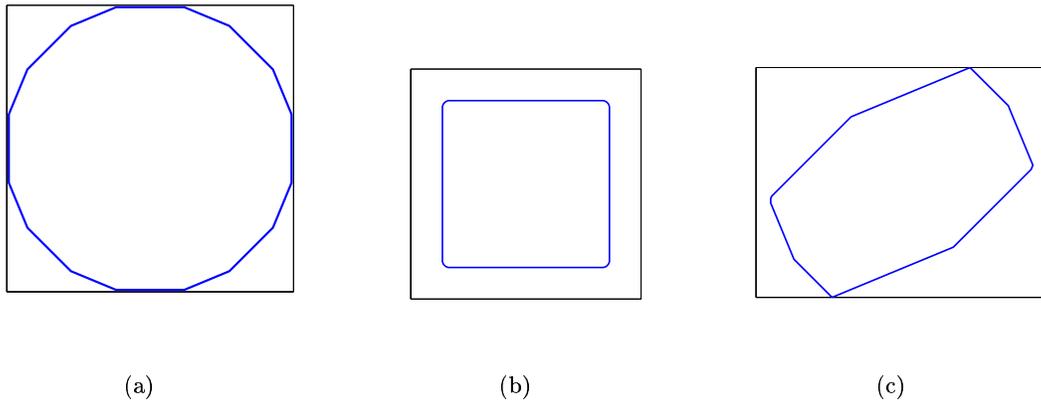


FIG. 5.11 – Zonoïdes équivalents d'objets de forme simple, en utilisant des configurations de  $3 \times 3$  pixels. (a) Un disque de rayon 15 pixels. (b) Un carré de côté 30 pixels. (c) Un rectangle  $40 \times 20$ , orienté de 30 degrés.

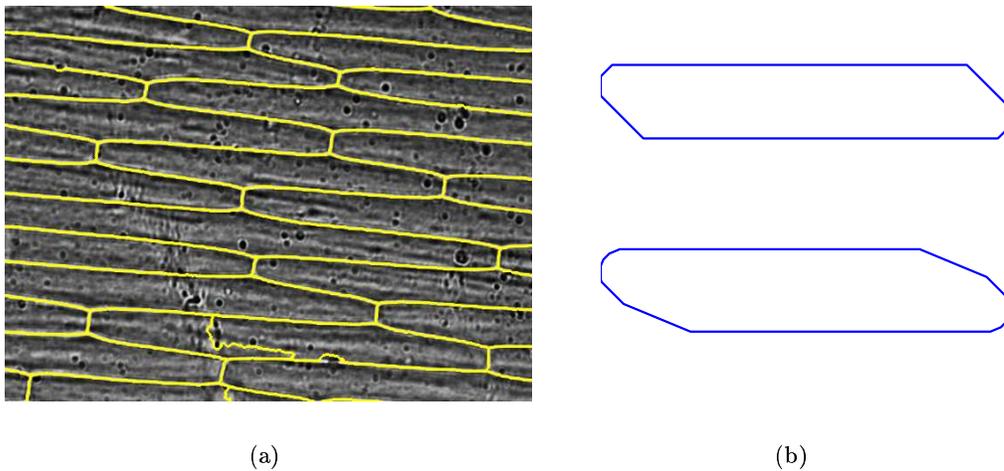


FIG. 5.12 – Calcul du corps de Blaschke sur une coupe de cellules végétales. (a) Portion de l'image d'origine, et résultat de la segmentation. (b) Calcul du zonoïde équivalent en utilisant 8 ou 16 directions.

entre ces plans, et en cherchant pour quelle direction cette distance est maximale, on trouve la direction de normale associée à la configuration 3D.

Gutkowski a ainsi donné les directions associées à 54 configurations de  $2 \times 2 \times 2$  pixels, correspondant aux 26 directions du cube unité. La représentation de la mesure directionnelle en 3 dimensions est un peu plus délicate que pour le cas 2D. Un diagramme polaire en bâtons ne permet pas de distinguer les directions, du fait de la projection. Le zonoïde équivalent est une alternative intéressante, mais sa construction en 3 dimensions est difficile.

Nous avons donc choisi une représentation par secteurs angulaires. La sphère unité est divisée en 26 secteurs sphériques, correspondant aux 26 directions élémentaires. Ces secteurs sphériques ne sont pas d'aire équivalentes, les secteurs angulaires correspondant n'ont donc pas le même volume. Pour la représentation, le rayon de chaque secteur angulaire est choisi de manière à ce que le volume correspondant soit proportionnel à la mesure directionnelle.

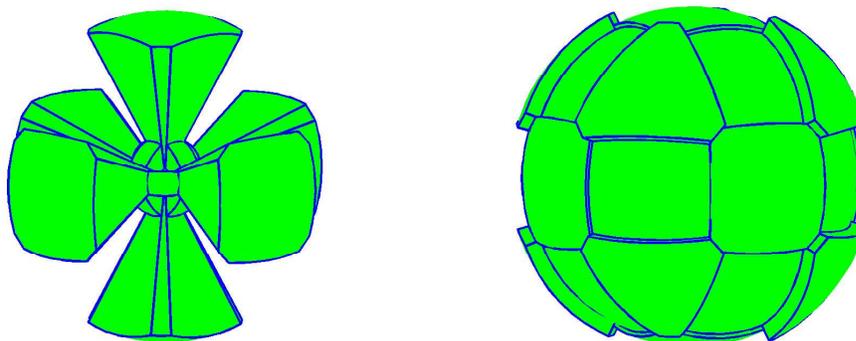


FIG. 5.13 – Exemple de mesures directionnelles 3D sur un cube de côté 60 pixels, et sur une sphère de rayon 40 pixels. Dans le cas du cube, la mesure est concentrée dans les 6 directions principales de la grille de discrétisation. Pour la sphère, on obtient une structure quasiment isotrope.

Pour l'image correspondant à la sphère, les directions diagonales semblent légèrement plus représentées, pouvant suggérer une non-anisotropie. En fait, un effet similaire a été remarqué pour la représentation de la mesure directionnelle planaire. Cet effet semble donc plus le fait d'un artefact dû à la grille de discrétisation.

## 5.7 Exemple d'application sur le pain

Dans une optique de validation des mesures développées et implémentées, nous avons appliqué différents estimateurs pour la caractérisation d'une structure biologique ayant une morphologie complexe : la pâte à pain.

Des images de pâte à pain à différents stades de fermentation ont été acquises par tomographie aux rayons X à l'ESRF<sup>1</sup> de Grenoble dans le cadre de la thèse de Babin (2005). Les images ont une taille de  $430 \times 430 \times 253$ , avec une résolution de  $15 \mu\text{m}$ . Deux exemples de coupes à différents stades de fermentation sont montrés sur la figure 5.14 :

Au début de la fermentation, on distingue de nombreuses bulles de gaz, de taille réduite. Au cours de la fermentation, les bulles grossissent et se rejoignent progressivement. Ce phénomène de coalescence produit une structure alvéolaire fortement connectée, que nous allons décrire en utilisant les outils présentés dans ce chapitre.

Nous nous intéressons à la structure formée par les bulles, que nous assimilons à un ensemble aléatoire, et que nous supposons stationnaire. Nous aurions tout aussi bien pu

<sup>1</sup>European Synchrotron Radiation Facility

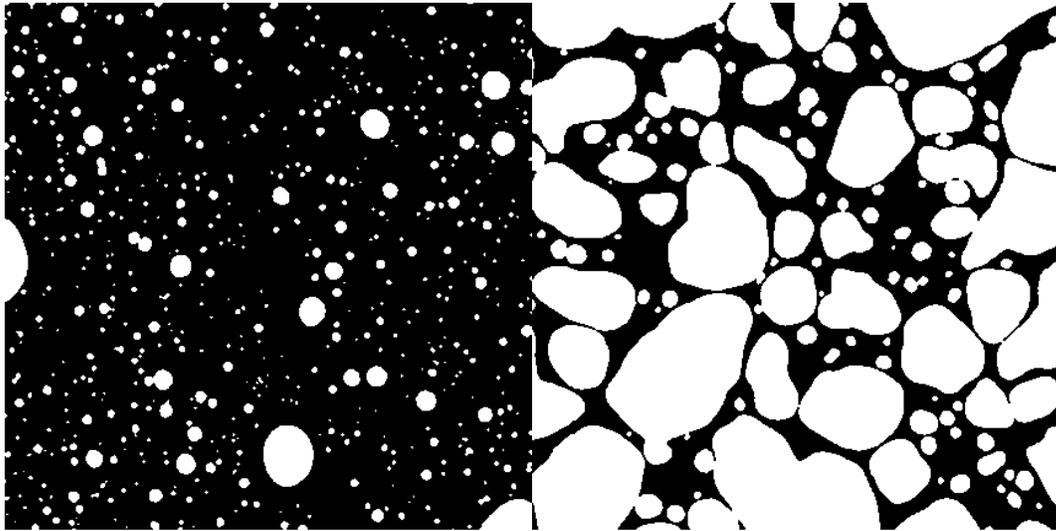


FIG. 5.14 – Coupes d’acquisitions 3D de pâte à pain à différents stades de fermentation. La taille des images est d’environ 6.5mm.

nous intéresser à la structure de la pâte. Cette démarche est totalement équivalente, les mesures de densités étant complémentaires pour les bulles et pour la pâte.

### 5.7.1 Évolution des densités de Minkowski

Afin d’étudier de montrer l’effet de la fermentation sur la morphologie de la pâte, nous avons estimé les 4 densités de Minkowski pour chaque étape de fermentation. Le résultat est donc un profil temporel des densités de volume, de surface, d’élongation, et de la caractéristique d’Euler-Poincaré. Le résultat est donné sur la figure 5.15.

La densité volumique augmente progressivement au fur et à mesure de la fermentation, ce qui traduit bien l’augmentation du volume relatif des bulles. La densité surfacique augmente d’abord assez vite. On peut corrélérer cette augmentation avec le gonflement des bulles, qui augmentent ainsi leur surface. La densité surfacique atteint ensuite un palier, que l’on peut interpréter comme étant le début de la phase de coalescence des bulles. L’augmentation de surface due à la croissance des bulles est compensée par la surface qui disparaît à la zone de rencontre entre les bulles. Ce dernier effet est ensuite prépondérant, lorsque la densité surfacique diminue encore.

La densité d’élongation est assez difficile à interpréter. On peut remarquer qu’elle suit à peu près les variations de la densité surfacique. La densité numérique est particulièrement informative. Après une brève augmentation, due à l’émergence de nouvelles bulles, elle décroît progressivement, marquant le fait que les bulles coalescent progressivement les unes avec les autres. Lorsque la structure des alvéoles devient fortement connectée, la densité de la caractéristique devient négative.

Dans l’interprétation des résultats, il faut noter que la taille de la fenêtre observée reste fixe, alors que le volume total de pâte augmente tout au long de l’acquisition.

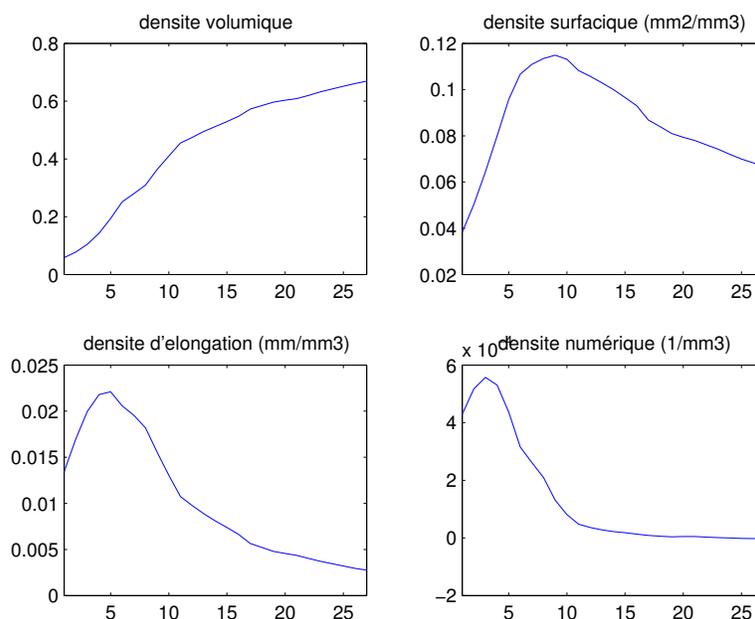


FIG. 5.15 – Évolution en fonction du temps des profils de densité pour la structure des bulles de gaz du pain.

### 5.7.2 Analyse directionnelle 3D

Nous avons aussi analysé l'orientation de la surface des bulles, afin de détecter une possible anisotropie. La figure 5.16, qui donne une représentation de la rose des normales, est très semblable à la figure 5.13-b, appliquée à une sphère. Aucune orientation préférentielle n'est donc détectable par cette approche.

## Conclusion sur les mesures discrètes

Ce chapitre a présenté les méthodes permettant d'estimer les caractéristiques morphométriques sur des ensembles discrétisés. Nous nous sommes particulièrement attaché à exprimer ces caractéristiques en fonction de mesures locales dans les images. Nous avons validé ces méthodes de mesures sur des structures réelles dont la morphologie est facilement interprétable.

Le nombre de mesures donné peut sembler assez réduit, mais elles sont bien adaptées à l'estimation de structures partiellement observées. En particulier, les mesures présentées pouvant être exprimées comme des ensembles de contributions ponctuelles, elles permettent d'estimer le volume, la surface, l'élongation moyenne, et la caractéristique d'Euler-Poincaré, même dans le cas d'un échantillonnage non uniforme.

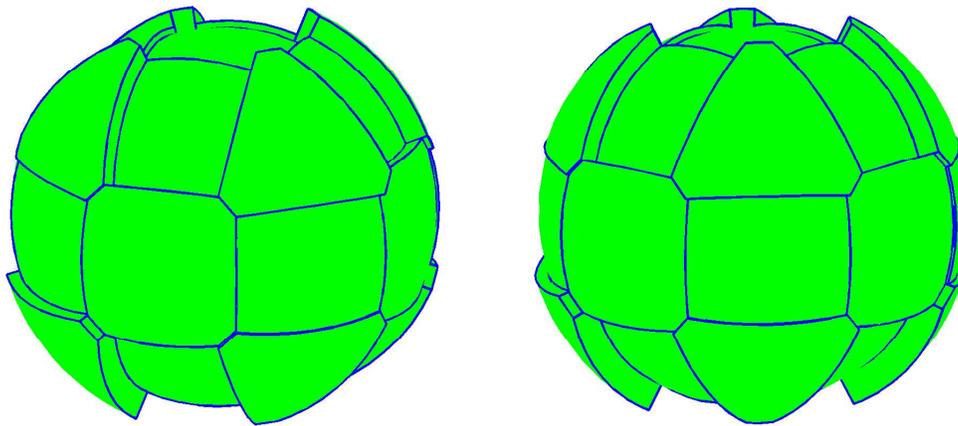
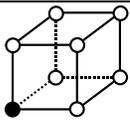
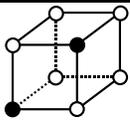
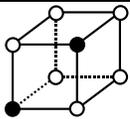
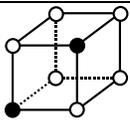
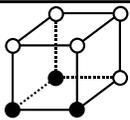
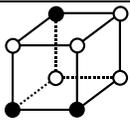
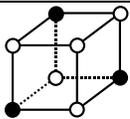
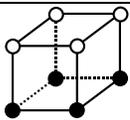
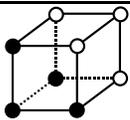
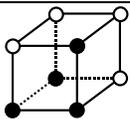
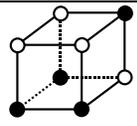
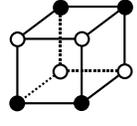
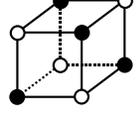
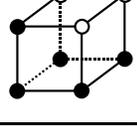
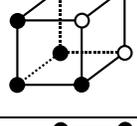
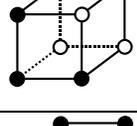
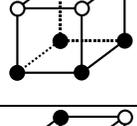
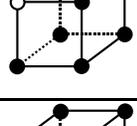
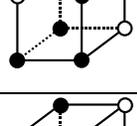
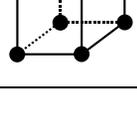


FIG. 5.16 – Rose des normales 3D pour la structure alvéolaire du pain, vue sous deux angles différents.

configurations	V	$\chi_6$	$S_3$	$\bar{b}_3$	$\chi_{26}$	$S_{13}$	$\bar{b}_{13}$
	1	1	3	3	1	(3,3,1)	(3,3,3)
	2	0	4	2	0	(4,6,2)	(2,4,6)
	2	2	6	6	-2	(6,4,2)	(6,4,0)
	2	2	6	6	-6	(6,6,0)	(6,6,6)
	3	-1	5	1	-1	(5,7,3)	(1,3,3)
	3	1	7	5	-3	(7,7,1)	(5,5,3)
	3	3	9	9	-1	(9,3,3)	(9,3,-3)
	4	0	4	0	0	(4,8,4)	(0,0,0)
	4	-2	6	0	-2	(6,6,4)	(0,0,0)
	4	-2	6	0	-2	(6,8,2)	(0,2,0)

TAB. 5.1 – Synthèse des contributions de chaque configuration. Les valeurs indiquées sont à multiplier par une constante. Le volume est à diviser par 8. La colonne  $\chi_3$  doit être divisée par 8. La colonne  $S_3$  est à diviser par 6, la colonne  $\bar{b}_3$  par 24. Les colonnes  $S_{13}$  et  $\bar{b}_{13}$  donnent chacune 3 valeurs, à multiplier respectivement par  $c_1$ ,  $\sqrt{2}c_2$  et  $\frac{c_3}{\sqrt{3}}$  pour  $S_{13}$ , et  $\frac{c_1}{4}$ ,  $\frac{c_2}{2\sqrt{2}}$  et  $\frac{c_3}{3\sqrt{3}}$  pour  $\bar{b}_{13}$ .

configurations	V	$\chi_6$	$S_3$	$\bar{b}_3$	$\chi_{26}$	$S_{13}$	$\bar{b}_{13}$
	4	0	8	4	0	(8,6,2)	(4,4,0)
	4	0	8	4	0	(8,8,0)	(4,8,0)
	4	4	12	12	4	(12,0,4)	(12,0,0)
	5	-1	5	-1	-1	(5,6,3)	(-1,-1,-1)
	5	-1	9	3	3	(9,3,3)	(3,-2,3)
	5	-3	7	-1	1	(7,5,1)	(-1,3,-3)
	6	0	4	-2	0	(4,4,2)	(-2,-4,-6)
	6	-2	6	-2	2	(6,4,2)	(-2,-4,0)
	6	-6	6	-6	2	(6,6,0)	(-6,6,-6)
	7	1	3	-3	1	(3,3,1)	(-3,-3,-3)

TAB. 5.2 – Synthèse des contributions de chaque configuration. Les valeurs indiquées sont à multiplier par une constante. Le volume est à diviser par 8. La colonne  $\chi_3$  doit être divisée par 8. La colonne  $S_3$  est à diviser par 6, la colonne  $\bar{b}_3$  par 24. Les colonnes  $S_{13}$  et  $\bar{b}_{13}$  donnent chacune 3 valeurs, à multiplier respectivement par  $c_1$ ,  $\sqrt{2}c_2$  et  $\frac{c_3}{\sqrt{3}}$  pour  $S_{13}$ , et  $\frac{c_1}{4}$ ,  $\frac{c_2}{2\sqrt{2}}$  et  $\frac{c_3}{3\sqrt{3}}$  pour  $\bar{b}_{13}$ .

# Chapitre 6

## Estimation de surface par coupes verticales

### Contenu

---

<b>6.1</b>	<b>Échantillonnage par coupes verticales</b>	<b>93</b>
<b>6.2</b>	<b>Estimation de surface par mesure d'angles</b>	<b>94</b>
6.2.1	Présentation	94
6.2.2	Modification de l'estimateur	95
<b>6.3</b>	<b>Implémentation discrète</b>	<b>96</b>
6.3.1	Mesure d'angle par ligne séparatrice	96
6.3.2	Mesure d'angle par modélisation de la frontière	96
6.3.3	Mesure de projection totale	98
<b>6.4</b>	<b>Amélioration de l'estimateur discret</b>	<b>98</b>
6.4.1	Principe	98
6.4.2	Pondération des estimations	98
6.4.3	Calcul des contributions pour chaque type	99
<b>6.5</b>	<b>Application à une sphère</b>	<b>100</b>
6.5.1	Simulation numérique	101
6.5.2	Mesures d'angles ou de longueur de projections	101
6.5.3	Utilisation de l'estimateur intégré	101
<b>6.6</b>	<b>Application à un modèle booléen</b>	<b>103</b>
6.6.1	Description du modèle	103
6.6.2	Modèle de simulation utilisé	104
6.6.3	Procédure de simulation	104
6.6.4	Simulations	106
<b>6.7</b>	<b>Discussion</b>	<b>106</b>

---



## Introduction

L'acquisition d'images en 3 dimensions est un processus complexe et coûteux, et une interrogation légitime est de se demander si on peut se passer du 3D. Par exemple, la surface d'une structure peut être estimée sans biais à partir de coupes planes. Les estimateurs les plus simples requièrent des coupes générées de manière isotrope, et utilisent des comptages d'intercepts sur des droites ou des mesures de périmètre (Weibel, 1979). Ils ne sont pas adaptés pour l'étude du péricarpe, car nous avons imposé que les acquisitions soient perpendiculaires au péricarpe.

Baddeley a montré à la fin des années 1980 comment estimer la surface à partir de coupes verticales à un plan de référence (Baddeley et al., 1986). L'idée est de générer des droites dans les coupes verticales en pondérant la distribution de l'orientation des droites par rapport à la verticale. Une alternative plus simple à utiliser est d'utiliser une courbe qui intègre cette pondération : une cycloïde. L'adaptation de ces deux estimateurs à des images discrètes n'est cependant pas très facile.

Récemment, Hahn a proposé un autre estimateur pour la densité surfacique, qui a l'avantage de concentrer les mesures sur des lignes horizontales dans la coupe (Hahn et Stoyan, 1998; Hahn et al., 1999). Cela rend possible la caractérisation de l'hétérogénéité spatiale de la structure selon l'axe vertical. Cet estimateur est intéressant pour la tomate, car il permet d'obtenir une estimation de la densité surfacique en fonction de la profondeur dans le péricarpe, en utilisant uniquement des coupes planes. On utilise par contre une approximation plus forte que dans le chapitre précédent, en supposant qu'à l'échelle de la coupe, le péricarpe peut être localement assimilé à une structure plane.

Nous rappelons d'abord le protocole d'échantillonnage par coupes verticales, puis l'estimateur de Hahn pour la densité surfacique. Nous proposons ensuite plusieurs implémentations basées, en particulier, sur des mesures d'angle proposées par Jensen et Kiderlen (2003). Les différentes implémentations sont ensuite comparées sur des exemples issus de simulations.

## 6.1 Échantillonnage par coupes verticales

Un plan de référence horizontal est choisi dans l'espace. Ce plan de référence peut apparaître naturellement dans la structure (surface d'un épiderme), ou être créé artificiellement (inclusion de la structure dans une résine, et coupe aléatoire). On peut aussi déformer la structure pour faire apparaître un plan artificiellement : si on coupe une structure ou un organe de forme tubulaire, comme une artère, dans le sens de la longueur, et qu'on la met à plat, elle présente un tel plan horizontal.

Toutes les coupes contiendront la direction normale au plan, d'où le nom de coupe verticale. L'orientation de la coupe autour de cet axe vertical est choisie de manière uniforme (voir la figure 6.1). Bien que les coupes ne soient pas orientées de manière isotrope dans l'espace, la densité surfacique peut être estimée sans biais.

Ce type d'échantillonnage se rapproche de ce que nous avons utilisé pour la tomate. En effet, toutes les observations sont acquises perpendiculairement à la surface du péricarpe. On n'utilise donc pas un plan de référence, mais une surface lisse. Nous faisons cependant l'hypothèse que la taille des coupes est suffisamment petite pour que la surface du péricarpe

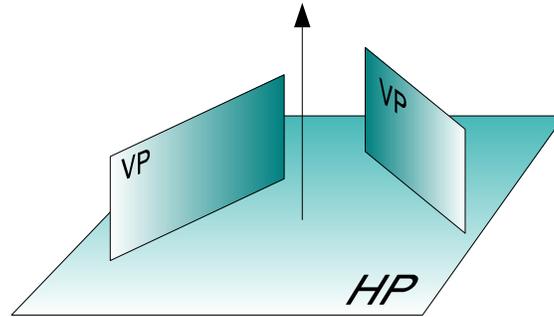


FIG. 6.1 – Échantillonnage d'une structure par des coupes verticales. Un plan de référence (HP) est choisi (généralement la surface de la structure), et les coupes verticales (VP) sont placées perpendiculairement à ce plan de référence, avec une orientation uniforme dans le plan.

puisse être localement considérée comme une surface plane. On considère que la structure est stationnaire dans la direction 'horizontale' de la coupe.

## 6.2 Estimation de surface par mesure d'angles

Nous détaillons ici l'estimateur de densité surfacique, introduit par U. Hahn. Cet estimateur n'utilise que des mesures localisées sur une ligne horizontale appartenant à la coupe, ce qui le rend utile pour l'étude de structures présentant un gradient selon l'axe vertical, mais stationnaires dans les 2 autres directions de l'espace (Hahn et Stoyan, 1998; Hahn et al., 1999).

### 6.2.1 Présentation

L'idée de Hahn est de considérer une ligne horizontale dans la coupe, et de calculer une quantité qui dépend des angles d'intersection de cette ligne avec la frontière de l'ensemble (voir la figure 6.2). On suppose donc qu'une méthode assez précise de mesure d'angle est disponible.

L'estimateur de densité surfacique  $S_V$  pour une altitude  $z$  donnée fait intervenir la valeur des angles  $\alpha_i$  mesurée à chaque point d'intersection, ainsi que la longueur  $L$  de la ligne de test :

$$\hat{S}_{V_1}(z) = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^n (\alpha_i + \cot \alpha_i) \quad (6.1)$$

Les angles utilisés ici sont les plus petits angles entre la tangente à la frontière et la ligne de test, ils sont donc toujours compris dans l'intervalle  $[0; \pi/2]$ . Le fait que l'estimateur soit

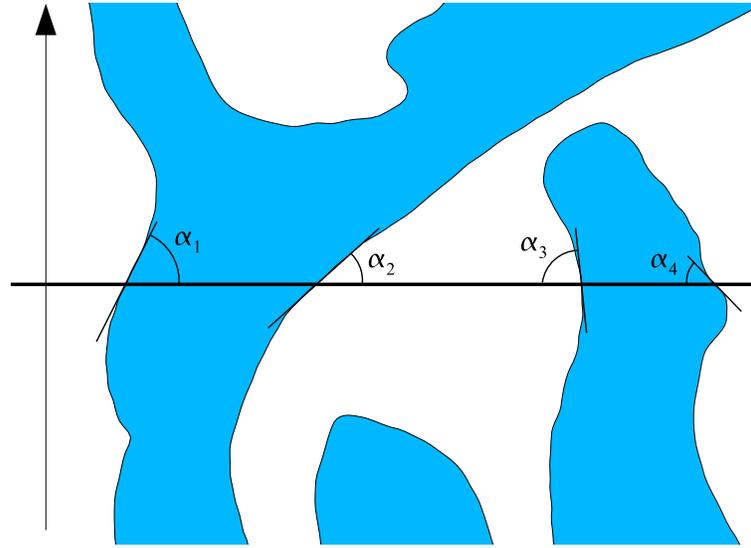


FIG. 6.2 – Estimation de la densité surfacique utilisant les angles

sans biais est démontré dans Hahn et Stoyan (1998), en utilisant des résultats généraux sur les processus de fibres et de surface dus à Mecke et Stoyan Mecke et Stoyan (1980); Stoyan et al. (1980); Mecke (1981).

Cet estimateur a deux inconvénients majeurs. D'une part, il ne s'adapte pas très facilement aux images numériques, car une mesure d'angle est nécessaire, et l'influence de l'erreur de mesure peut être importante. D'autre part, la présence d'un terme en cotangente amène des valeurs très élevées pour les angles presque nuls, ce qui se traduit par une variance infinie de l'estimateur.

### 6.2.2 Modification de l'estimateur

Afin d'éviter d'avoir une variance infinie, Hahn a proposé d'utiliser non pas une ligne, mais plutôt une bande de largeur  $\Delta$  et centrée autour de l'altitude  $z$ . La longueur de projection totale de la frontière de la structure  $p(T_\Delta(z))$  est mesurée à l'intérieur du rectangle de test  $T_\Delta(z)$  (voir Figure 6.3). La cotangente des angles est approchée par la longueur de projection de la courbe, divisée par la largeur de la bande.

$$\sum_i \cot \alpha_i \simeq \frac{p(T_\Delta(z))}{\Delta}$$

Le nouvel estimateur s'écrit donc :

$$\hat{S}_{V_2}(z) = \frac{1}{L} \left( \sum_{i=1}^n \alpha_i + \frac{p(T_\Delta(z))}{\Delta} \right) \quad (6.2)$$

L'utilisation de la longueur de projection à la place de la mesure d'angle évite le problème de variance infinie, et est présentée comme étant plus adaptée aux images numériques. Nous

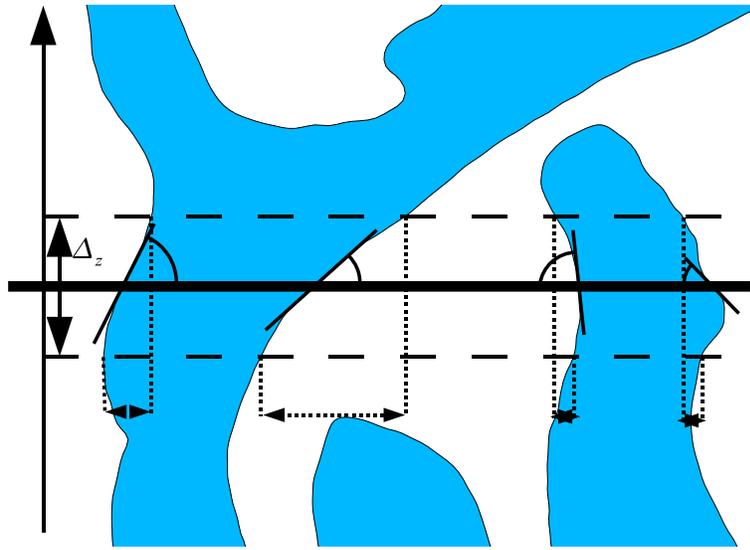


FIG. 6.3 – Modification de l’estimateur de densité surfacique

allons voir qu’une discrétisation appropriée de la mesure d’angle permet d’éviter le problème de variance infinie, sans utiliser de mesure de longueur de projection.

## 6.3 Implémentation discrète

### 6.3.1 Mesure d’angle par ligne séparatrice

Les angles de la frontière sont calculés par détermination de la ligne séparatrice optimale décrite dans Jensen et Kiderlen 2003 (voir section 5.6.1). L’estimateur (6.1) ne faisant intervenir que les points d’intersection avec la ligne horizontale, la somme est prise uniquement sur les pixels à l’intérieur de la structure dont un voisin à droite ou à gauche est à l’extérieur de la structure. Comme les angles  $\alpha_i$  ainsi obtenus prennent leur valeurs dans un ensemble fini ne comprenant pas l’angle nul, la variance de cet estimateur est finie.

### 6.3.2 Mesure d’angle par modélisation de la frontière

Une méthode alternative pour calculer l’angle de la frontière est la suivante. Une approximation de la frontière entre la structure et son complémentaire est créée. Nous avons utilisé, par exemple, les points médians entre deux transitions de pixels (Fig. 6.4).

Les points de la frontière sont utilisés pour calculer l’équation d’une primitive géométrique. Nous avons utilisé une approximation linéaire, mais une approximation par un cercle ou par une courbe polynomiale est aussi possible.

Une vérification rapide permet de voir que la différence entre les deux méthodes sur des configurations de  $3 \times 3$  pixels est très faible (voir le tableau 6.1).

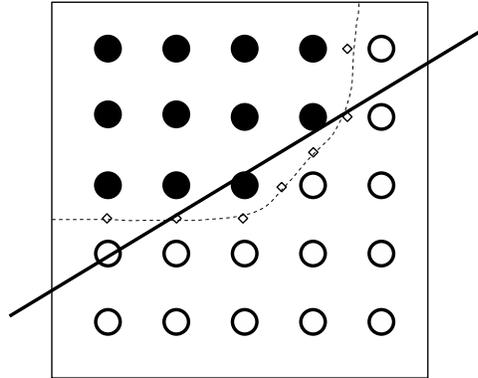


FIG. 6.4 – Détermination de l'angle par ajustement de droite. Des points sont placés entre les points de la structure et ceux du complémentaire, et on cherche la droite la plus proche de ces points.

type	configs	$KJ$	$BAL$	$\alpha_{\min}$	$\alpha_{\max}$												
1	<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr><td>○ ○ ○</td></tr> <tr><td>● ● ○</td></tr> <tr><td>● ● ●</td></tr> </table> <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr><td>○ ○ ○</td></tr> <tr><td>○ ● ●</td></tr> <tr><td>● ● ●</td></tr> </table>	○ ○ ○	● ● ○	● ● ●	○ ○ ○	○ ● ●	● ● ●	26.6	28.3	0	45						
○ ○ ○																	
● ● ○																	
● ● ●																	
○ ○ ○																	
○ ● ●																	
● ● ●																	
2	<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr><td>○ ○ ●</td></tr> <tr><td>○ ● ●</td></tr> <tr><td>● ● ●</td></tr> </table> <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr><td>● ○ ○</td></tr> <tr><td>● ● ○</td></tr> <tr><td>● ● ●</td></tr> </table>	○ ○ ●	○ ● ●	● ● ●	● ○ ○	● ● ○	● ● ●	45.0	45.0	28.3	63.4						
○ ○ ●																	
○ ● ●																	
● ● ●																	
● ○ ○																	
● ● ○																	
● ● ●																	
3	<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr><td>● ○ ○</td></tr> <tr><td>● ● ○</td></tr> <tr><td>● ● ○</td></tr> </table> <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr><td>○ ○ ●</td></tr> <tr><td>○ ● ●</td></tr> <tr><td>○ ● ●</td></tr> </table> <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr><td>● ● ○</td></tr> <tr><td>● ● ○</td></tr> <tr><td>● ● ●</td></tr> </table> <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr><td>○ ● ●</td></tr> <tr><td>○ ● ●</td></tr> <tr><td>● ● ●</td></tr> </table>	● ○ ○	● ● ○	● ● ○	○ ○ ●	○ ● ●	○ ● ●	● ● ○	● ● ○	● ● ●	○ ● ●	○ ● ●	● ● ●	63.4	61.7	45	90
● ○ ○																	
● ● ○																	
● ● ○																	
○ ○ ●																	
○ ● ●																	
○ ● ●																	
● ● ○																	
● ● ○																	
● ● ●																	
○ ● ●																	
○ ● ●																	
● ● ●																	
4	<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr><td>● ● ○</td></tr> <tr><td>● ● ○</td></tr> <tr><td>● ● ○</td></tr> </table> <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr><td>○ ● ●</td></tr> <tr><td>○ ● ●</td></tr> <tr><td>○ ● ●</td></tr> </table>	● ● ○	● ● ○	● ● ○	○ ● ●	○ ● ●	○ ● ●	90.0	90.0	64.4	90						
● ● ○																	
● ● ○																	
● ● ○																	
○ ● ●																	
○ ● ●																	
○ ● ●																	

TAB. 6.1 – Calcul des angles correspondants à des configurations de  $3 \times 3$  pixels. Les configurations sont classées selon leur angle associé, symétrique par rapport à la verticale. L'angle le plus probable, au sens de Kiderlen et Jensen, est donné dans la colonne  $KJ$ . L'angle calculé par interpolation linéaire de la frontière est donné dans la colonne  $BAL$ . On donne aussi les angles extrêmes pour lesquels une droite séparatrice peut être tracée.

### 6.3.3 Mesure de projection totale

Pour implémenter l'alternative d'Hahn basée sur les longueurs de projection totale décrite en section 6.2.2, il suffit de compter le nombre de transitions verticales dans la bande de test  $T_\Delta(z)$ . On divise ensuite par la largeur  $\Delta$  de la bande, qui est de  $(n - 1)$  pixels. La cotangente est donc remplacée par l'approximation :

$$\sum_{x \in \partial \mathbf{X} \cap L} \cot \alpha = \frac{D_{\pi/2}(X \cap T_\Delta(z))}{n - 1}$$

où  $D_{\pi/2}$  est le diamètre projeté, défini par l'équation (3.7). En pratique, on applique un filtrage pour enlever les parties de la structure visibles dans la bande  $T_\Delta(z)$  mais qui n'intersectent pas la droite  $L(z)$ . Nous avons utilisé une reconstruction géodésique (voir Soille (2003) ou Serra (1982)), en prenant comme marqueur  $X \cap B(z)$  et comme masque  $X \cap T_\Delta(z)$ .

## 6.4 Amélioration de l'estimateur discret

Nous proposons maintenant une modification de l'estimateur (6.1), qui présente le double avantage de s'adapter facilement au cas discret, et d'améliorer la précision globale, tout en gardant une variance finie.

### 6.4.1 Principe

On a vu en section 6.3.1 qu'on peut déterminer l'angle en un point de la frontière par calcul d'une droite séparatrice optimale. L'idée de cette partie est de ne pas considérer uniquement l'angle le plus probable, mais de considérer les angles de toutes les droites de séparation possibles (cf. Fig. 6.5). L'estimateur  $(\alpha_i + \cot \alpha_i)$  sera donc intégré pour tous les angles considérés.

Dans l'exemple de la figure 6.5, les deux droites séparatrices extrêmes sont les droites horizontale et diagonale montante. Ces deux droites séparent les discrétisations de l'ensemble et de son complémentaire, ainsi que toutes les droites intermédiaires.

### 6.4.2 Pondération des estimations

La largeur de la bande séparant les pixels appartenant à la structure et ceux appartenant à son complémentaire dépend de la direction considérée. Dans la figure 6.5, elle est égale à zéro lorsque l'on considère les directions  $\alpha_{\min}$  et  $\alpha_{\max}$ , et passe par un maximum pour un angle situé entre ces deux valeurs.

Il semble donc naturel d'utiliser la largeur de cette bande pour pondérer la fonction à intégrer. Cette pondération est normalisée pour s'assurer que son intégrale est celle d'une densité de probabilité :  $h'$  est la fonction proportionnelle à  $h$  telle que :

$$\int h'(\alpha, a_i, b_i) d\alpha = 1$$

Les  $a_i$  et les  $b_i$  sont deux vecteurs associés à la configuration qui permettent un calcul rapide de  $h$  en fonction de  $\alpha$ . La contribution d'une configuration de type  $i$  à l'estimation de surface s'écrit donc :

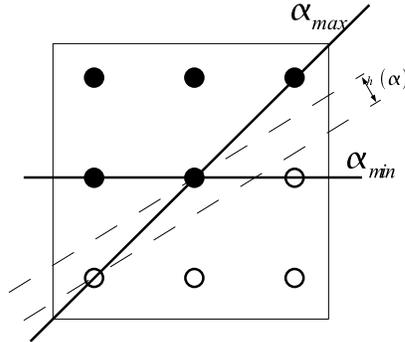


FIG. 6.5 – Étendue possible des droites séparatrices. Toutes les droites passant par le pixel central et faisant un angle avec l'axe horizontal compris entre  $\alpha_{\min}$  et  $\alpha_{\max}$  (sens trigonométrique, à partir de l'horizontale) séparent les pixels de la structure (en noir) et les pixels de son complémentaire (en blanc)

$$s_i = \int_{\alpha_{\min,i}}^{\alpha_{\max,i}} (\alpha + \cot \alpha) h'(\alpha, a_i, b_i) d\alpha \quad (6.3)$$

Cette expression peut se simplifier, en décomposant la cotangente en quotient de cosinus et de sinus, et en explicitant la fonction  $h$ , qui est sinusoïdale entre  $\alpha_{\min}$  et  $\alpha_{\max}$ .

La figure 6.6 montre la courbe théorique correspondant à  $\alpha + \cot \alpha$ , pour  $\alpha \in ]0; \frac{\pi}{2}]$ , ainsi que la fonction de pondération pour une des configurations listées en 6.1. La fonction pondérée est ensuite intégrée pour calculer la contribution de la configuration considérée.

### 6.4.3 Calcul des contributions pour chaque type

Finalement, on obtient par intégration numérique une contribution à l'estimation de la surface pour chaque type de configuration. La comparaison avec les contributions calculées uniquement sur l'angle le plus probable est fournie dans le tableau 6.2.

type	$\alpha_i + \cot \alpha_i$	$s_i$
1	2.464	3.571
2	1.785	1.823
3	1.607	1.611
4	1.570	1.574

TAB. 6.2 – Comparaison des contributions données par les différents estimateurs de densité surfacique pour des configurations de  $3 \times 3$  pixels. On divise ces valeurs par la résolution pour obtenir la densité surfacique en unités métriques.

L'implémentation algorithmique consiste à parcourir chaque configuration  $y$  de pixels

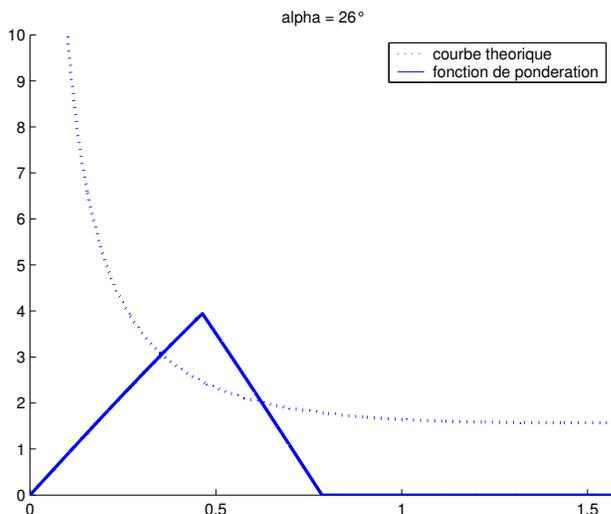


FIG. 6.6 – Estimation pondérée par la distance de séparation. On considère ici les configurations du type 1 dans le tableau 6.1. L'angle en abscisse est le plus petit angle avec l'horizontal, il est donc symétrique par rapport à 0 et  $\pi/2$ . La contribution  $\alpha + \cot \alpha$  est donnée par la ligne pointillée. Cette contribution est intégrée en utilisant la fonction de pondération donnée en gras.

d'une profondeur donnée, à identifier si elle fait partie d'un des types du tableau 6.1, et à utiliser la contribution  $s_i$  correspondante donnée dans le tableau 6.2.

L'estimateur de densité surfacique est le suivant :

$$\widehat{S}_{V_3}(z) = \frac{1}{L} \left( \sum_{y \in T_{\Delta}(z)} s_{\text{type}(y)} \right) \quad (6.4)$$

## 6.5 Application à une sphère

Le premier exemple considéré dans l'article de Hahn et al. (1999) est un système de sphères pleines qui ne se recouvrent pas. On peut se contenter, sans perte de généralité, du cas où on a une seule sphère observée sur des plans verticaux. On suppose que le centre de la sphère est à l'altitude  $z = 0$ , et on note  $R$  le rayon de la sphère. Par définition,  $S_V(z)dz$  est égal à l'aire de la surface de la sphère comprise entre  $z$  et  $z + dz$ . Il est évident que  $S_V$  est nulle pour  $z \notin [-R; R]$ . Le calcul de  $S_V$  entre  $-R$  et  $R$  est simple. On l'obtient en calculant la surface de la calotte sphérique délimitée par les plans d'altitude  $-R$  et  $z$ . Par intégration sur la calotte sphérique, on vérifie aisément que la surface de la calotte sphérique croît linéairement de  $z = -R$  à  $z = R$ . En dérivant cette surface par rapport à  $z$ , on obtient la densité surfacique, qui est donc égale à :

$$S_V(z) = \begin{cases} 2\pi R & \text{pour } -R \leq z \leq R \\ 0 & \text{sinon} \end{cases} \quad (6.5)$$

### 6.5.1 Simulation numérique

Les simulations ont été conduites avec des sphères de rayon 0.3. Pour chaque simulation, le centre de la sphère a été choisi aléatoirement à l'intérieur du cube de coordonnées  $[0.5; 0.51]^3$ .

Ensuite, 100 coupes verticales, parallèles aux axes  $Ox$  et  $Oz$ , espacées de .01 et contenues dans le cube unité ont été considérées. L'intersection de chaque coupe avec la sphère a été calculée, et discrétisée pour obtenir une image de  $100 \times 100$  pixels par coupe. Sur chaque coupe discrétisée, le gradient de la densité surfacique a été estimé en utilisant les estimateurs décrits en sections 6.3.1, 6.3.2 et 6.4.

La surface totale a aussi été calculée en utilisant la somme des densités de surface sur tous les  $z$ , et moyennée sur toutes les coupes virtuelles du cube. La même procédure a été répétée 100 fois pour chaque rayon.

### 6.5.2 Mesures d'angles ou de longueur de projections

La figure 6.7 montre les estimations de la densité surfacique, en fonction de la profondeur, obtenues par les méthodes décrites en sections 6.3.1 et 6.3.2.

Les estimateurs ont des comportements différents selon la taille des configurations utilisées. L'estimateur utilisant un calcul de longueur de projection a une variance plus faible que ceux utilisant uniquement les mesures d'angles, comme il était prévu. De plus, la variance des estimations reste stable lorsque la taille des configurations utilisées augmente.

D'un autre côté, l'estimateur basé uniquement sur la mesure d'angle sous-estime systématiquement la valeur désirée, mais le biais se réduit lorsque la taille des configurations utilisées augmente. Un autre effet notable est que la variance augmente fortement pour les estimations faites près du bord des sphères. Ceci est dû à la présence d'un angle très proche de l'horizontale, donnant une estimation très variable du fait de la cotangente.

Déterminer quel estimateur est le meilleur n'est pas facile. Le deuxième (basé uniquement sur les mesures d'angles) sous-estime la valeur théorique, et présente une variance qui augmente avec la taille des configurations utilisées. Cependant, il a l'avantage de n'utiliser que des informations locales, tandis que la mesure de longueur de projection nécessite une exploration de l'image plus large. De plus, le biais diminue avec la taille des configurations utilisées. Il semble donc possible de trouver un compromis sur la taille des configurations pour avoir à la fois un biais et une variance faibles.

### 6.5.3 Utilisation de l'estimateur intégré

Le résultat des estimations faites avec l'estimateur avec intégration (section 6.4) sur tous les angles possibles est montré sur la figure 6.8. Seules les configurations de  $3 \times 3$  pixels ont été utilisées pour cette simulation.

Le fait d'intégrer les estimations pour différentes valeurs angulaires semble donner de meilleurs résultats. Au lieu d'être toujours inférieure à la valeur théorique, l'estimation de la densité surfacique est parfois inférieure, parfois supérieure. Cela améliore ainsi l'estimation de la surface totale de la sphère, obtenue en intégrant sur toutes les coupes effectuées. On obtient un coefficient de variation de 10% pour l'estimateur basé sur l'angle le plus probable, et de 1.5% pour l'estimateur intégrant l'angle.

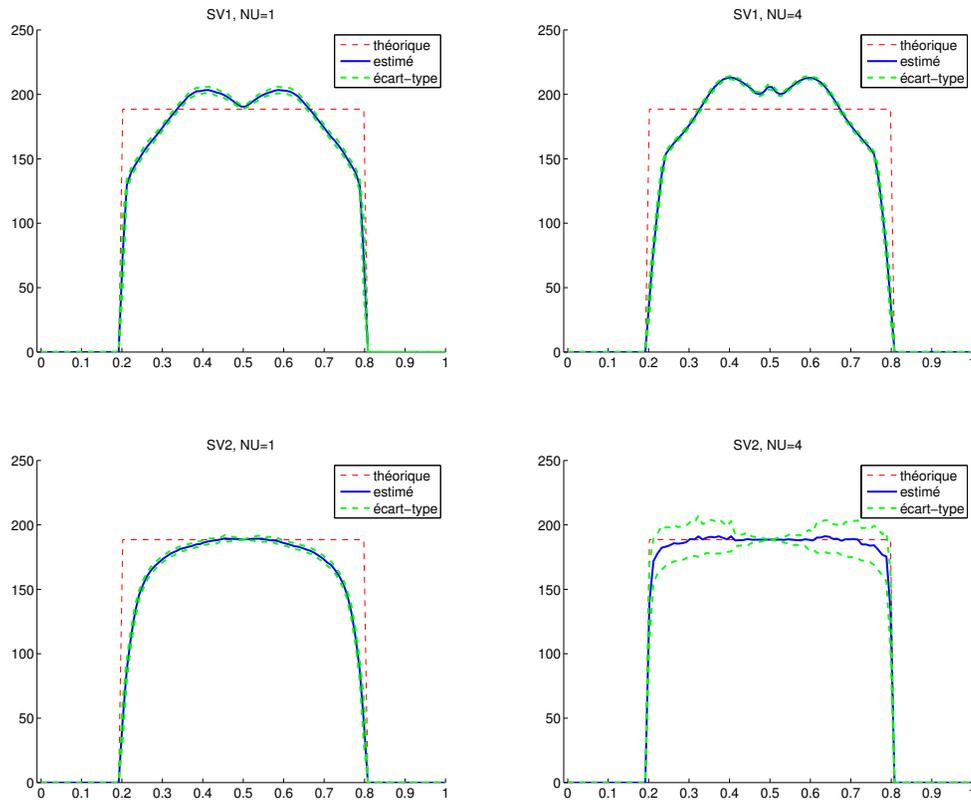


FIG. 6.7 – Estimation de surface pour une sphère de rayon 0.3. La valeur théorique pointillée est donnée en rouge ( $1,84$  pour  $|z| \leq 0,3$  et  $0$  sinon). La courbe bleue continue est la valeur moyenne pour une profondeur donnée, moyennée sur 100 simulations, tandis que les courbes vertes en tirets représentent l'écart-type correspondant à la profondeur. Les simulations de la ligne du haut utilisent le calcul d'angle et la mesure de longueur de projection, tandis que la ligne du bas n'utilise que la mesure d'angle. La taille des configurations utilisées varie de  $3 \times 3$  (pour  $nu=1$ ) à  $9 \times 9$  (pour  $nu=4$ ) pixels.

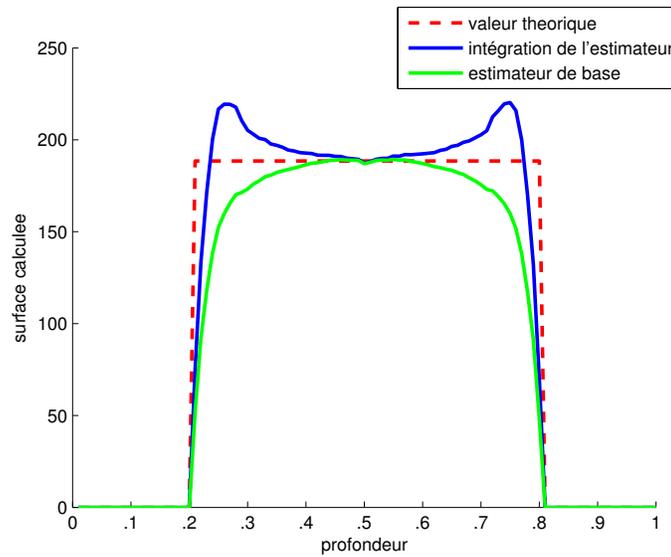


FIG. 6.8 – Estimation de surface pour une sphère de rayon 0,3. La valeur théorique pour la densité surfacique est donnée en rouge. La courbe bleue représente l'estimation avec intégration d'angle. La courbe verte représente les estimations basées sur les angles les plus probables.

## 6.6 Application à un modèle booléen

Après avoir validé l'estimateur sur un exemple assez simple, il est intéressant de tester l'estimateur sur un modèle un peu plus complexe. L'intérêt de l'estimateur est de pouvoir caractériser l'hétérogénéité en fonction de la profondeur. Hahn a utilisé un modèle booléen avec un gradient sur l'intensité des germes, nous avons donc repris cette voie.

### 6.6.1 Description du modèle

Un modèle booléen est composé d'un processus de points, les germes, et d'un processus de formes, les grains. Les deux processus sont totalement indépendants. Chaque forme est associée à un germe, et l'union de toutes les formes centrées sur leur germe constitue un modèle booléen (Stoyan et al., 1995; Weil et Wieacker, 1984; Weil, 1999). Le processus de points est un processus poissonnien : la position de chaque germe est indépendante, et le nombre de points par unité de volume ou de surface suit une loi de Poisson de paramètre  $\lambda V$ , où  $\lambda$  est la densité du processus, et  $V$  le volume de la zone considérée.

Dans cette étude, la densité des germes  $\lambda(z)$  n'est pas constante mais dépend de la profondeur  $z$ . Le processus de grains est un processus de sphères, dont le diamètre  $D$  peut varier en fonction de la profondeur. La fonction de répartition des diamètres des sphères situées à la profondeur  $z$  est notée  $D(z, r)$ .

Ce type de modèle géométrique a déjà été largement étudié (en particulier par Weil), on connaît donc les formules théoriques pour exprimer les densités volumiques et surfaciques (Weil et Wieacker, 1984; Weil, 1988, 1990, 1995, 1999, 2001) :

$$V_V(z) = 1 - \exp \left\{ - \int_{-\infty}^{\infty} \int_0^{\infty} \frac{\pi}{2} r [1 - D(t, r)] \lambda(t) I_{[-\frac{r}{2}; \frac{r}{2}]}(z - t) dr dt \right\}$$

et

$$S_V(z) = (1 - V_V(z)) \times \int_{-\infty}^{\infty} \int_0^{\infty} \frac{\pi}{2} r \delta(t, r) \lambda(t) I_{[-\frac{r}{2}; \frac{r}{2}]}(z - t) dr dt$$

avec  $I$  pour la fonction indicatrice, et  $\delta$  pour la densité de la distribution  $D$ . Ces équations donnent des formules précises mais pas très faciles à intégrer. On peut utiliser une approximation de ces formules, en considérant que le modèle est localement stationnaire :

$$V_V(z) \simeq 1 - \exp(-\lambda(z) \bar{V})$$

$$S_V(z) \simeq \exp(-\lambda(z) \bar{V}) \bar{S} \lambda(z)$$

avec  $\bar{V}$  et  $\bar{S}$  étant les volume et surface moyens des grains. Dans le cas où toutes les sphères ont le même rayon  $r$ , il s'agit simplement du volume et de la surface de la boule de rayon  $r$ .

### 6.6.2 Modèle de simulation utilisé

Le modèle utilisé est un modèle booléen sphérique de rayon constant. La densité des germes dépend de la profondeur  $z$ , et a été choisie conformément à (Hahn et Stoyan, 1998) :

$$\lambda(z) = 781 + 93750 \left( 1 - \exp \left( -7(0.29z + 0.2)^3 \right) \right) \quad \text{pour } z \in [0; 2, 4]$$

Les germes sont des sphères, de rayon constant égal à 0.0021 pour tout  $z$ . Un exemple de simulation obtenue avec un tel modèle est montré sur la figure 6.9.

### 6.6.3 Procédure de simulation

Nous décrivons ici la procédure de simulation d'un modèle booléen non stationnaire, par calcul numérique. La densité  $\lambda(z)$  est d'abord calculée pour  $N$  valeurs équi-réparties entre 0 et 2.4, le domaine de définition de  $\lambda(z)$ . Nous avons choisi  $N = 2400$ . Le nombre de germes  $N_g$  à l'intérieur de la fenêtre est calculé en utilisant une loi de Poisson dont le paramètre est l'intégrale de la densité sur  $z$ , multiplié par les dimensions en  $x$  et  $y$  de l'image.

La densité est intégrée en calculant la somme cumulée, et normalisée entre 0 et 1 pour obtenir la fonction de répartition. Puis  $N_g$  nombres aléatoires uniformément répartis entre 0 et 1 sont générés, et les positions en  $z$  sont déduites grâce à la fonction de répartition. Les positions  $x$  et  $y$  sont quant à elles choisies de manière uniforme.

Nous n'avons besoin que de l'information disponible sur une coupe verticale. Afin de réduire les temps de calcul, une coupe donnée est choisie arbitrairement. Les boules intersectant cette coupe sont sélectionnées en testant si la différence des coordonnées en  $y$  est inférieure au rayon des boules. Le rayon  $r_i$  du disque dans la coupe est calculé par  $r_i = \sqrt{r^2 - (y - y_i)^2}$ , et le modèle booléen 2D utilisant des disques de rayon  $r_i$  et de position  $(x_i, z_i)$  est créé.

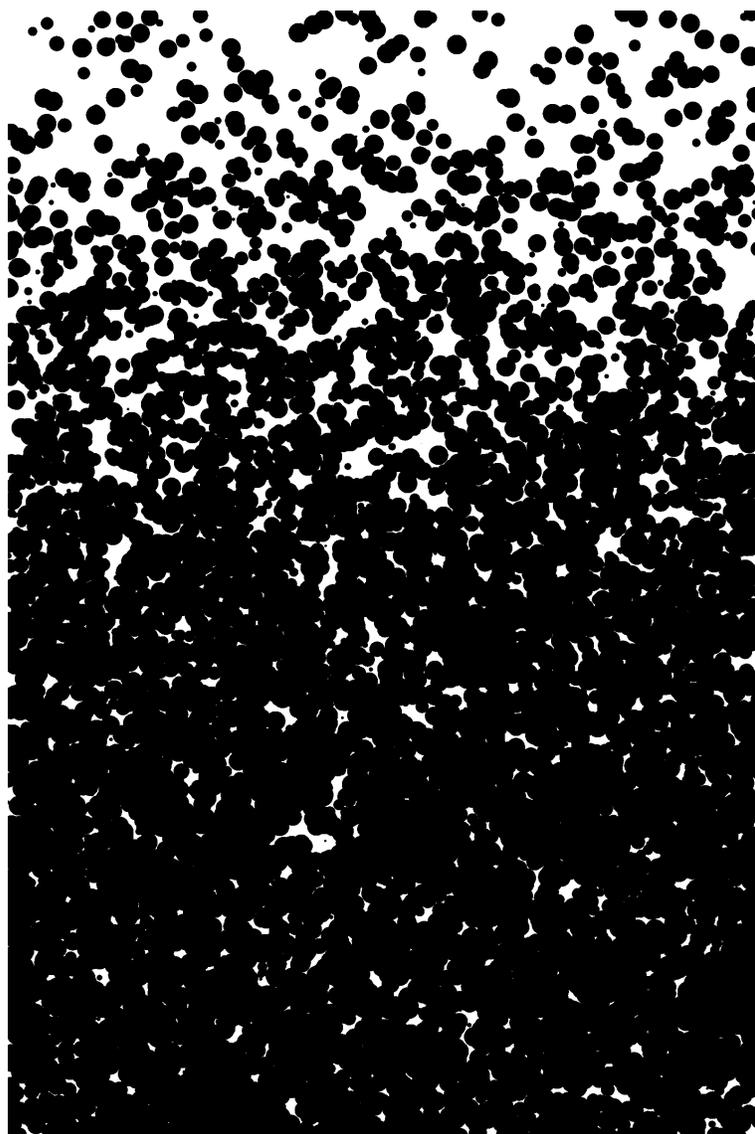


FIG. 6.9 – Coupe verticale d'un modèle booléen 3D, avec gradient de densité en profondeur.

### 6.6.4 Simulations

Les densités de volume et de surface, toutes les deux dépendantes de la profondeur, sont estimées sur 100 réalisations du modèle booléen. Les résultats sont donnés sur la figure 6.10. Les variabilités des estimations ne sont pas montrées, mais elles sont comparables. On peut remarquer :

- l'estimation de la densité volumique est sans biais, mais ce n'est guère surprenant, la densité volumique étant le paramètre le plus simple à estimer,
- tous les estimateurs de densité surfacique sous-estiment légèrement la valeur théorique,
- pour des tailles de configurations petites, l'estimateur utilisant les longueurs de projection est meilleur que l'estimateur utilisant seulement les angles. La différence se réduit lorsque la taille des configurations augmente (données non montrées ici),
- pour des configurations  $3 \times 3$ , l'estimateur de densité surfacique intégrant la contribution des angles donne une meilleure estimation que celui utilisant uniquement l'angle le plus probable.

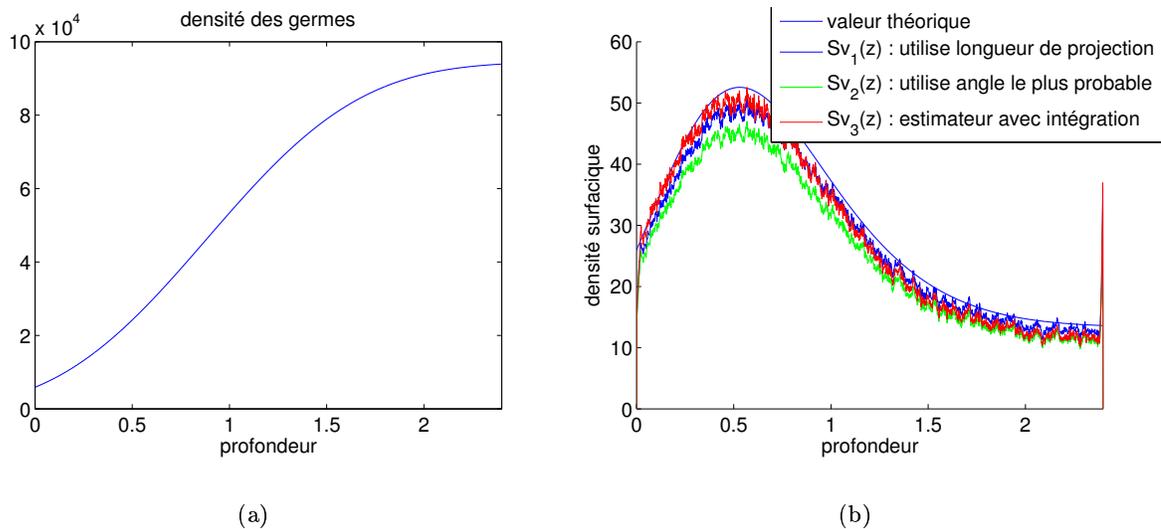


FIG. 6.10 – Densités théoriques et estimées du modèle booléen. Dans tous les cas l'abscisse représente la profondeur. (a) Densité des germes du modèle, dépendante de la profondeur. (b) Densité surfacique, théorique en trait fin, et estimée selon plusieurs méthodes en couleur.

## 6.7 Discussion

Plusieurs implémentations ont été présentées et discutées pour l'estimation de la densité surfacique à partir d'images discrètes de coupes verticales. La première se base uniquement sur l'information disponible pour les angles, la deuxième utilise la longueur de projection dans une bande rectangulaire. La troisième implémentation est basée sur les angles, mais

intègre les contributions des tous les angles possibles, en pondérant par la probabilité d'apparition d'un tel angle.

Sur un exemple basique (sphère), l'implémentation utilisant les angles et la longueur de projection a une variance plus faible, mais donne souvent une valeur différente de la valeur théorique, différence qui semble due à la mesure de longueur de projection. D'un autre côté, l'implémentation basée uniquement sur l'angle le plus probable est globalement plus proche de la valeur attendue, avec une différence qui diminue lorsque la taille des configurations utilisées augmente, mais cette diminution du biais est compensée par une augmentation de la variance.

Enfin, l'implémentation avec intégration sur tous les angles possibles présente à la fois une diminution globale du biais, et une diminution de la variance par rapport à l'utilisation des angles seuls.



# Chapitre 7

## Imagerie et morphométrie des cellules du péricarpe

### Contenu

---

<b>7.1</b>	<b>Choix des variétés</b>	<b>111</b>
7.1.1	Cameron et Quest	111
7.1.2	Lignées sauvage et mutante DR12	111
<b>7.2</b>	<b>Modélisation de la surface de chaque tomate</b>	<b>112</b>
7.2.1	Acquisition des quartiers	113
7.2.2	Extraction du contour	113
7.2.3	Contours moyens d'une tomate	114
7.2.4	Interpolation du contour	114
7.2.5	Calcul des courbures principales	115
<b>7.3</b>	<b>Acquisition des images de péricarpe</b>	<b>117</b>
7.3.1	Choix des points	117
7.3.2	Préparation des échantillons	117
7.3.3	Acquisition par microscopie confocale	117
7.3.4	Collage des images	118
7.3.5	Exemples d'images reconstituées	121
<b>7.4</b>	<b>Amélioration des images</b>	<b>121</b>
7.4.1	Correction de la décroissance lumineuse	121
7.4.2	Amélioration de l'image des parois	125
7.4.3	Augmentation du contraste	125
<b>7.5</b>	<b>Segmentation des particules de péricarpe</b>	<b>127</b>
7.5.1	Détection automatique des minima	127
<b>7.6</b>	<b>Traitements additionnels</b>	<b>128</b>
<b>7.7</b>	<b>Exemple d'images segmentées</b>	<b>129</b>
<b>7.8</b>	<b>Extraction des paramètres morphologiques</b>	<b>133</b>
7.8.1	Paramètres globaux	133
7.8.2	Paramètres locaux	134
7.8.3	Normalisation des profils	134
7.8.4	Analyse des profils de densité	135
7.8.5	Comparaison des variétés et des lignées	136

---



## Introduction

Ce chapitre présente les différentes étapes d'acquisition des images. Nous détaillons la préparation des échantillons, et l'acquisition des images par microscopie confocale.

Nous détaillons les différentes méthodes de traitement d'images qui nous permettent d'obtenir des images binaires sur lesquelles nous pourrions appliquer les mesures discrètes vues au chapitre 5. Outre les opérations de correction de la baisse d'intensité lumineuse, spécifiques à la microscopie confocale à balayage laser, nous avons mis en place une procédure de segmentation totalement automatique adaptée aux milieux cellulaires 3D. Celle-ci est basée sur des algorithmes éprouvés issus de la morphologie mathématique (Serra, 1982; Soille, 2003), et repose principalement sur la ligne de partage des eaux. Elle nous permet de segmenter un ensemble de régions dans le péricarpe. Ces régions, que l'on appellera dans la suite particules, correspondent aux cellules du péricarpe ainsi qu'aux espaces intercellulaires.

Nous donnons quelques exemples de segmentation, puis nous détaillons comment les paramètres géométriques de ces particules sont estimés en pratique, dans un cadre global ainsi que local. Enfin, nous présentons les méthodes d'analyses de ces estimations.

## 7.1 Choix des variétés

Deux jeux de données ont été analysés. Le premier jeu de données est issu d'un programme Aliment Qualité Sécurité ayant pour objectif la « recherche de critères objectifs de caractérisation de la farinosité dans les tomates destinées au marché de frais » où des variétés contrastées du point de vue de la qualité sensorielle ont été étudiées. Le second jeu de données est basé sur la comparaison de la variété sauvage Kemer avec son mutant DR12 obtenues à l'INRA de Toulouse. Ces échantillons ont été sélectionnés sur la base de résultats indiquant à la fois une modification de la division cellulaire et une fermeté accrue.

### 7.1.1 Cameron et Quest

Cameron et Quest sont deux variétés de tomate cultivées en France et dont la texture sensorielle est connue pour être contrastée. La première variété, 'Cameron' (Syngenta Seeds), est caractérisée par une forte farinosité. La deuxième variété, 'Quest' (DeRuiter), est une variété juteuse.

Les tomates ont été fournies par le CTIFL (Centre Technique International des Fruits et Légumes, Paris). Pour chaque variété, 7 tomates au stade rouge mature (code couleur CTIFL n°9) ont été prélevées pour les acquisitions par imagerie.

### 7.1.2 Lignées sauvage et mutante DR12

DR12 est une plante transgénique issue d'une construction antisens de la variété Kemer (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Elle a été obtenue à l'INRA de Toulouse dans le cadre de la recherche de gènes impliqués dans la maturation et la conservation des fruits. La mutation a affecté un gène présentant des homologies de séquence avec un facteur de transcription sensible à l'auxine (Jones et al., 2002). L'auxine est une hormone qui joue un rôle dans la division et l'expansion des cellules pendant le développement du fruit. Les fruits de

tomate issus de la plante transgénique DR12 présente une fermeté accrue à maturité et une pigmentation en mosaïque au début de la maturation (figure 7.1).

Des images de la zone sous la cuticule montrent une différence de taille de cellules entre les deux lignées (Jones et al., 2002). L'objectif est ici de quantifier et de localiser cette variation. La figure 7.1-b montre la zone sous-cuticulaire pour les deux lignées au stade rouge.

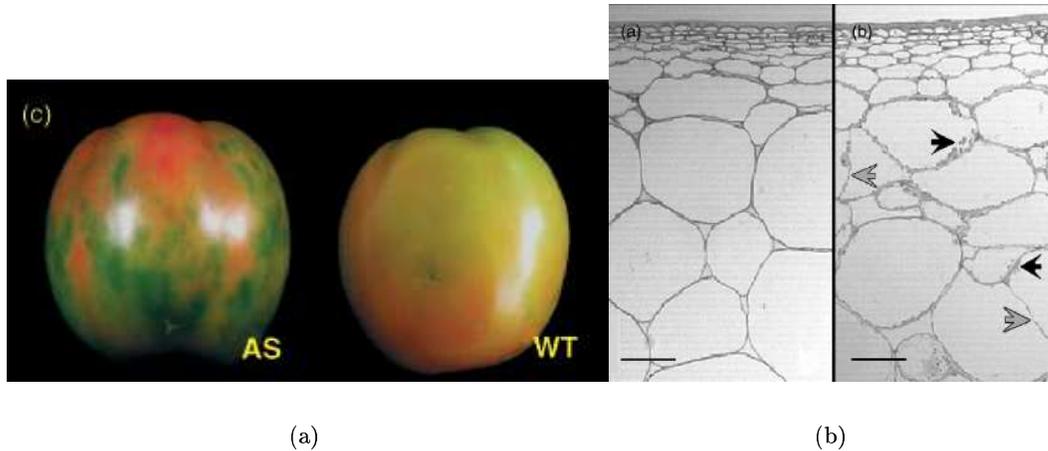


FIG. 7.1 – Différences entre les lignées sauvage (WT) et antisens (AS) (d'après Jones et al. (2002), avec l'autorisation des éditions Blackwell). (a) Différence au niveau de l'aspect général, 3 jours après la récolte (b) Différences sur des coupes en microscopie optique, 30 jours après l'anthèse (WT à gauche et AS à droite). Les flèches grises montrent des divisions cellulaires récentes chez la lignée antisens. Les flèche noires montrent les concentrations élevées de chloroplastes. La longueur des barres est de  $80 \mu\text{m}$ .

Les tomates sont codés W (wild type) pour la lignée sauvage Kemer et A (Antisens) pour la lignée modifiée. Pour chaque lignée, 12 fruits ont été récoltés au stade vert-tournant (début de changement de couleur) et analysés.

## 7.2 Modélisation de la surface de chaque tomate

Le calcul des probabilités d'échantillonnage nécessite de connaître les courbures principales du péricarpe à l'emplacement des points d'acquisition, ainsi que la distance à l'axe central. Le péricarpe de la tomate présente une symétrie selon un axe de révolution. On approche la forme globale à partir d'observations sur les quartiers. Les courbures en chaque point de la surface, ainsi que la densité surfacique des points d'acquisition, sont déduites de la surface de révolution ainsi calculée. On utilise les mêmes courbures principales  $\kappa_1$  et  $\kappa_2$  pour une traversée donnée, ainsi que la même densité  $\lambda(m_0(x))$ .

### 7.2.1 Acquisition des quartiers

Les tomates analysées sont découpées en quartier après le prélèvement des échantillons pour la microscopie. Des images des quartiers sont numérisées à l'aide d'un scanner plat (voir la figure 7.2). On obtient pour chaque tomate 4 scans de quartiers. Certains scans portent les traces des forages effectués pour les acquisitions microscopiques, et ne pourront pas être exploités.

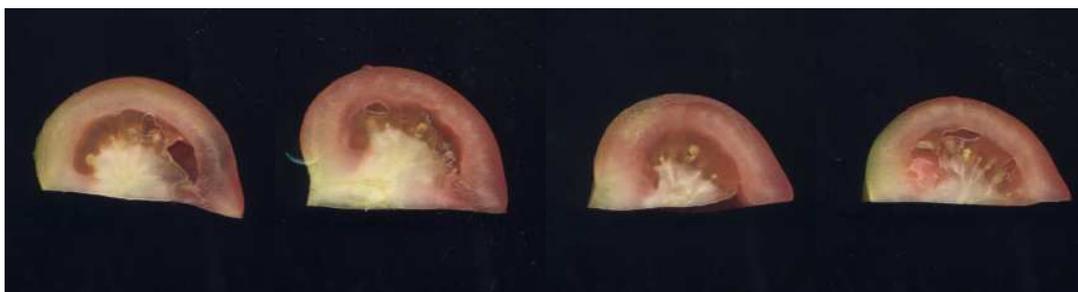


FIG. 7.2 – Coupes de quartiers de tomate, en vue de la caractérisation de la forme générale.

### 7.2.2 Extraction du contour

Les images acquises sont des images couleurs. Un premier seuillage est effectué sur le canal rouge. Pour éviter d'inclure des parties de l'image extérieures au quartier, le quartier est reconstruit morphologiquement, avec un masque de départ placé au centre de l'image. Ensuite, les trous à l'intérieur du quartier sont éliminés grâce à une fermeture morphologique. Le résultat est un bloc compact épousant la forme du quartier (figure 7.3).

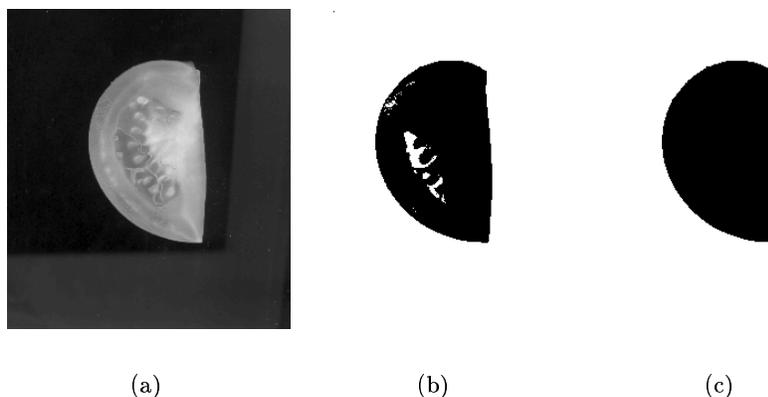


FIG. 7.3 – Segmentation du contour d'un quartier de tomate. (a) Composante rouge de l'image. (b) Seuillage de la composante rouge. (c) Segmentation après traitement morphologique.

Le contour est ensuite extrait à partir de la différence entre l'image binaire du quartier,

et son dilaté morphologique par un élément structurant suffisamment petit. En choisissant un élément structurant en forme de croix, chaque pixel du contour obtenu est 8-connecté à deux autres pixels du contour.

Nous pouvons donc chaîner les pixels, et obtenir une liste de points consécutifs qui suit le contour. L'image scannée étant un quartier de tomate, le contour contient aussi des points situés le long de l'axe central de la tomate. Une sélection manuelle est nécessaire à ce stade pour isoler les pixels correspondant à la surface de la tomate.

### 7.2.3 Contours moyens d'une tomate

Les coordonnées images sont converties en coordonnées métriques en multipliant les coordonnées des points par la résolution du scanner (de 600 dpi, ou points par pouces), puis par le facteur de conversion pouce/mm (1 pouce=28 mm).

Les contours des quartiers de tomate sont placés le long de l'axe ( $Ox$ ). Nous calculons la translation qui place le premier point du contour au point  $(0,0)$ , puis la rotation qui va placer le dernier point sur l'axe ( $Ox$ ), à droite de l'origine (figure 7.4-b).

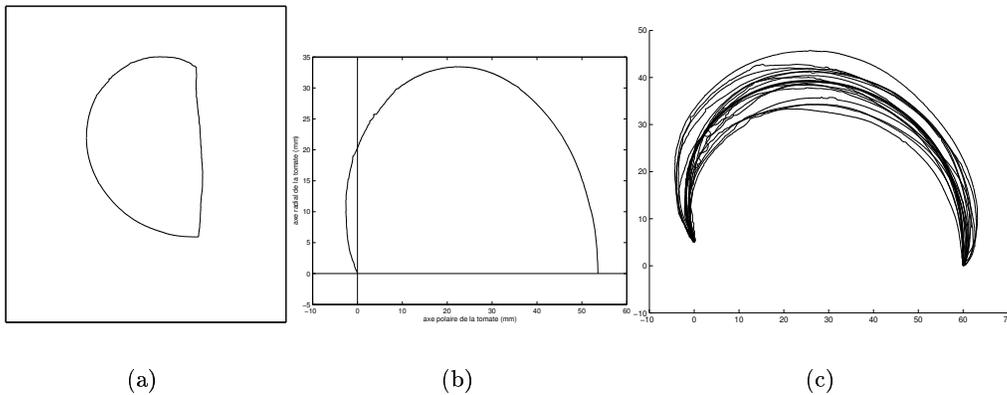


FIG. 7.4 – Transformation du contour en courbe. (a) Segmentation du contour et chaînage des pixels. (b) Mise à l'échelle et déplacement dans un repère adapté. (c) Création d'une courbe de contour moyen.

On cherche à manipuler un contour moyen pour l'ensemble des scans de quartier d'une même tomate. Les courbes des contours sont ramenées à un nombre constant de points par sous-échantillonnage, puis la moyenne des positions pour chaque point est calculée. On obtient un contour moyen pour une tomate (figure 7.4-c).

### 7.2.4 Interpolation du contour

Plutôt que de manipuler un ensemble de points, nous cherchons à représenter le contour par une fonction plus simple, par exemple un polynôme. Cela nous permettra de calculer les courbures.

La courbe est ensuite paramétrée en  $x$  et en  $y$  en fonction de sa longueur géodésique, calculée à partir des distances entre points successifs. Cette paramétrisation est normalisée

entre 0 et 1. Nous obtenons trois fonctions discrètes  $t(i)$ ,  $x(i)$ ,  $y(i)$ .

Nous interpolons ensuite chacune des fonctions  $x(i)$  et  $y(i)$  par un polynôme de  $t(i)$ . Nous imposons comme contraintes que les premier et dernier points appartiennent à la courbe interpolée, et que la courbe au niveau de l'apex soit perpendiculaire à l'axe principal, afin d'éviter la formation d'un point singulier sur la surface de révolution. Cela nous donne donc deux fonctions  $\tilde{x}(t(i))$  et  $\tilde{y}(t(i))$ . Un polynôme de degré 5 a été utilisé pour chaque contour. La figure 7.5 montre sur un quartier témoin que cette approximation est suffisante.

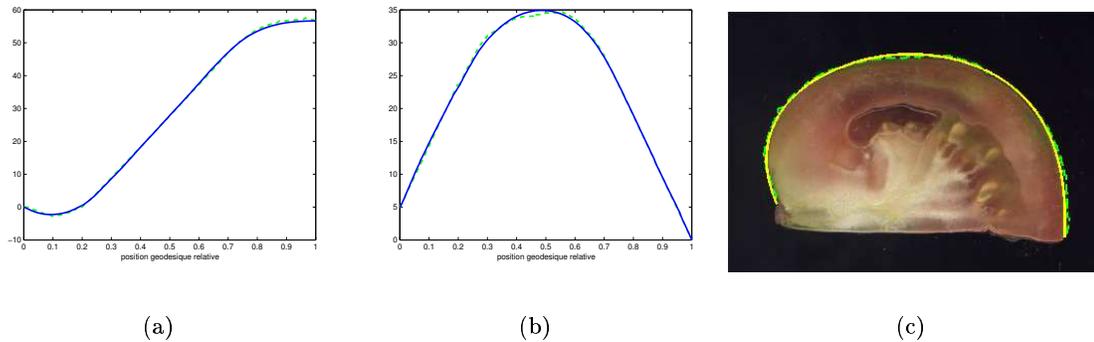


FIG. 7.5 – Approximation d'un contour par une courbe polynomiale. (a) Courbe  $x(t)$  avant et après interpolation. (b) Courbe  $y(t)$  avant et après interpolation. (c) Interpolation 2D et image d'origine.

### 7.2.5 Calcul des courbures principales

À partir de la courbe génératrice  $(\tilde{x}; \tilde{y})$ , nous utilisons un modèle de surface de révolution pour calculer les courbures principales en tout point du péricarpe de tomate (voir la section 4.7). Les courbures calculées pour un quartier type sont montrées sur la figure 7.6.

Dans le cas où les points sont distribués de manière uniforme en fonction de la position géodésique, le modèle de surface de révolution permet aussi de calculer la densité surfacique  $\lambda(m)$  des points d'acquisition à la surface du péricarpe, à partir de la courbe  $\tilde{y}$ .

On calcule ensuite la probabilité d'échantillonnage de chaque point du péricarpe en utilisant l'équation (4.36). La figure 7.7 présente les courbes de niveau de la probabilité d'échantillonnage dans le péricarpe, soit en coordonnées géodésique (distance géodésique + profondeur), soit en coordonnées cartésiennes, en surimpression sur l'image d'origine du péricarpe. La probabilité d'échantillonnage dépend de la profondeur, des deux courbures locales, et de la distance du point d'acquisition à l'axe de révolution de la tomate.

On remarque que quelle que soit la position géodésique, la probabilité d'échantillonnage augmente avec la profondeur. Cette augmentation est plus lente dans les zones équatoriales et apicales du péricarpe, où les courbures sont très faibles (voir la figure 7.6). On observe deux zones où la première courbure principale est un peu plus forte, ce qui se traduit par une augmentation plus rapide de la probabilité d'échantillonnage avec la profondeur. La deuxième courbure principale a une influence plus modérée.

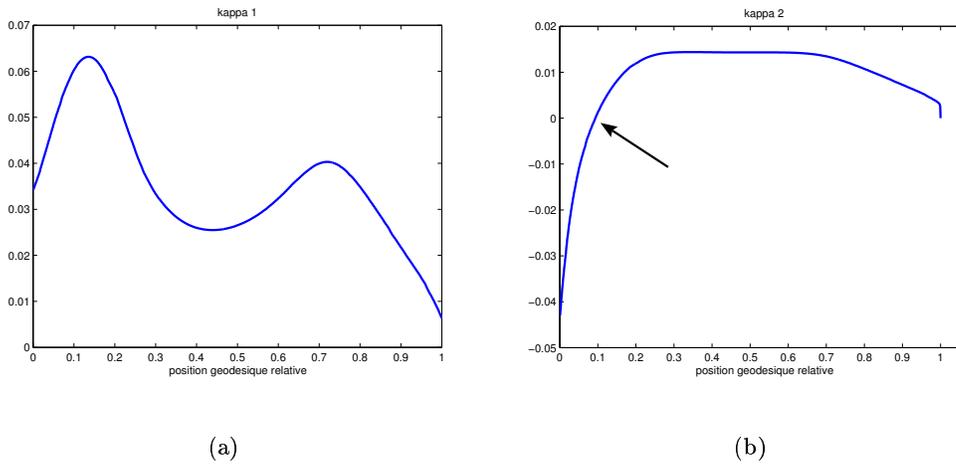


FIG. 7.6 – Courbures principales en fonction de la distance géodésique (depuis la tige, en mm). En (a), la première courbure principale  $\kappa_1$ . En (b), la deuxième courbure principale  $\kappa_2$  (noter l'inversion du signe de la courbure au niveau de la flèche, qui marque le passage au "sommet" de la tomate).

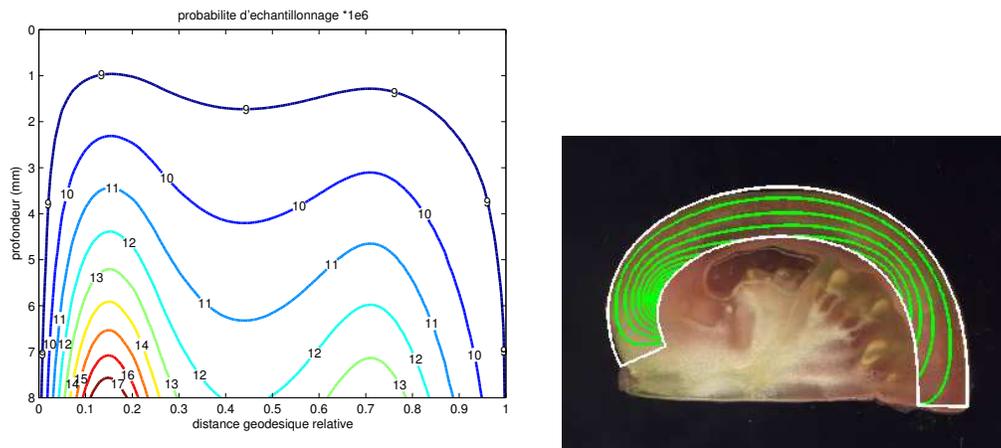


FIG. 7.7 – Calcul de la probabilité d'échantillonnage dans le péricarpe de tomate, pour une distribution uniforme des points d'acquisition à la surface du péricarpe, et une sonde rectangulaire de  $1.2 \times 0.03$  mm. (a) Courbes de probabilités, en fonction de la position géodésique relative et de la profondeur. Les valeurs indiquées sont à diviser par 1 million pour avoir la probabilité d'échantillonnage. (b) Affichage des courbes sur l'image de péricarpe.

Pour la zone du péricarpe la plus courbe (à environ 15% de la position géodésique), la probabilité d'échantillonnage évolue de  $8.4 \cdot 10^{-6}$  (en surface) à  $17.8 \cdot 10^{-6}$  (à 8 mm de profondeur). Pour des tomates aux formes peu arrondies, la probabilité d'échantillonnage peut donc varier du simple au double à l'intérieur d'une même traversée.

## 7.3 Acquisition des images de péricarpe

Le principe du protocole d'échantillonnage a été détaillé dans le chapitre 4. Nous présentons ici son application pratique, ainsi que les étapes permettant d'acquérir une image pour un point d'observation choisi à la surface de la tomate.

### 7.3.1 Choix des points

Pour chaque tomate, 4 points d'acquisition sont choisis à la surface, en choisissant la distance géodésique relative dans l'intervalle  $[0.05; 0.95]$ , de façon à éviter les pôles de la tomate, où les prélèvements sont plus difficiles. La longueur géodésique d'un méridien de la tomate est mesurée à l'aide d'un mètre de couturière, ce qui permet de calculer la position géodésique métrique des traversées. Pour les variétés Cameron et Quest, les positions sont choisies uniformément dans l'intervalle, tandis qu'elles sont choisies de manière systématique pour les lignées DR12 (le premier point est choisi de manière uniforme, les 3 autres points à des positions décalées de 22.5%).

Notons que la mesure de longueur géodésique est une information en soi. Elle nous renseigne sur le calibre général des tomates. Nous comparerons dans le chapitre 8 les différences sur le volume des variétés obtenues par mesure de longueur géodésique, ou par estimation du volume de péricarpe. La position longitudinale est choisie aléatoirement lors de l'acquisition, en essayant de répartir les longitudes uniformément sur le pourtour.

### 7.3.2 Préparation des échantillons

Pour chaque point d'observation, un cylindre de péricarpe est prélevé perpendiculairement à la surface de la tomate en utilisant un emporte-pièce de diamètre 15 mm. Dans le cas où une partie de péricarpe interne est prélevée, elle est ôtée à l'aide d'une lame de rasoir. Ce cylindre est coupé manuellement avec une lame de rasoir, dans le sens perpendiculaire à la surface, en commençant par le péricarpe interne. Pour des raisons pratiques, l'orientation de la coupe est choisie de manière aléatoire.

Des coupes fines sont effectuées sur un des demi-cylindres, soit à la main, soit en utilisant un appareil de type 'microtome' (MICROM, HM 650V), qui consiste en une lame de rasoir vibrant à grande vitesse, et qui produit des coupes d'épaisseur régulières ( $400 \mu\text{m}$ ). Les coupes sont colorées à l'orangé d'acridine. Ce composant fluorescent se fixe sur la paroi des cellules, et permet l'acquisition par microscopie de fluorescence. Les coupes sont rincées à l'eau afin d'enlever le surplus de colorant présent à l'intérieur des cellules.

### 7.3.3 Acquisition par microscopie confocale

Les piles d'images sont acquises au microscope confocal à balayage laser (Zeiss LSM410), au grossissement  $\times 10$ . La longueur d'onde d'excitation est de 364 nm et la lumière réémise est filtrée par un filtre passe-long à 397 nm.

Les images sont de taille  $512 \times 512$ , avec une résolution de  $2.5 \mu\text{m}$  par pixel, ce qui correspond à une zone observée de  $1,28 \times 1,28 \text{ mm}^2$ . Le pas d'échantillonnage en profondeur est toujours choisi égal à l'épaisseur de la coupe optique. L'épaisseur des coupes optiques est fixé à  $5 \mu\text{m}$  pour les tomates Cameron et Quest, et à  $7.5 \mu\text{m}$  pour les tomates de la campagne DR12. Le contraste et la brillance des images sont fixés respectivement à 360 et 9700.

Pour chaque coupe de péricarpe, plusieurs piles d'images sont acquises successivement, en commençant par la cuticule et en direction de l'intérieur du péricarpe, avec un recouvrement d'environ 20 % d'une pile à l'autre. Le nombre de coupes optiques est déterminé en fonction de l'absorption du matériau. Il est en général de l'ordre d'une dizaine de coupes optiques, soit une épaisseur de 50 à  $100 \mu\text{m}$  (figure 7.8).

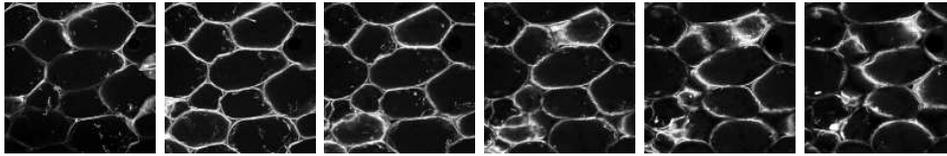


FIG. 7.8 – Succession de coupes optiques de la même pile d'image. L'espace entre les coupes est ici de  $25 \mu\text{m}$  pour mieux montrer la différence en fonction de la profondeur.

### 7.3.4 Collage des images

Pour reconstituer des traversées entières, les piles d'images successives ont été assemblées. Dans notre cas, une traversée fait 6 à 8 mm de long, tandis qu'une pile d'images a une étendue de  $1.28 \times 1.28 \text{ mm}^2$ . La figure 7.9 montre différentes images d'une même profondeur à rassembler.

Nous avons utilisé l'application développée par Fromont (2003). Le logiciel a été développé en C++ et fonctionne sous Windows. Il est séparé en deux parties distinctes : une première partie calcule les vecteurs de translation à appliquer à chaque pile d'image, tandis qu'une seconde partie produit une série d'images résultat (au format bitmap), qui est la réunion des piles d'image d'entrée translatées. Il est possible de spécifier manuellement des paramètres par défaut dans le cas où la valeur de décalage ne peut être trouvée automatiquement. La figure 7.10 montre la série d'images de départ, après reconstitution. Les traversées sont constituées d'environ 8 à 10 piles d'images, mais ce nombre dépend directement de l'épaisseur du péricarpe.

La profondeur visible de péricarpe varie en fonction de la position. Une fois que les images ont été recollées, de nombreuses zones de la pile reconstituée ne contiennent aucune information. De plus, la qualité de certaines coupes profondes est trop mauvaise pour pouvoir être utilisée. Une sélection des coupes optiques utilisables est donc effectuée manuellement sur les images recollées.

Le tableau 7.1 donne les tailles (en pixels) des images 3D reconstituées pour les lignées sauvage et antisens. Les images sont numérotées en fonction de la variété ('cm' ou 'qu') ou en fonction de la lignée ('a' pour antisens, et 'w' pour sauvage). On donne ensuite le numéro de la tomate (un chiffre de 1 à 9, ou une lettre), puis le numéro de la traversée, de 1 à 4.

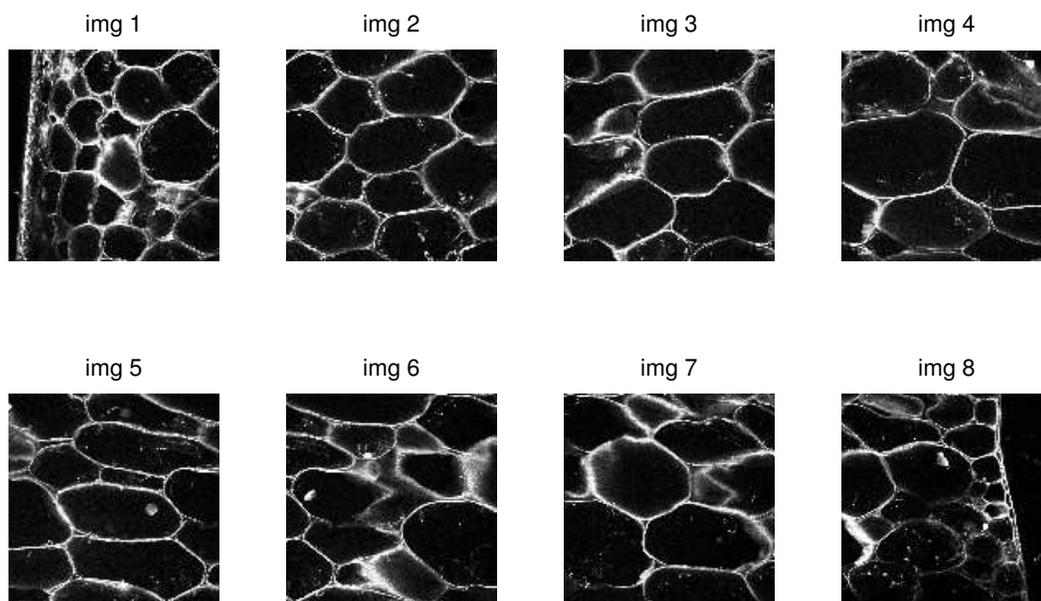


FIG. 7.9 – Différentes images de piles successives, situées à la même profondeur.

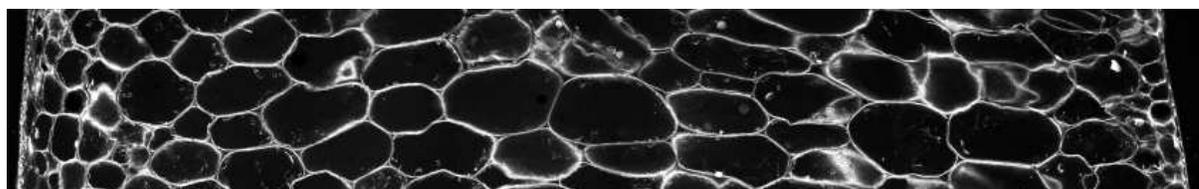


FIG. 7.10 – Images de la séquence précédente après collage.

nom	x	y	z
cm11	2866	512	14
cm12	3472	512	16
cm13	3585	512	24
cm14	4464	512	20
cm21	4772	512	24
cm22	3692	512	14
cm23	3620	512	16
cm24	3593	512	22
qu11	3177	512	22
qu12	2809	512	22
qu13	4053	512	22
qu14	3721	512	14
qu21	3609	512	22
qu22	2864	512	18
qu23	3174	512	22
qu24	2837	512	26

nom	x	y	z
a11	4265	512	9
a12	5632	512	18
a13	3696	512	18
a14	3555	512	12
a31	3242	512	27
a32	4406	512	15
a33	3776	512	15
a34	3233	512	12
a41	3946	512	15
a42	3836	512	21
a43	3476	512	15
a44	4793	512	27
a51	4355	512	15
a52	4998	512	9
a53	4483	512	15
a54	3240	512	33
a61	3897	512	30
a62	3525	512	15
a63	5088	512	21
a64	4895	512	33
a71	3605	512	27
a72	3351	512	33
a73	5003	512	27
a74	3608	512	15
a81	3314	512	30
a82	3654	512	27
a83	3105	512	24
a84	3877	512	15
a85	4640	512	21
a91	4296	512	24
a92	3474	512	21
a93	3607	512	15
a94	5261	512	18
aa1	3920	512	12
aa2	2891	512	30
aa3	3403	512	18
ab1	3725	512	18
ab2	4136	512	21
ab3	4745	512	27
ab4	4745	512	18
ac1	3470	512	27
ac2	3080	512	24
ac3	4247	512	33
ac4	5363	512	24

nom	x	y	z
w11	4827	512	21
w12	2938	512	18
w13	3136	512	18
w14	3025	512	27
w15	3004	512	21
w41	3209	512	33
w42	3487	512	21
w43	3162	512	18
w44	3613	512	36
w51	3504	512	15
w52	2630	512	33
w53	3314	512	24
w54	3924	512	18
w61	2579	512	24
w62	2964	512	30
w63	3482	512	27
w64	2319	512	33
w71	3415	512	18
w72	3999	512	18
w73	2905	512	39
w74	5111	512	24
w81	2721	512	30
w82	4385	512	33
w83	3858	512	24
w84	3696	512	33
w91	4260	512	18
w92	3557	512	21
w93	3048	512	27
w94	2904	512	21
wa1	4833	512	27
wa2	3063	512	27
wa3	3461	512	21
wa4	3062	512	30
wb1	3331	512	21
wb2	4447	512	24
wb3	3489	512	24
wb4	3477	512	24
wc1	4080	512	12
wc2	3108	512	24
wc3	2925	512	27
wc4	3321	512	24

TAB. 7.1 – Taille des images après collage et sélection des coupes optiques utiles. La résolution dans chaque direction est de  $2.5 \mu\text{m}$  par pixel.

### 7.3.5 Exemples d'images reconstituées

La figure 7.11 présente les coupes optiques les plus représentatives des tomates des variétés Cameron et Quest. Les figures 7.12 et 7.13 présentent quelques exemples de coupes optiques pour les lignées Antisens et Sauvage. La cuticule se situe toujours à gauche de l'image.

On constate une hétérogénéité assez forte dans le volume de péricarpe visible. Si la cuticule est en général clairement identifiable, les cellules situées dans les 2-3 premières couches du péricarpe, de petite taille, sont souvent peu contrastées. Les couches du péricarpe situées près du gel (l'endocarpe) sont aussi constituées de petites cellules, mais elles ne sont pas toujours visibles. Il est à noter que certaines traversées ( par exemple cm14, a12 ou wb2) ont été prélevées dans du péricarpe radial, et ont donc été sectionnées à une profondeur correspondant à celle du péricarpe environnant.

On note parfois la présence de faisceaux dans la zone médiane du péricarpe, sous la forme de petites cellules, parfois difficiles à distinguer.

On remarque que la qualité des images n'est pas uniforme. Certaines zones (la fin de cm12, de qu21 ou de w42) sont difficiles à interpréter. On reconnaît globalement la forme générale des cellules, mais leurs limites ne sont pas faciles à définir. Sur d'autres traversées (cm11, w44), on assiste à des phénomènes de dissociation cellulaire, ce qui se traduit par l'apparition de cellules isolées, et d'espaces intercellulaires importants.

Certains défauts de l'acquisition sont visibles. Des cellules apparaissent entièrement colorées en blanc. Nous avons attribué cet effet au fait que le colorant fluorescent restait piégé à l'intérieur des cellules.

## 7.4 Amélioration des images

Avant de reconnaître de manière automatique les différents espaces du péricarpe, il est nécessaire de corriger certains défauts dus à l'acquisition, et d'améliorer la qualité générale des images.

### 7.4.1 Correction de la décroissance lumineuse

En microscopie confocale, une décroissance lumineuse générale est observée en fonction de la profondeur. Les images les plus éloignées de la surface observée sont plus sombres et moins contrastées. Cette hétérogénéité est gênante pour les étapes de segmentation qui suivent et doit être corrigée.

Nous avons utilisé un algorithme développé par (Kervrann et al., 2004), qui modélise la décroissance lumineuse globale entre chaque coupe. La valeur des pixels de chaque profondeur est comparée au modèle de décroissance, et si elle suit le modèle, est corrigée en fonction des paramètres calculés et de la valeur du pixel de la coupe précédente. L'avantage de cette méthode est que les pixels ayant des valeurs aberrantes ne gênent pas la correction des autres pixels. La figure 7.14 montre un résultat de correction obtenu sur une image de péricarpe.

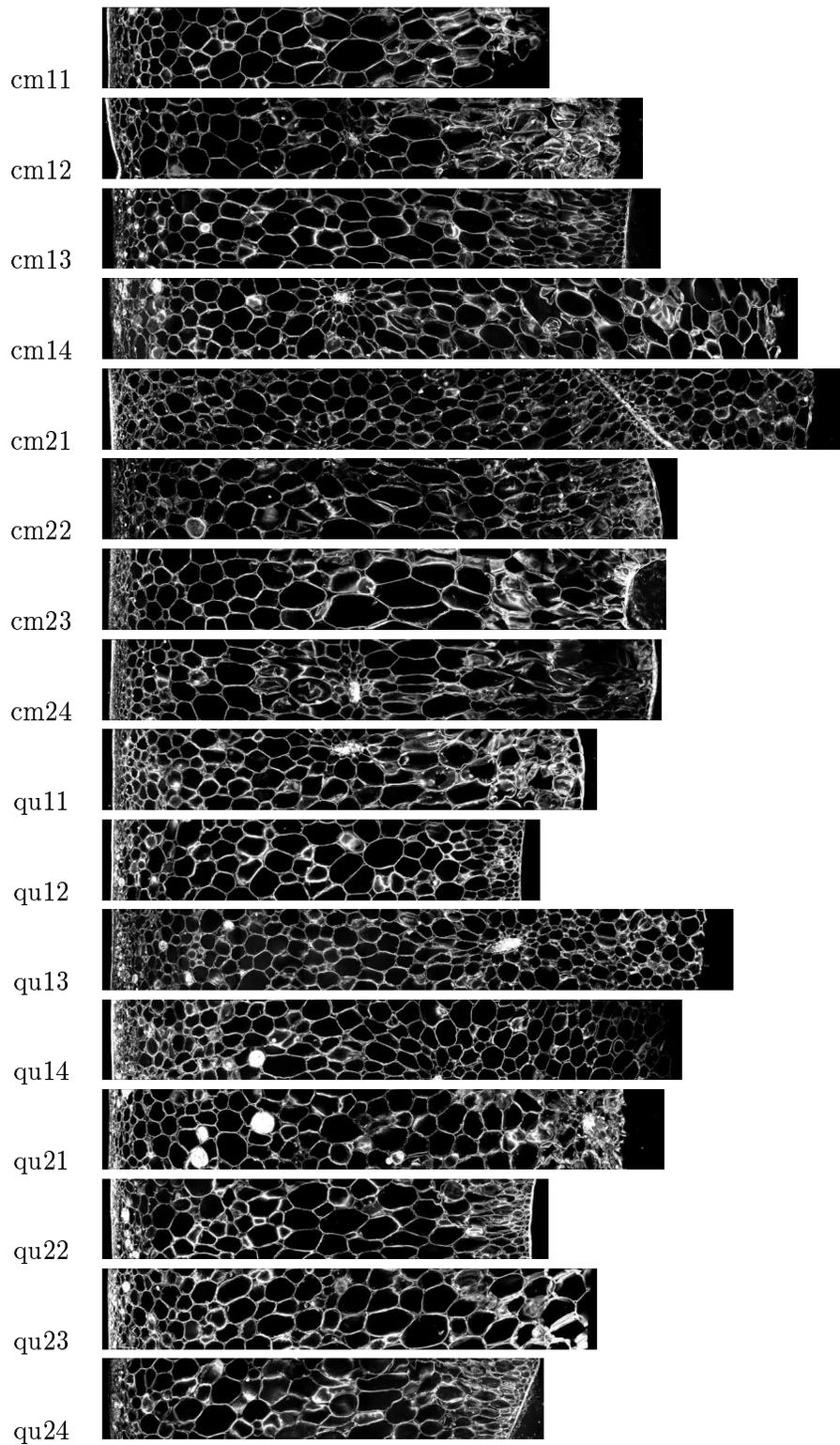


FIG. 7.11 – Coupes médianes des piles d'images des variétés cameron et quest.

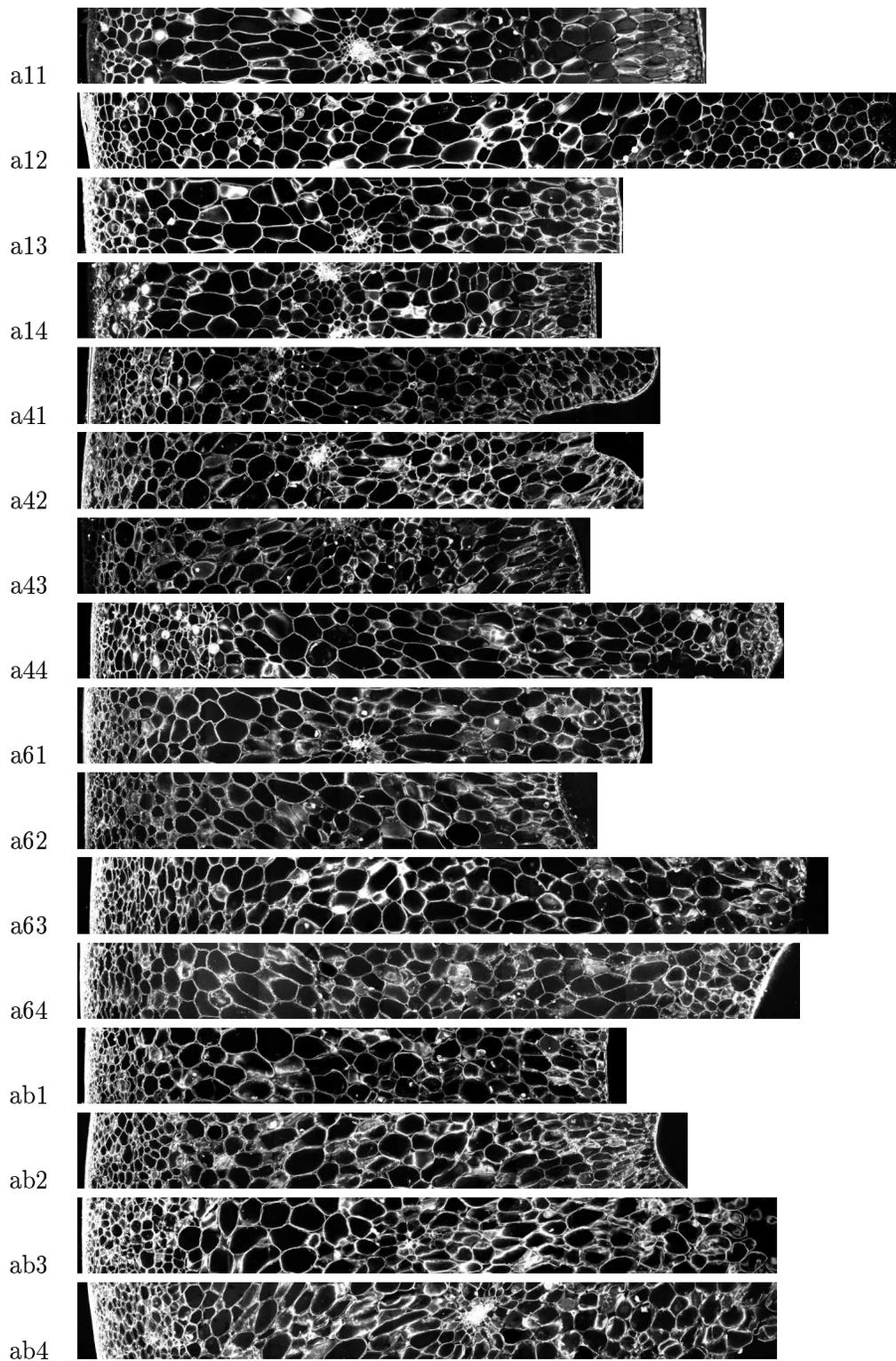


FIG. 7.12 – Coupes médianes des piles d'images de la lignée antisens

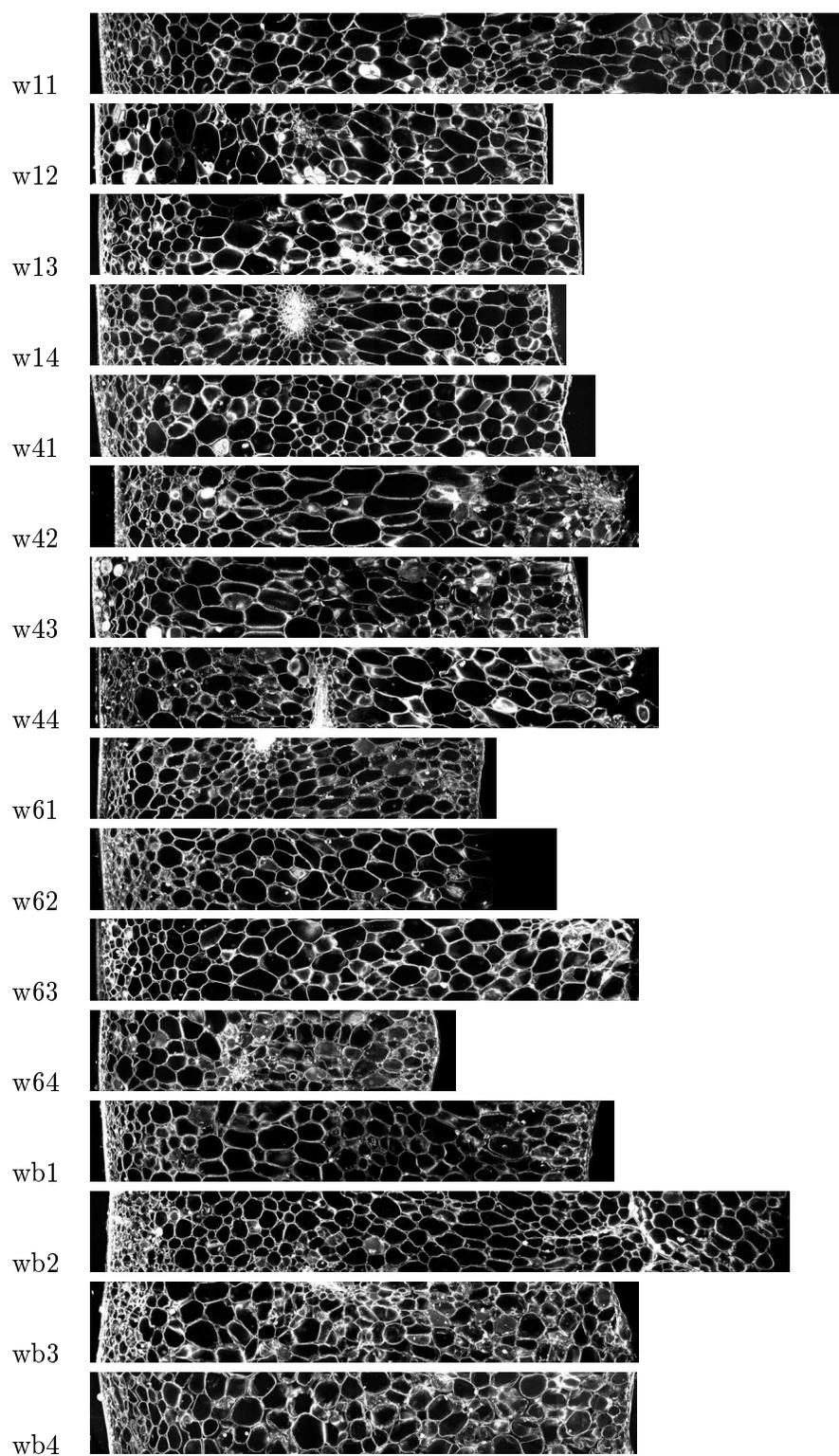


FIG. 7.13 – Coupes médianes des piles d'images de la lignée sauvage

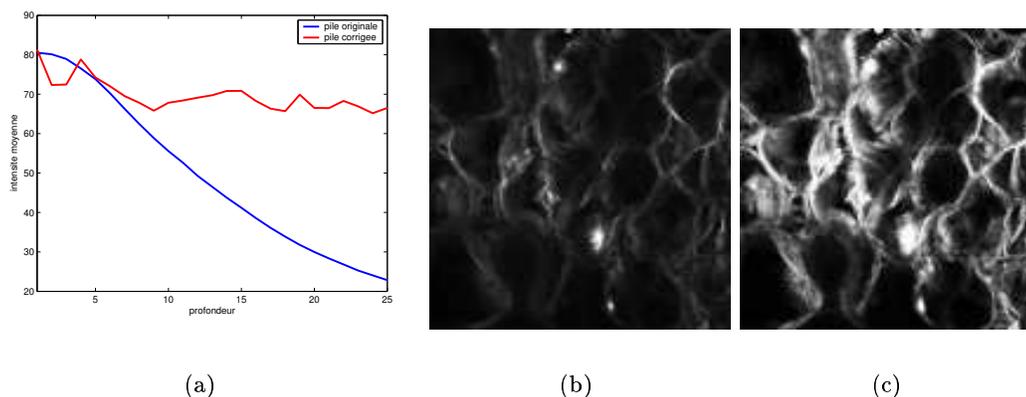


FIG. 7.14 – Correction de la baisse de luminosité en profondeur. (a) Histogramme de la moyenne des niveaux de gris en fonction de la profondeur. (b) Image de la pile non corrigée. (c) Image de la pile corrigée par la méthode de Kervrann et al. (2004).

#### 7.4.2 Amélioration de l'image des parois

L'objectif est de rehausser l'image des parois, tout en lissant l'intérieur des espaces cellulaires et intercellulaires. Le filtre choisi est du type 'max-médian', appliqué sur chaque coupe optique individuellement, en utilisant des voisinages en forme de segments de taille fixe et d'orientation variable. Ce filtre fonctionne en deux étapes (voir par exemple Cocquerez et Philipp (2000)) :

- calcul des valeurs médianes des pixels pour chaque orientation du segment,
- sélection de la valeur maximum obtenue pour les différentes orientations.

Pour notre application, nous avons choisi une taille de voisinage supérieure à 2 fois l'épaisseur visible d'une paroi, soit 25 pixels. Un nombre de directions de 16 a été jugé suffisant pour cette utilisation. La figure 7.15 montre le résultat de ce filtrage sur une coupe optique.

#### 7.4.3 Augmentation du contraste

Le contraste a été amélioré entre les fines zones claires, qui représentent les parois, et les étendues foncées, qui représentent les particules, en utilisant une combinaison de filtres morphologiques. Nous utilisons pour cela deux filtres morphologiques classiques, le filtre 'tophat' (chapeau haut de forme) et le filtre 'bottom hat' (Soille, 2003).

Le filtre chapeau haut de forme est utilisé pour sélectionner les régions claires dont la taille est plus petite que le voisinage défini par l'élément structurant. Le filtre bottom hat sélectionne les régions sombres de petite taille. La combinaison linéaire Image + Tophat – Bottomhat permet d'augmenter le contraste entre les régions claires et foncées. Pour les images de péricarpe de tomate, nous utilisons un élément structurant 3D en forme de pavé, de taille  $31 \times 31 \times 5$  (la taille en  $x$  et  $y$  correspond environ à  $1/10$  de l'image). Cela permet d'accentuer le contraste entre les régions claires et foncées.

Le résultat de ce filtrage est montré sur la figure 7.16, où l'on peut voir l'image résultant du filtrage linéaire, ses deux dérivées tophat et bottomhat, et le résultat de la combinaison

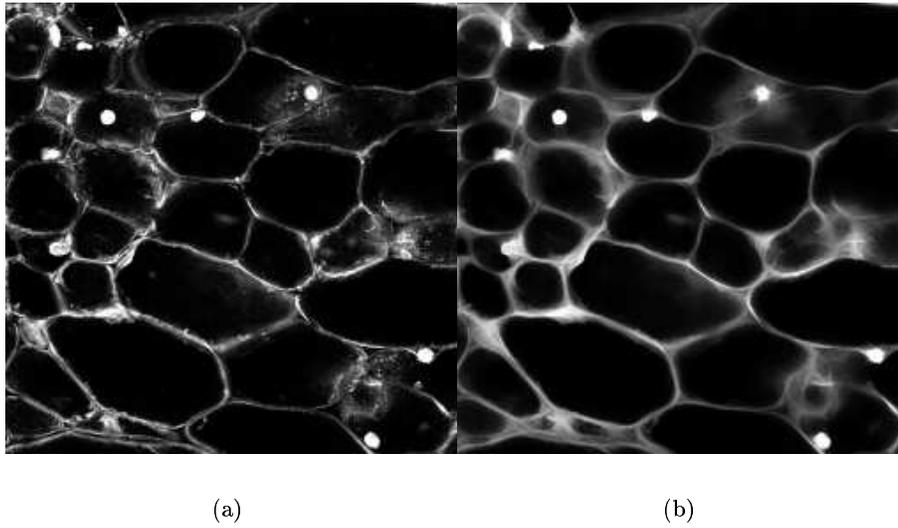


FIG. 7.15 – Résultat du filtre max-médian pour le rehaussement des lignes. (a) Image originale (b) Image rehaussée.

de ces trois images.

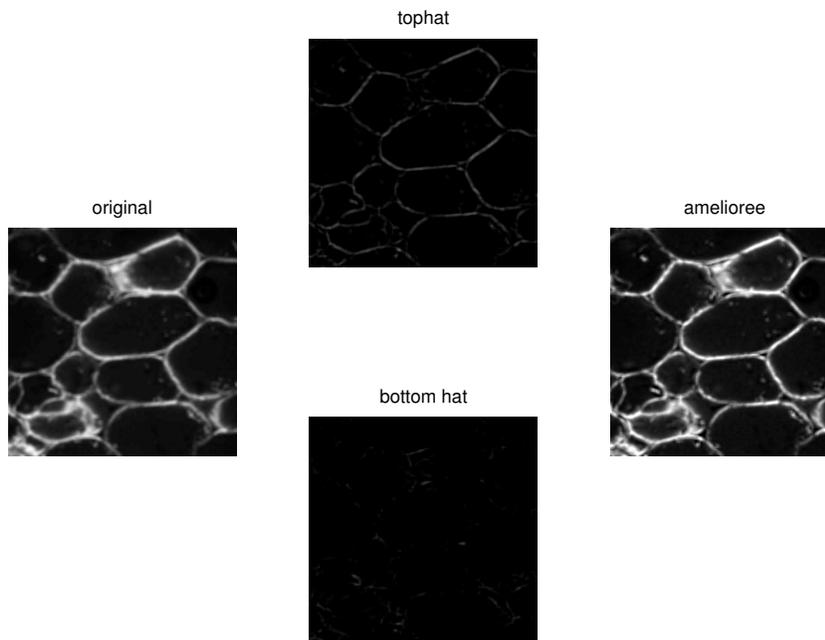


FIG. 7.16 – Amélioration de l'image avec des filtres morphologiques. L'image originale est à gauche, le résultat du top-hat est en haut, et celui du bottom-hat en bas. Le résultat du filtrage (image originale - bottomhat + tophat) est montré à droite.

Nous obtenons au final une image avec des différences plus marquées entre les parois et le centre des particules que dans l'image originale.

## 7.5 Segmentation des particules de péricarpe

Après avoir obtenu une image correcte des parois cellulaires, on veut pouvoir segmenter l'image, afin de reconnaître automatiquement les différentes régions à l'intérieur du péricarpe. Il serait aussi souhaitable de pouvoir différencier les cellules des espaces intercellulaires, mais ce problème est assez délicat dans les images utilisées. Les algorithmes de segmentation peuvent être classés en deux catégories : ceux basés sur la détection des frontières, et ceux basés sur la détection des régions.

Parmi cette deuxième catégorie, la ligne de partage des eaux est particulièrement robuste et généraliste. Cet algorithme de segmentation est issu de la morphologie mathématique, et a été mis au point à la fin des années 70 par Beucher et Lantuéjoul (Beucher et Lantuéjoul, 1979). Sa popularité a permis l'apparition d'implémentations informatiques efficaces (Vincent et Soille, 1991).

La ligne de partage des eaux est souvent utilisée à partir de l'image des contours, obtenue par application d'un filtre de gradient. Dans le cas des particules de tomates, nous appliquons la ligne de partage des eaux directement sur les images. Les fonds de particules correspondent aux minima de l'image, et les parois aux crêtes de l'image.

### 7.5.1 Détection automatique des minima

L'application de la ligne de partage des eaux directement sur une image génère un nombre important de régions très petites. Ce phénomène de sursegmentation est dû à la présence de nombreux minima locaux dans l'image, qui ne correspondent pas forcément aux minima désirés.

Il est donc nécessaire d'imposer à l'image les minima qui seront significatifs pour la détection des particules. Une première possibilité est de pointer manuellement le minima de chaque particule. Mais le grand nombre de particules par image, et la difficulté à manipuler des images en 3 dimensions ne rendent pas cette solution optimale.

Une première détection est faite en utilisant un filtre "h-min" (Soille, 2003). Ce filtre permet de ne garder que les minima qui ont une différence de niveau de gris suffisamment importante par rapport à la crête la plus proche. Dans les images 3D de péricarpe, ces minima correspondent aux fonds de cellules, ou à la présence d'un espace intercellulaire. La figure 7.17-a présente les minima étendus obtenus avec un seuil de 10 (sur 256 valeurs de gris).

Cette première détection peut être améliorée en corrigeant des défauts tels que des parois qui ne se rejoignent pas. Nous utilisons pour cela une ouverture morphologique sur les minima, afin de séparer les minima des particules qui apparaissent comme connectés. Cependant, cette opération a aussi pour effet de supprimer les minima des petites cellules ou des espaces intercellulaires. Pour ne pas perdre cette information, nous procédons à une reconstruction morphologique des minima pour détecter quels sont les minima associés aux petites particules. En combinant ce résultat avec le résultat de l'ouverture, nous obtenons un ensemble de minima qui évite les fusions de cellules tout en gardant les petites cellules (figure 7.17-b). L'élément structurant utilisé est un pavé de taille  $5 \times 5 \times 3$ .

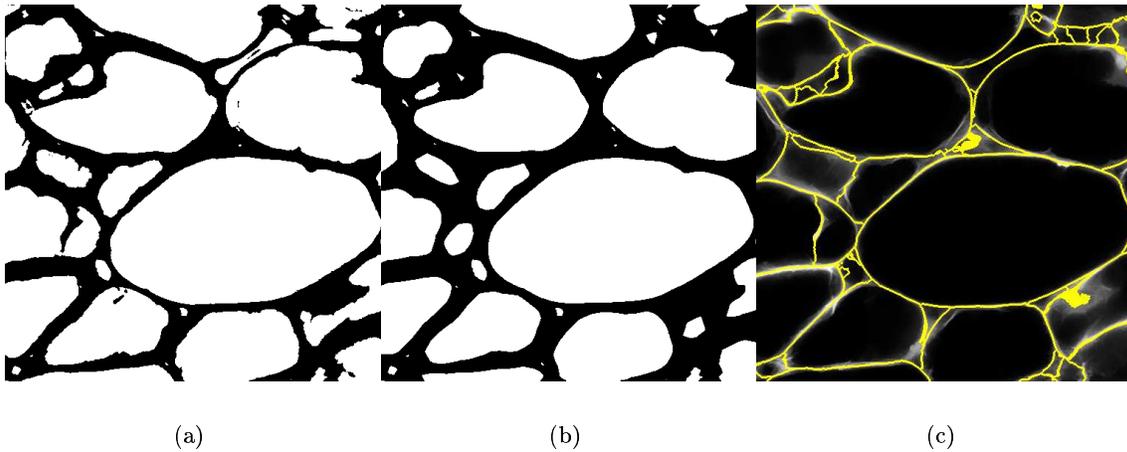


FIG. 7.17 – Différentes étapes de segmentation des particules. (a) Détection des minima. (b) Traitements morphologiques sur les minima (c) Résultat de la ligne de partage des eaux 3D sur l'image d'origine. Ces images correspondent à la 9<sup>ème</sup> coupe optique d'une pile de 14 images.

L'utilisation de ces minima comme marqueurs pour la ligne de partage des eaux permet de segmenter les cellules, ainsi que la plupart des espaces intercellulaires. Les images sont globalement légèrement sursegmentées, dans l'optique d'assurer la détection des contours importants, quitte à rajouter une phase de traitement destinée à regrouper les régions qui appartiennent manifestement aux mêmes particules.

## 7.6 Traitements additionnels

Après l'application de l'algorithme de la ligne de partage des eaux, nous avons rajouté quelques traitements destinés à corriger, de manière automatique, les défauts de segmentation. Un effet inattendu a été observé sur les images 3D segmentées : la caractéristique d'Euler-Poincaré de la structure était nettement inférieure au nombre de bassins, alors que ces deux quantités auraient dû être égales.

La raison de ce problème est que des structures apparemment connexes, si elles sont fines, peuvent être topologiquement équivalentes à des structures trouées. Ce genre de problème n'est pas très facile à voir, mais si on construit un graphe d'adjacence des pixels de l'image, cela apparaît plus clairement (figure 7.18).

Cela est dû au principe de la ligne de partage des eaux. Elle produit un ensemble de régions connexes, mais n'interdit pas la formation de boucles. Or ce phénomène peut être assez courant, particulièrement dans les images 3D.

Une solution simple et empirique consiste à appliquer une ouverture morphologique avec un élément structurant en forme de croix 3D. Cela supprime les structures trop fines, mais garde la forme générale des particules. Certaines particules peuvent se retrouver séparées. Mais cela ne semble concerner que des espaces entre cellules, ce qui n'est a priori pas trop gênant.

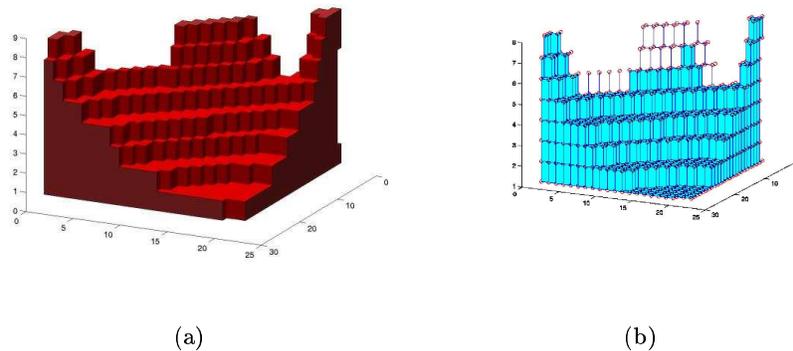


FIG. 7.18 – Problème d'une particule dont la caractéristique d'Euler-Poincaré est égale à -9. (a) Représentation de la particule sous forme de rendu surfacique, chaque pixel étant remplacé par un cube. (b) Représentation du graphe équivalent : un pixel est représenté par un point, deux pixels adjacents par un segment, et 4 pixels adjacents par une face. On distingue les 'anneaux', qui contribuent à la mesure négative.

## 7.7 Exemple d'images segmentées

Nous présentons la segmentation des images présentées dans les figures 7.11 à 7.13. Pour des raisons de clarté, nous ne présentons que la coupe de l'image située au milieu de la pile.

On constate que dans les zones où les cellules sont grandes, la segmentation permet d'identifier la grande majorité des parties connexes de l'image. Peu de cellules sont sous-segmentées, par contre certains espaces intercellulaires sont divisés en plusieurs régions. Certaines régions connexes de la segmentation regroupent une cellule et un ou plusieurs espaces intercellulaires.

Certaines zones dans les traversées posent des problèmes de segmentation. Les cellules situées au niveau de la cuticule sont souvent trop petites pour être segmentées correctement. La segmentation produit cependant un grand nombre de particules dans cette zone, on peut donc supposer qu'il sera possible de caractériser le changement de morphologie par rapport à la zone centrale du péricarpe.

Les nombreuses zones accidentées, situées en général en profondeur dans le péricarpe (cm12, cm24, w42 ou w64, par exemple) donnent des résultats de segmentation assez décevants. Nous utilisons quand même cette information, en postulant que ces zones accidentées peuvent être le résultat d'une évolution des propriétés mécaniques du péricarpe, telle qu'un début de dissociation cellulaire.

De manière générale, si la segmentation permet de trouver les contours de la plupart des grandes cellules, les régions segmentées comprennent aussi des espaces intercellulaires sur-segmentés, et des zones accidentées qu'il est difficile d'interpréter.

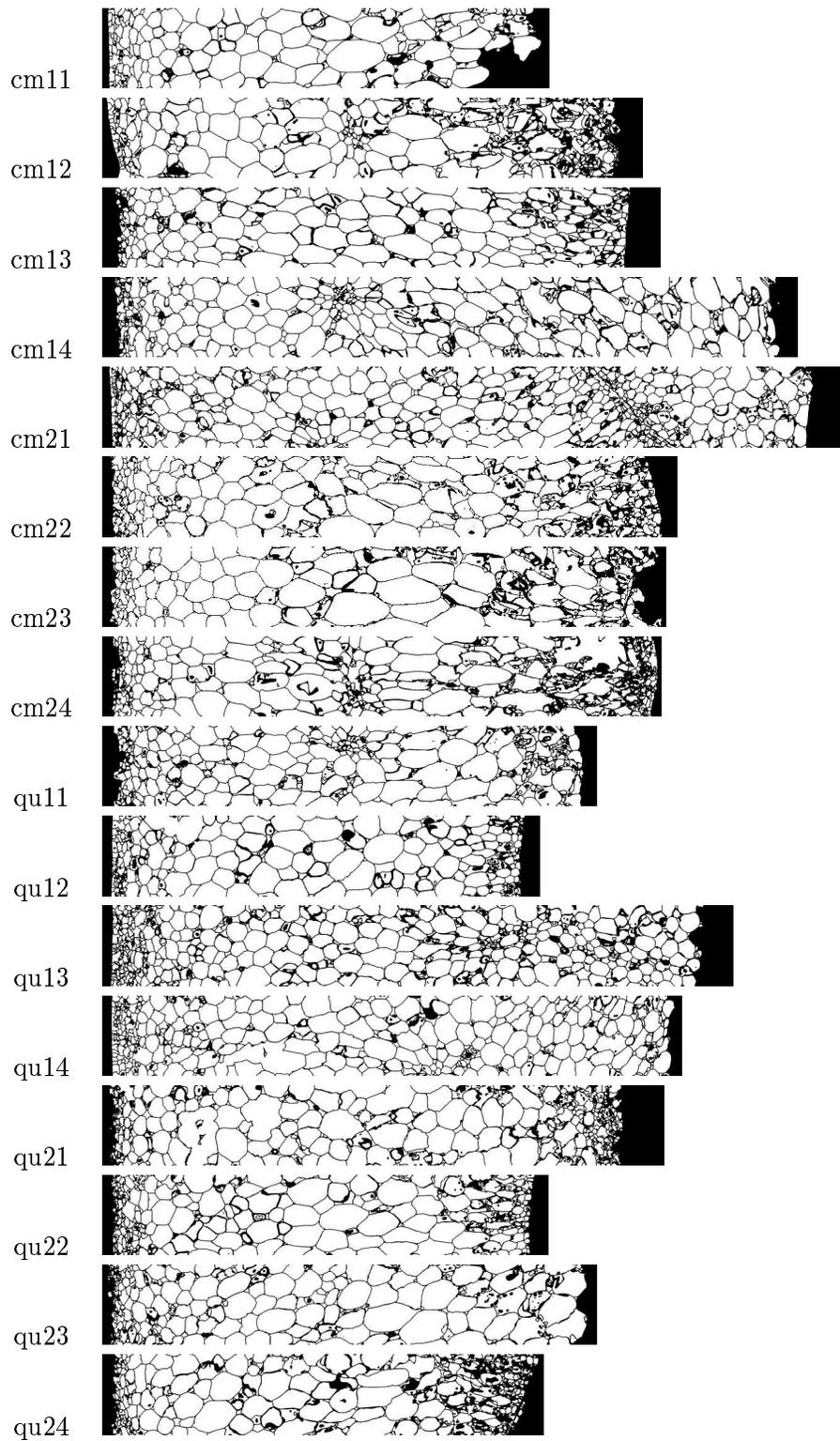


FIG. 7.19 – Coupes médianes des piles d'images segmentées des variétés cameron et quest.

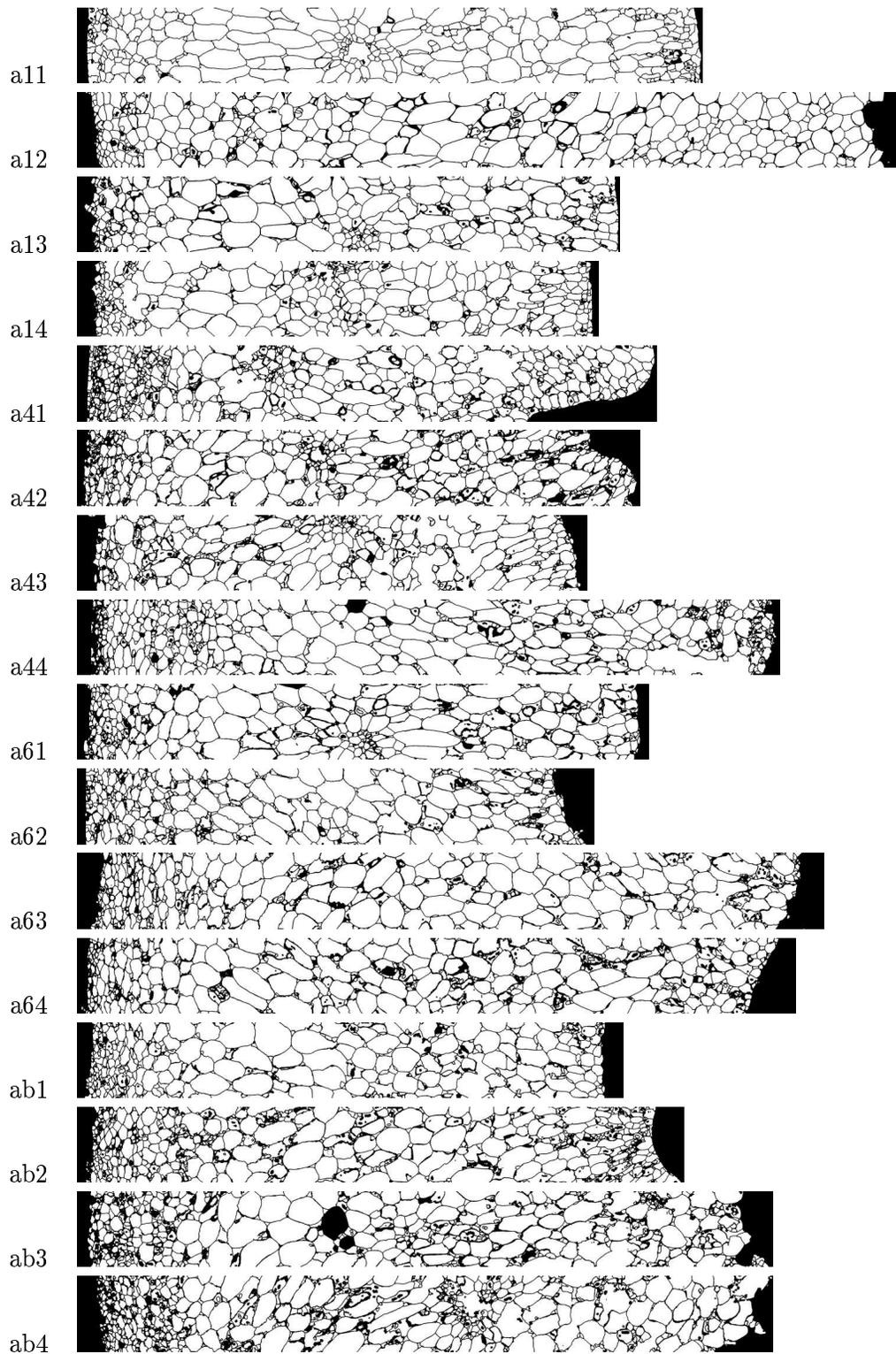


FIG. 7.20 – Coupes médianes des piles d'images segmentées de la lignée antisens

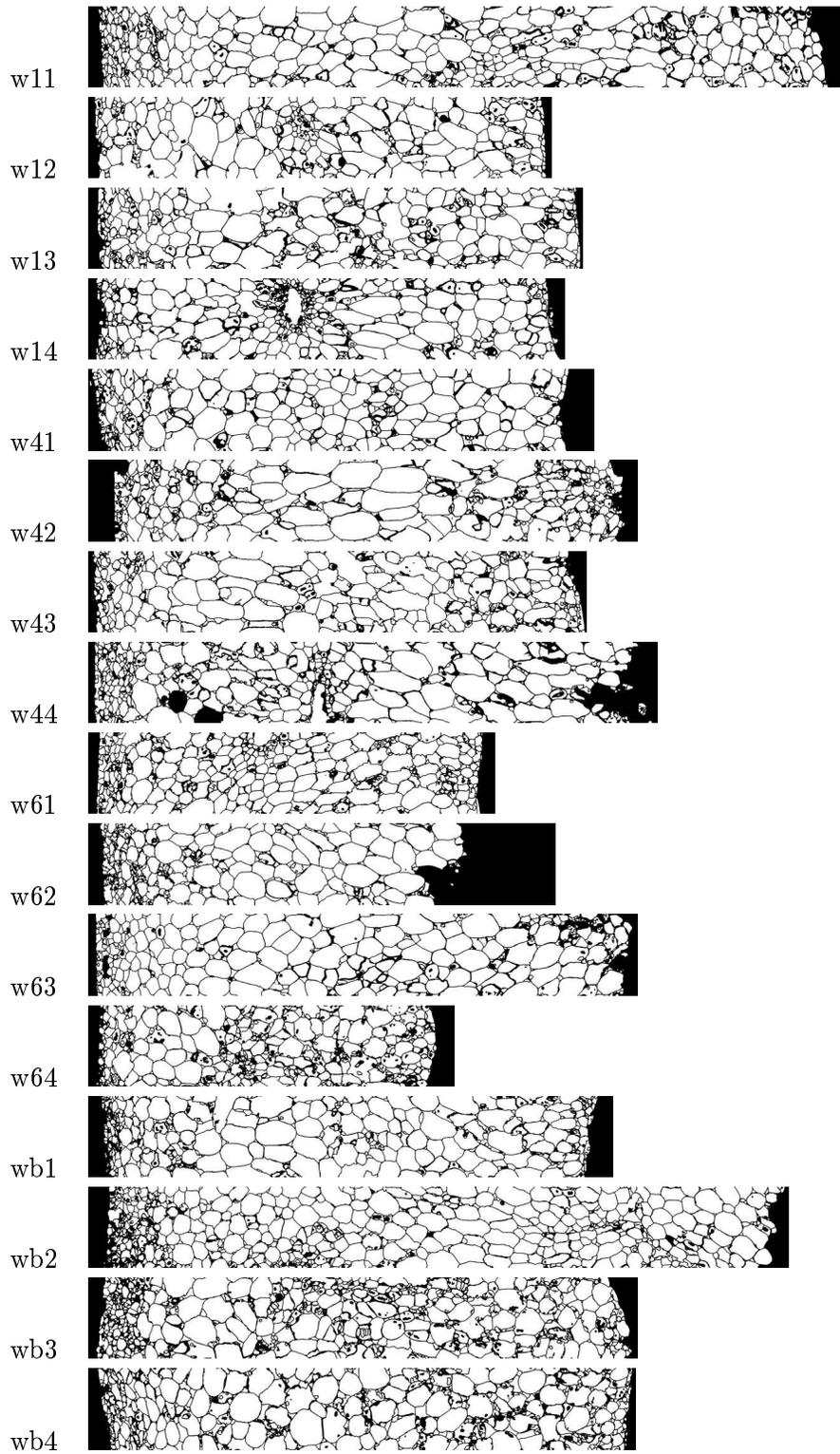


FIG. 7.21 – Coupes médianes des piles d'images segmentées de la lignée sauvage

## 7.8 Extraction des paramètres morphologiques

### 7.8.1 Paramètres globaux

Les images segmentées sont utilisées pour estimer les paramètres géométriques : espérances du volume, de la surface, de l'élongation et la caractéristique d'Euler-Poincaré des particules de chaque variété ou lignée. Chaque paramètre géométrique est estimé par discrétisation des formules (4.1) à (4.4). La discrétisation des relations intégrales pour la surface, l'épaisseur moyenne et la caractéristique d'Euler-Poincaré est donnée par les couples de relations (5.17)-(5.18), (5.21)-(5.22) et (5.15)-(5.16). La formule équivalente pour le volume est directe.

La contribution élémentaire de chaque maille de l'image est calculée pour chaque paramètre en tenant compte des effets de bords. La contribution d'une maille dépend de la configuration des pixels qui la composent, ainsi que de sa position par rapport aux bords de l'image. Nous avons utilisé les 6 plus proches voisins pour estimer la caractéristique d'Euler-Poincaré, et une discrétisation des directions basée sur les trois directions principales pour estimer la surface et l'épaisseur moyenne.

Dans les relations (5.16) à (5.17), on utilise comme fonction de pondération  $\varphi$  la quantité suivante :

$$\varphi(x) = I_{\hat{W}}(x)\mathbb{P}[x \in \hat{W} \mid \mathbf{M}]^{-1}$$

où  $\hat{W}$  est l'ensemble des pixels de la traversée qui ne sont pas situés au bord de l'image.

La probabilité d'échantillonnage  $\mathbb{P}[x \in \hat{W} \mid \mathbf{M}]$  est calculée à partir de la formule (4.36). Les paramètres  $\delta$  et  $f\delta$  qui représentent la taille de la sonde sont déduits de la taille et de la résolution de l'image. La profondeur  $p$  de la maille est obtenue en comptant les pixels qui la séparent de la cuticule, et en tenant compte de la résolution (la position de la cuticule est déterminée visuellement sur chaque image de traversée). Les courbures locales  $\kappa_1$  et  $\kappa_2$  utilisées dans la formule (4.36) sont calculées à partir du modèle de surface de révolution de la tomate, et sont considérées constantes pour une traversée donnée.

Enfin le paramètre  $\lambda(m_0(x))$ , qui correspond à la densité surfacique des points d'acquisition, est calculé grâce à la formule (4.40) pour une surface de révolution, en prenant comme courbe génératrice le contour moyen obtenu par scan des quartiers, et  $N = 4$  traversées par tomate. La position géodésique de chacune des traversées permet de connaître sa distance à l'axe de révolution du péricarpe, et donc la densité surfacique locale  $\lambda(m_0(x))$ .

Pour les tomates Cameron et Quest, les positions géodésiques des traversées sont choisies uniformément et indépendamment. Les contributions des traversées sont identiques en espérance. Pour les tomates DR12, les positions géodésiques sont choisies de manière systématique. On s'attend à ce que les traversées contribuent à l'estimation en fonction du volume de péricarpe qu'elles échantillonnent : la contribution des traversées proches des pôles de la tomate tend à être plus petite que celle des traversées situées près de l'équateur. Ces différences de protocole d'échantillonnage seront prises en compte dans le modèle statistique utilisé pour la comparaison des variétés et des lignées (voir la section 7.8.5).

Pour Cameron et Quest, seules les images acquises à partir des coupes obtenues grâce à un microtome à lame vibrante, c'est-à-dire 8 traversées de chaque variété, ont pu être analysées. Pour la série DR12, les acquisitions ont porté sur 12 tomates de chaque lignée (mutante ou sauvage). Les scans de quartiers ont pu être analysés pour 11 tomates de la lignée antisens et 10 tomates de la lignée sauvage.

### 7.8.2 Paramètres locaux

Afin de caractériser l'hétérogénéité spatiale dans le péricarpe de tomate, les densités relatives à chaque paramètre ont été exprimées afin d'obtenir des profils de densité en fonction de la profondeur dans le péricarpe (distance à la cuticule). On utilise pour cela les estimateurs donnés dans la section 4.2.2, que l'on discrétise suivant les formules (5.15) à (5.21). La densité surfacique sous sa forme fonctionnelle est par exemple estimée par :

$$\hat{S}_V(\varphi) = \sum_p \varphi(p) \mathbb{P}[x_p \in T \mid \mathbf{M}]^{-1} \sum_{y:p(\bar{y})=p} d_S(y)$$

où  $x_p$  est un point quelconque de profondeur  $p$  appartenant à  $T$ , et  $p(\bar{y})$  est la profondeur du centre de la configuration  $y$ . Pour passer à un estimateur sous sa forme ponctuelle, il suffit d'utiliser la relation (3.25), ce qui donne :

$$\hat{S}_V(p) = \mathbb{P}[x_p \in T \mid \mathbf{M}]^{-1} \mathbb{E}[S_{\mathbf{Y}}(p)]^{-1} \sum_{y:p(\bar{y})=p} d_S(y)$$

en estimant  $\mathbb{E}[S_{\mathbf{Y}}(p)]$  grâce au contour moyen de chaque tomate (section 4.7.6).

Pour chaque traversée, nous avons considéré que tous les pixels situés dans le plan perpendiculaire à la direction de traversée étaient situés à la même profondeur. Les contributions des mailles ont été sommées en fonction de leur profondeur, donnant ainsi des estimations du volume, de la surface, de l'épaisseur moyenne des particules et du nombre de particules pour différentes profondeurs dans le péricarpe.

Ces quantités sont ensuite rapportées au volume équivalent de tous les pixels situés à une profondeur donnée. Ce volume est calculé en multipliant la surface équivalente à chaque profondeur choisie (obtenue grâce à la méthode donnée en 4.7.6), par la taille d'un pixel dans la direction radiale. On obtient ainsi des estimations non biaisées des profils de densité volumique, surfacique, d'épaisseur moyenne et numérique, en fonction de la profondeur.

### 7.8.3 Normalisation des profils

La taille des profils de densité de chaque traversée dépend de l'épaisseur locale du péricarpe. Or cette épaisseur est variable d'une traversée à l'autre. La comparaison des profils se heurte à un problème d'hétérogénéité du nombre de points des données.

Afin de pouvoir comparer les profils de densité entre eux, deux types de profils ont été considérés. D'une part des profils normalisés par rapport à l'épaisseur du péricarpe, d'autre part des profils partiels, correspondant à une zone de profondeur constante sous la cuticule.

La zone utile des profils, correspondant à la zone de l'image qui contient effectivement le péricarpe, est d'abord isolée. On recherche pour cela les zones où la densité volumique des particules est supérieure à 10%. On ne garde ensuite pour chaque profil de densité que les profondeurs situées dans cette zone.

Afin de ramener les profils à un nombre identique de points, chaque profil de densité est découpé en  $n$  tronçons d'égale épaisseur. La moyenne de chaque tronçon est calculée pour obtenir  $n$  points dans chaque profil. Chaque point du profil représente un pourcentage fixe de l'épaisseur du péricarpe, et est estimé à partir d'un volume de péricarpe variable. Les différentes valeurs d'un profil sont repérées en fonction de leur profondeur relative, entre 0

(niveau de la cuticule) et 100% de la profondeur du péricarpe. Les profils normalisés ont été obtenus en ramenant le nombre de points des profils à 200, quelle que soit leur longueur.

Le fait d'utiliser une normalisation sur la profondeur peut cependant atténuer certaines différences entre les traversées. En effet, des zones de même épaisseur dans le péricarpe sont représentées par un nombre de points variable dans les profils. En particulier, cela peut gêner la comparaison des lignées sauvage et mutante de DR12 où une différence de division cellulaire a été observée dans les premiers millimètres de profondeur du péricarpe (Jones et al., 2002).

Nous avons donc aussi utilisé des profils tronqués, de manière à ce que chaque point du profil représente la même épaisseur de péricarpe. Pour chaque profil, les 1000 premiers points ont été regroupés en tronçons de 20 points, et moyennés sur chaque tronçon, afin d'obtenir des profils de 50 points. Chaque profil représente donc une zone de 2.5 mm de large, commençant à la cuticule.

Afin de comparer les profils de densité d'une variété à une autre, le profil moyen pour toutes les tomates d'une variété est calculé. On calcule les intervalles de confiance à 95% de chaque point du profil, et on trace les deux courbes correspondantes. Par contre, il ne s'agit pas d'une région de confiance pour le profil.

#### 7.8.4 Analyse des profils de densité

Chaque profil de densité se présente comme une courbe discrète de 200 points dans le cas des profils normalisés, et de 50 points dans le cas des profils tronqués. L'ensemble des profils constitue un tableau de données, dans lequel les individus sont les traversées de péricarpe, et les variables les points des profils. Les tableaux de courbes obtenus pour chaque jeu de données ont été étudiés par analyse en composantes principales normée.

L'objectif de l'analyse en composantes principales est de décrire un tableau de données  $X$  constitué de  $p$  variables observées pour  $n$  individus, en calculant un petit nombre de variables synthétiques non corrélées entre elles et appelées "composantes principales". Ces composantes  $C$  sont des combinaisons linéaires des variables d'origine et décrivent les principales variations observées dans le tableau  $X$ . Le calcul des composantes est basé sur la diagonalisation de la matrice de variance-covariance de  $X$  sous la forme de vecteurs propres orthogonaux  $U$  et de valeurs propres  $L$ . Les vecteurs propres  $U$  sont les coefficients des combinaisons linéaires utilisés pour calculer les composantes principales :

$$C = XU$$

Les valeurs propres  $L$  sont les variances des composantes principales, et permettent d'ordonner les composantes par ordre de variance (également appelée inertie) décroissante. En pratique, les variables du tableau  $X$  sont souvent centrées et normées, et l'analyse est dite normée.

Les valeurs des composantes principales sont utilisées pour tracer des cartes de ressemblances des individus. Les coefficients des vecteurs propres permettent de déterminer la part des variables d'origine dans le calcul des composantes. Lorsque l'analyse est appliquée à un ensemble de courbes, chaque vecteur propre peut être tracé sous la forme d'une courbe. Cette représentation permet d'identifier les régions de la courbe ayant le plus contribué aux composantes.

### 7.8.5 Comparaison des variétés et des lignées

Dans un premier temps les valeurs des données globales  $V$ ,  $S$ ,  $\bar{b}$ ,  $\chi$  ont été comparées par analyse de variance. Les données sont de la forme  $X_{ijk}$ , où  $i$  est la variété ( $i = \{cm, qu\}$  ou  $i = \{a, w\}$ ),  $j$  est le numéro de la tomate ( $j = 1, \dots, 4$  ou  $j = 1, \dots, 20$ ), et  $k$  est le numéro de la traversée dans la tomate ( $k = 1, \dots, 4$ ). Du fait des différences de protocole d'échantillonnage, l'espérance des  $X_{ijk}$  varie en fonction de la traversée pour les données de DR12, mais pas pour les données de Cameron et Quest.

Un modèle linéaire mixte a été utilisé pour la comparaison des lignées DR12 :

$$X_{ijk} = \mu + \alpha_i + T_j + \beta_k + \gamma_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

où  $X_{ijk}$  représente le paramètre géométrique étudié, de moyenne  $\mu$ ,  $\alpha_i$  est l'effet fixe de la lignée  $i$ , et  $\beta_k$  celui de la position géodésique. Le terme  $\gamma_{ik}$  représente l'interaction entre la lignée et la position géodésique, et  $\varepsilon_{ijk}$  est l'erreur résiduelle. On ajoute des contraintes d'identifiabilité sur les effets  $\alpha_i$ ,  $\beta_k$  et  $\gamma_{ik}$ , en imposant que ceux-ci soient centrés.  $T_j$  est un effet aléatoire lié à la tomate, supposé suivre une loi normale de moyenne nulle. L'introduction de l'effet aléatoire permet de prendre en compte des corrélations éventuelles entre les traversées prélevées sur une même tomate. Un modèle similaire, sans l'effet de la position ni des interactions, est utilisé pour la comparaison des variétés Cameron et Quest :

$$X_{ijk} = \mu + \alpha_i + T_j + \varepsilon_{ijk}$$

Les effets principaux et les effets secondaires sont évalués via des tests de Fisher. On notera que l'effet principal de la position géodésique n'est qu'un artefact expérimental, lié au fait que les traversées n'échantillonnent pas le même volume de péricarpe en fonction de leur position.

Pour les profils, on étudie séparément les différentes composantes principales, en se limitant aux 5 premières, qui représentent le plus de variations. Pour chaque composante principale étudiée, on utilise le modèle décrit plus haut en remplaçant  $X_{ijk}$  par la composante considérée.

## Conclusion

Nous avons détaillé dans ce chapitre l'acquisition des images, ainsi que leur traitement. La segmentation 3D des particules du péricarpe se fait ainsi de manière automatique, et peut être généralisée à d'autres types de matériaux cellulaires, et d'autres types d'acquisition.

Le résultat de l'étape de segmentation est une image binaire, sur laquelle nous pouvons appliquer les estimateurs développés dans les chapitres 4 et 5. Nous obtenons ainsi des estimations sans biais des paramètres géométriques globaux (volume, surface, épaisseur moyenne, caractéristique d'Euler-Poincaré, roses des directions), ainsi que des densités de ces paramètres en fonction de la profondeur dans le péricarpe.

Les variations des paramètres géométriques globaux sont analysées afin de chercher une différence due à la lignée ou à la variété, en tenant compte de la variabilité due à la tomate, et de la position géodésique de l'acquisition.

Les profils sont soumis à une analyse en composantes principales normée, afin de mettre en valeur les variations importantes sur les profils. La variance des premières composantes

principales est analysée individuellement de la même manière que pour les paramètres globaux.

L'interprétation de ces résultats fait l'objet du prochain chapitre.



# Chapitre 8

## Analyse des résultats

### Contenu

---

<b>8.1 Variétés Cameron et Quest</b>	<b>141</b>
8.1.1 Caractéristiques géométriques globales	141
8.1.2 Profils de densité	143
8.1.3 Profils moyens de surface	145
8.1.4 Rose des directions 3D	146
8.1.5 Rose des directions 2D	147
<b>8.2 Lignées sauvage et mutante DR12</b>	<b>149</b>
8.2.1 Épaisseur du péricarpe	149
8.2.2 Morphologie des particules du péricarpe	150
8.2.3 Analyse locale des paramètres morphométriques	151
8.2.4 Profils de densité tronqués	155
8.2.5 Utilisation des coupes verticales	159
8.2.6 Roses de direction	160

---



## Introduction

Pour chaque campagne d'acquisition, nous commençons par l'analyse globale du matériau. Nous présentons ensuite les résultats pour l'analyse de l'hétérogénéité spatiale, par la construction de profils de densité. Pour les lignées sauvage et mutante DR12, nous comparons l'estimation de la densité surfacique à partir des images 2D et 3D.

### 8.1 Variétés Cameron et Quest

Pour chacune des variétés Cameron et Quest, 8 observations, réparties sur 2 tomates, étaient exploitables. C'est relativement peu pour obtenir des estimations précises, mais nous pourrions tout de même en tirer quelques interprétations.

#### 8.1.1 Caractéristiques géométriques globales

Nous nous sommes d'abord intéressés aux caractéristiques globales des particules dans le péricarpe : le volume  $V$ , la surface  $S$ , l'épaisseur moyenne  $\bar{b}$ , et le nombre  $N$ . Comme il n'a pas été possible de distinguer de manière fiable les cellules des espaces intercellulaires, la structure observée est l'union de ces deux ensembles, qu'on appelle ici particules.

Les tableaux 8.1 et 8.2 présentent les résultats pour chaque variété. Les observations sont numérotées par variété ('cm' ou 'qu'), par numéro de tomate, puis par numéro de traversée dans le péricarpe. Les analyses de variance sont présentées dans le tableau 8.3.

tomate	$V$ (cm <sup>3</sup> )	$S$ (m <sup>2</sup> )	$b$ (km)	$N$ (millions)
cm 11	58,4	1,6	3,5	-1,5
cm 12	86,8	3,4	10,2	13,4
cm 13	30,2	1,0	2,5	7,0
cm 14	94,0	3,1	7,4	12,1
cm 21	114,0	4,4	11,7	24,1
cm 22	84,3	3,0	7,4	7,3
cm 23	84,3	2,8	6,8	11,0
cm 24	95,2	3,7	10,5	32,3
moyenne	80,8 (9,7)	2,9 (0,45)	7,5 (1,2)	13,2 (3,9)

TAB. 8.1 – Résultats des acquisitions sur la variété Cameron. Chaque valeur est estimée à partir d'une traversée. On donne aussi la moyenne par variété, et l'erreur-type de la moyenne.

##### 8.1.1.1 Volume de péricarpe

La première des caractéristiques estimées est le volume. Les valeurs trouvées oscillent autour de 70 cm<sup>3</sup>. Dans le cas d'une tomate parfaitement sphérique, cela correspondrait à un péricarpe de rayon 3 cm et d'épaisseur 8 mm, c'est donc une valeur tout à fait comparable aux calibres des tomates manipulées.

tomate	$V$ (cm <sup>3</sup> )	$S$ (m <sup>2</sup> )	$b$ (km)	$N$ (millions)
qu 11	59,1	2,1	5,5	8,7
qu 12	2,31	0,7	1,9	3,3
qu 13	44,1	1,9	5,4	13,7
qu 14	70,5	2,3	4,8	-1,6
qu 21	86,5	2,9	8,9	22,8
qu 22	72,7	2,6	8,2	21,0
qu 23	67,9	2,1	5,1	7,1
qu 24	76,3	3,1	10,6	35,9
moyenne	62,6 (7,6)	2,2 (0,27)	6,3 (1,1)	13,8 (4,6)

TAB. 8.2 – Résultats des acquisitions sur la variété Quest. Chaque valeur est estimée à partir d'une traversée. On donne aussi la moyenne par variété, et l'erreur-type de la moyenne.

Aucun effet significatif de la variété n'a pu être mis en évidence. Cependant, le nombre de traversées n'était que de 8 par variété, ce qui est nettement insuffisant par rapport à la variabilité des estimations.

paramètre	$p$ -valeurs (%) variété
$V$	43
$S$	45
$b$	67
$N$	95

TAB. 8.3 – Analyse de variance pour les tomates Cameron et Quest. On donne les  $p$ -valeurs en pourcentage.

### 8.1.1.2 Surface et épaisseur moyenne

La surface des particules dans le péricarpe est une caractéristique plus intéressante. On trouve ici des valeurs de 1 à 4 m<sup>2</sup>, pour une moyenne de 2,5 m<sup>2</sup>. À partir du nombre estimé de particules, on peut calculer le rayon équivalent sphérique moyen d'une particule : on obtient 0,12 mm. C'est une valeur qui semble acceptable, au vu de la taille des cellules et des espaces intercellulaires.

En normalisant l'estimation de surface par le volume de péricarpe estimé pour chaque variété de tomate, on obtient une estimation de la densité surfacique du péricarpe, de 30 à 35 mm<sup>-1</sup>. Elle correspond à la quantité moyenne de parois par unité de volume.

L'épaisseur moyenne est une notion un peu plus difficile à interpréter. On peut la voir comme la somme des diamètres de toutes les particules mises bout à bout, moyennée pour toutes les directions. L'information est une combinaison de la morphologie moyenne des particules et de leur nombre total. On peut suivre la même démarche que pour la surface,

et se ramener au diamètre moyen d'une particule en calculant le rapport  $\bar{b}/N$ . On trouve une valeur d'environ 0,5 mm, soit un rayon équivalent de 0,25 mm. La valeur est plus faible que celle trouvée avec la surface, mais reste plausible. La variabilité de cette mesure d'une traversée à l'autre est importante.

### 8.1.1.3 Nombre de particules

Le dernier paramètre morphométrique décrit est la caractéristique d'Euler-Poincaré des particules. Dans le cas de particules non trouées, cela correspond à une estimation de leur nombre. Il faut noter qu'on n'estime pas seulement le nombre de cellules, mais aussi le nombre d'espaces intercellulaires. Il n'est donc pas surprenant d'obtenir des estimations élevées.

La variabilité de l'estimation est par contre très importante, et les valeurs mesurées sur certaines traversées sont même parfois négatives. La présence de valeur négative est due à la nature de l'estimateur, basé sur la caractéristique d'Euler-Poincaré. En calculant la somme de valeurs qui peuvent être positives et négatives, il n'est pas anormal d'obtenir des valeurs sur-estimées ou sous-estimées, parfois en dehors du domaine de validité au sens biologique. Une autre explication est que les espaces intercellulaires pourraient former un espace connecté, ce qui pourrait introduire une diminution de la caractéristique d'Euler-Poincaré de la structure.

Les valeurs moyennes obtenues sont de l'ordre de 10 à 15 millions de particules. Elles peuvent être comparées avec les valeurs obtenues par cytométrie par N. Bertin, qui sont de l'ordre de 8 à 10 millions (Bertin et al., 2002, 2003) de cellules.

### 8.1.1.4 Synthèse

Nous pouvons caractériser la géométrie globale du péricarpe de tomate pour plusieurs variétés. Nous obtenons pour chaque variété les estimations de quatre caractéristiques géométriques : le volume, la surface, l'épaisseur totale et la caractéristique d'Euler-Poincaré. Ces estimations permettent principalement de valider la démarche, en vérifiant que les estimations du volume et du nombre de particules sont cohérents avec la réalité.

## 8.1.2 Profils de densité

Une observation du péricarpe de tomate montre clairement une hétérogénéité spatiale dans la morphologie cellulaire, due au développement du fruit. Les cellules situées sous la cuticule, ainsi que près du gel, sont plus petites que les cellules du centre du péricarpe. De plus, la présence de faisceaux de cellules introduit une variabilité importante des caractéristiques géométriques du péricarpe. L'étude des profils de densité permet de décrire et quantifier cette hétérogénéité.

Un exemple des profils de densité obtenus sur une traversée de la variété Cameron est montré sur la figure 8.1.

La densité volumique est une notion assez intuitive. Elle n'est pas très informative dans notre cas, car elle est voisine de 1 pour toutes les profondeurs du péricarpe.

La densité de la caractéristique d'Euler-Poincaré, dans le cas de particules non trouées, se ramène à la densité numérique des particules par unité de volume. Elle est donc facile à interpréter d'un point de vue biologique. Comme pour les valeurs globales, les profils de

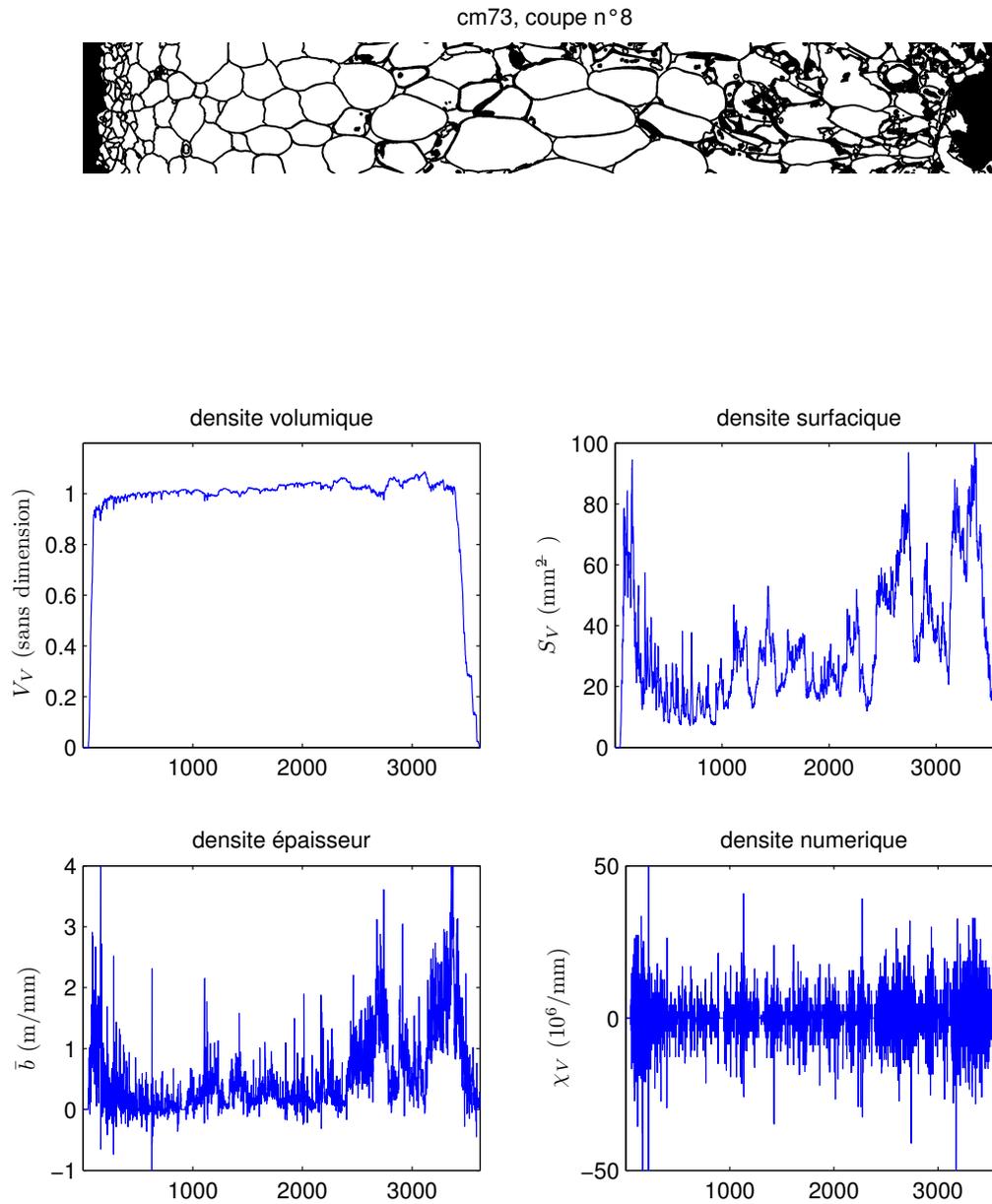


FIG. 8.1 – Profil de densité. Résultat de la segmentation (la coupe optique centrale), et profils des densités volumiques, surfacique, de l'élongation moyenne, et de la caractéristique d'Euler-Poincaré estimées à partir de la pile. L'axe des abscisses correspond à la profondeur en pixel (1 pixel =  $2.5 \mu\text{m}$ ).

densité numérique ont une variabilité plus importante rendant leur allure très bruitée. Leur interprétation par rapport à la profondeur du péricarpe n'est pas possible de ce fait.

Les deux autres profils concernent les densités de surface et d'épaisseur moyenne des particules. Nous nous intéressons particulièrement aux profils de surface. D'une part ils représentent une bonne estimation de la quantité de paroi à une profondeur donnée, qui est une information importante. D'autre part ces profils présentent moins de variabilité que les profils de densité d'épaisseur moyenne ou de densité numérique, ce qui les rend plus facilement exploitables.

### 8.1.3 Profils moyens de surface

La figure 8.2 montre les profils moyens de densité surfacique, obtenus en ramenant les profils normalisés à 200 points pour tous les profils. On observe un pic marqué de densité surfacique juste sous la cuticule. La figure 7.11 montre en effet que toutes les traversées des deux variétés ont une région de petites particules sous la cuticule. La taille relative de cette région semble identique d'une variété à l'autre. Après une valeur plateau entre 25 et 50-75 % du profil, la densité surfacique augmente jusqu'à l'épiderme interne.

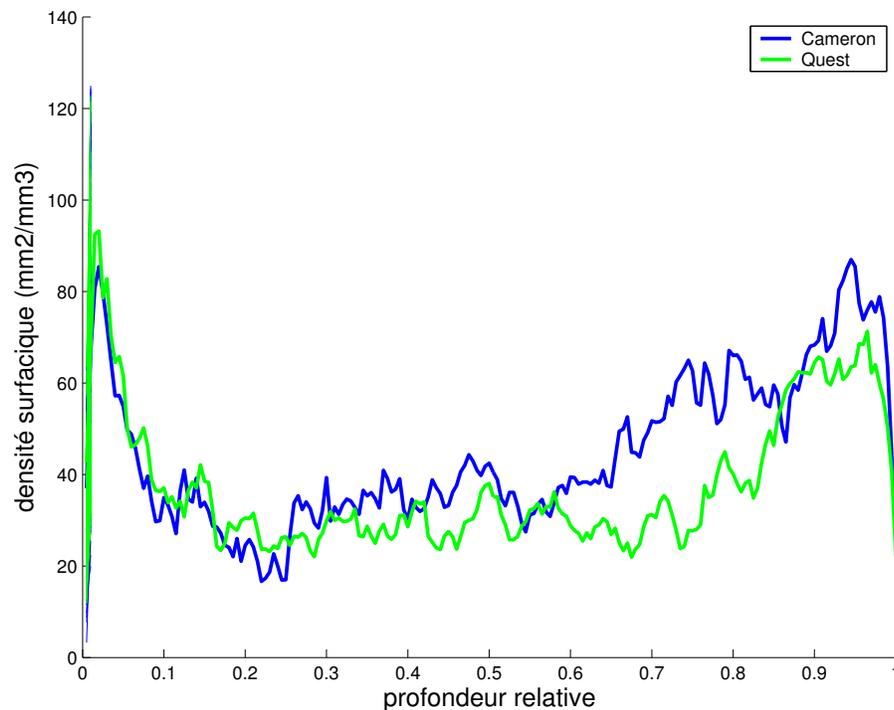


FIG. 8.2 – Profils moyens de densité surfacique (Cameron et Quest). Chaque profil est entouré d'une courbe formée par les intervalles de confiance à 95% de chaque point du profil.

Une différence est observée dans les profils moyens au niveau du dernier tiers du profil. Nous nous sommes intéressés à l'analyse de ces profils par analyse en composantes principales.

Nous avons recherché les différences significatives par une analyse de variance sur les dix premières coordonnées de cette base (le tableau 8.4 présente les 5 premières). Les pourcentages d'inertie associés à chaque composante sont faible du fait de la nature très bruitée des profils.

comp.	inertie (%)	$p$ -valeurs (%)
1	18.7	13.5
2	15.0	12.9
3	12.2	85.9
4	8.2	49.3
5	7.3	62.3

TAB. 8.4 – Analyse de variance pour les profils de densité surfacique des variétés Cameron et Quest. On donne les  $p$ -valeurs en pourcentage.

Aucun effet significatif n'apparaît sur les premières composantes principale. Les profils des premiers vecteurs propres correspondants sont très bruités (Figure 8.3). Une différence apparaît vers la fin du profil du deuxième vecteur propre. Une interprétation possible est que cette différence est due à la qualité de la segmentation dans la région profonde du péricarpe.

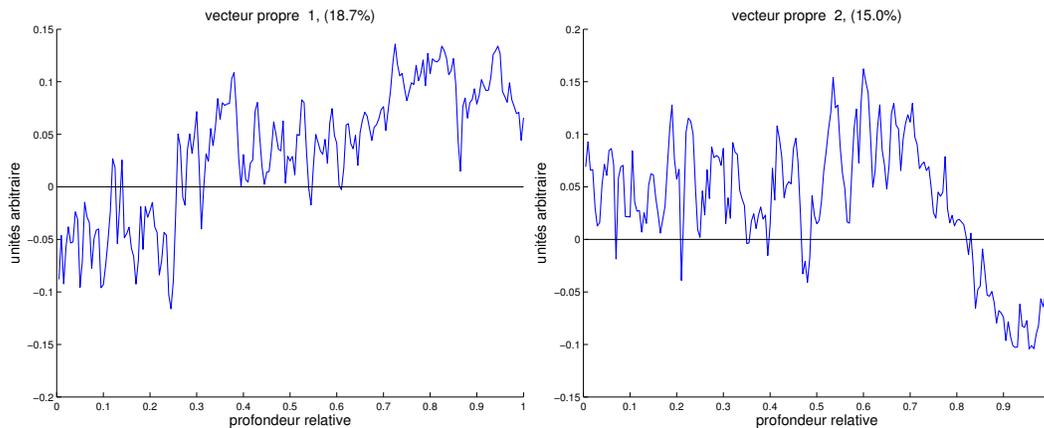


FIG. 8.3 – Les deux premiers vecteurs propres des profils de densité surfacique.

### 8.1.4 Rose des directions 3D

L'estimation de la mesure directionnelle sur les images en 3 dimensions a d'abord été effectuée sur les images segmentées, sans tenir compte de la probabilité d'échantillonnage, afin de vérifier la validité des mesures. Or, un effet surprenant est apparu : les deux directions perpendiculaires au plan des coupes optiques présentent une mesure directionnelle beaucoup plus importante que les autres.

L'explication d'un biais dû à la faible épaisseur des images est rapidement invalidée en simulant une structure aléatoire isotrope (en l'occurrence, un modèle booléen avec des

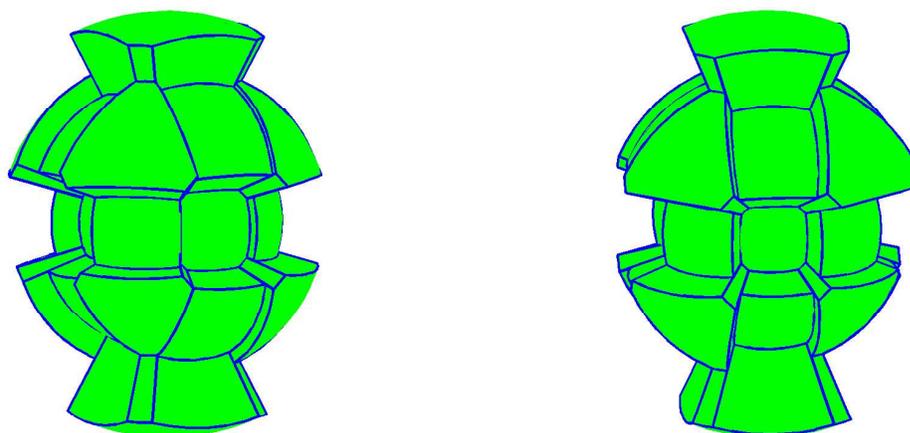


FIG. 8.4 – Rose des directions 3D d'une traversée de péricarpe, représentée sous deux angles de vue. Le volume d'un secteur angulaire est proportionnel à la mesure directionnelle dans la direction correspondante.

grains sphériques), discrétisée, et observée sur un faible nombre de coupes. Les estimations effectuées montrent que la rose des directions est sans biais même si on ne dispose que de quelques coupes optiques.

Nous interprétons donc cet effet comme un biais dû à la technique d'observation. Une cause possible pourrait être l'écrasement de la coupe de péricarpe entre les lamelles du microscope. Cet artefact de l'acquisition pose un problème pour l'analyse : la rose des directions observée peut très difficilement être reliée à la rose des directions de la structure.

### 8.1.5 Rose des directions 2D

La rose des directions en 3 dimensions ne pouvant être analysée, nous avons travaillé sur la mesure directionnelle dans le plan. Les coupes ont été extraites des images 3D, et filtrées par ouverture puis fermeture morphologique afin de réduire la granularité des frontières. L'élément structurant utilisé était un disque de rayon 2 pixels. Les mesures directionnelles ont été effectuées en utilisant des configurations de  $3 \times 3$  pixels, ce qui conduit à des mesures dans 16 directions.

Les mesures sont représentées en utilisant le zonoïde équivalent, et une mesure moyenne est calculée pour chaque variété (figure 8.5-a). En comparant les zonoïdes des deux variétés, on constate une différence de forme générale : la variété Cameron semble plus allongée selon l'axe radial que la variété Quest, qui est plus ronde. Cela est effectivement visible sur certaines images des coupes optiques (voir la figure 8.6). Des analyses de variance sur les valeurs des roses n'ont cependant pas permis de déceler de différence significative entre les variétés.

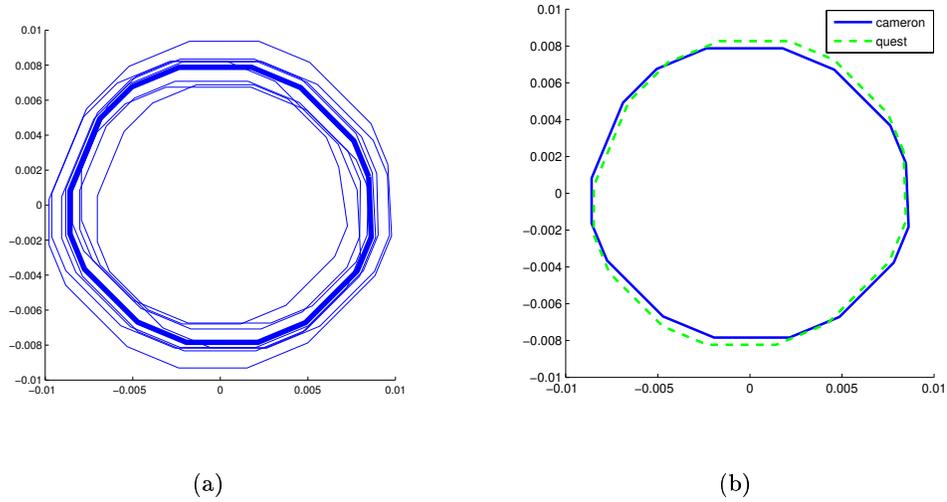


FIG. 8.5 – Rose des directions mesurée sur des coupes planes. L'axe horizontal correspond à la direction radiale dans le péricarpe, l'axe vertical à une direction parallèle à la cuticule. (a) Toutes les mesures directionnelles effectuées sur les images de la variété 'Cameron'. Le zonoïde équivalent est légèrement aplati. (b) Comparaison des zonoïdes moyens des variétés 'Cameron' et 'Quest'.

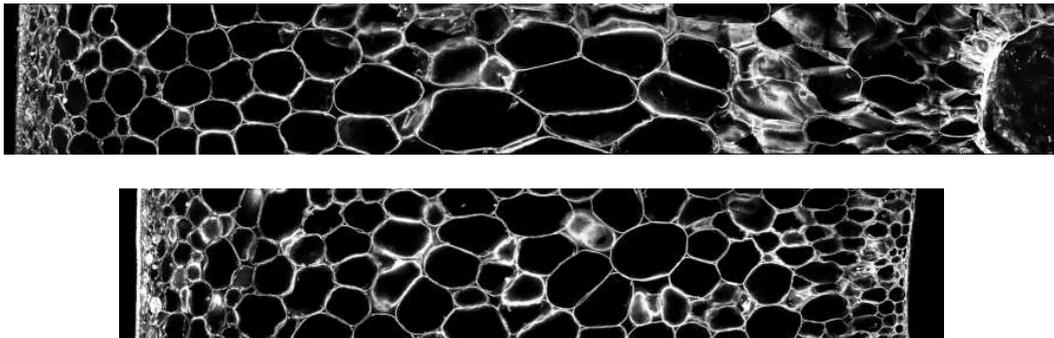


FIG. 8.6 – Deux coupes optiques fortement contrastées au niveau de l'orientation des cellules. En haut, une image de la variété Cameron, en bas, une image de la variété Quest.

## 8.2 Lignées sauvage et mutante DR12

Pour les lignées sauvage et mutante de DR12, nous nous intéressons d'abord à la morphologie globale du péricarpe, puis aux paramètres morphométriques globaux des particules du péricarpe pour les deux lignées. Nous étudions ensuite les profils de densité en fonction de la profondeur, soit normalisés par rapport au péricarpe, soit dans une zone d'épaisseur fixe. Nous nous intéressons ensuite à la possibilité d'utiliser des coupes verticales planes à la place des acquisitions 3D, et terminons par la détermination des roses des directions des lignées.

### 8.2.1 Épaisseur du péricarpe

Sur les images de quartier, on remarque que le péricarpe semble plus épais près des pôles de la tomate, et plus fin dans la zone équatoriale. Afin d'étudier cet effet, nous avons effectué une analyse sur l'épaisseur du péricarpe. La longueur de péricarpe visible a été mesurée sur chaque image de traversée 3D. Nous avons cherché l'influence de la lignée, et de la position géodésique, qui a été répartie en dix classes également distribuées le long du méridien.

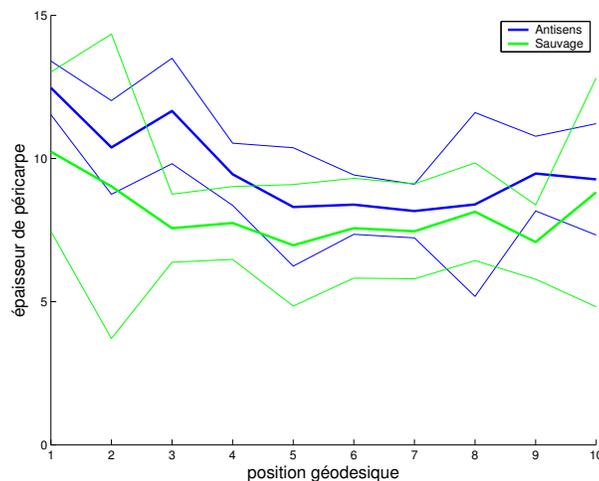


FIG. 8.7 – Influence de la position géodésique sur l'épaisseur du péricarpe. La position est divisée en 10 classes le long du méridien. Chaque profil d'épaisseur est entouré par une courbe formée par les intervalles de confiance à 95% de chaque point.

Une analyse de variance basé sur le modèle décrit en 7.8.5 permet de mettre en évidence une différence significative de l'épaisseur en fonction de la position géodésique des traversées ( $p$ -valeur  $< 0.1\%$ ). Le péricarpe est effectivement plus épais près du pédoncule, plus fin dans la zone équatoriale, et d'épaisseur intermédiaire dans la zone apicale (voir la figure 8.7). On remarque aussi un effet de la variété ( $p$ -valeur  $< 1\%$ ) : le péricarpe est plus épais chez la lignée antisens. Par contre, aucune interaction entre la lignée et la position n'a été mise en évidence. Le péricarpe est plus épais chez antisens, mais la différence d'épaisseur par rapport à la lignée sauvage ne dépend pas de la position.

paramètre	p-valeurs (%)		
	variété	position	inter.
épaisseur	< 1 **	< 0,1 ***	23,1

TAB. 8.5 – Analyse de variance pour les épaisseurs de péricarpe des tomates DR12. On donne les  $p$ -valeurs en pourcentage. \* :  $p < 5\%$ , \*\* :  $p < 1\%$ , \*\*\* :  $p < 0.1\%$ .

Afin de savoir si la différence d'épaisseur était lié à la taille globale des fruits, nous avons aussi étudié les diamètres géodésiques mesurés sur les tomates. Celui-ci est égal à 20,2 mm en moyenne pour la lignée sauvage (intervalle de confiance : de 19,5 à 22,1 mm), et de 20,8 mm pour la lignée antisens (intervalle de confiance : de 19,2 à 21,2 mm). Aucun effet significatif de la lignée n'a été trouvé ( $p$ -valeur égale à 43%). Le calibre étant équivalent pour chaque lignée, on en déduit que le péricarpe est plus épais pour la lignée antisens. Cela peut effectivement se vérifier visuellement sur quelques coupes de quartiers des deux lignées (figure 8.8).

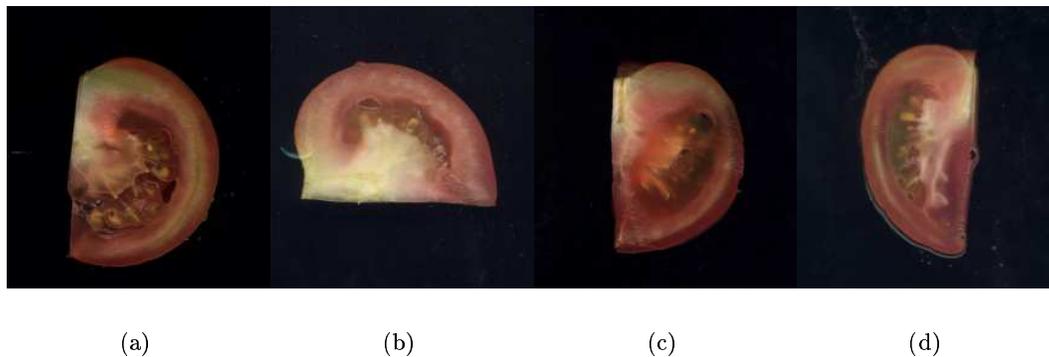


FIG. 8.8 – Coupes de quartiers des lignées antisens et sauvage. L'épaisseur du péricarpe est plus importante chez la lignées antisens (a) et (b) que chez la lignée sauvage (c) et (d).

### 8.2.2 Morphologie des particules du péricarpe

Les résultats des estimations de la géométrie des particules du péricarpe sont résumés dans le tableau 8.6.

Les estimations de volume, surface et épaisseur moyennes sont voisines de celles des variétés Cameron et Quest. Le volume de péricarpe est d'environ  $70 \text{ cm}^3$ , la surface des particules de  $2,5 \text{ m}^2$ , et l'épaisseur moyenne de 7-7,5 km. Les estimations de nombre de particules sont par contre nettement plus élevées. L'acquisition des images étant légèrement différente pour les deux campagnes d'acquisitions (au niveau de l'espace entre les coupes optiques), il est difficile de savoir si la différence provient des variétés ou de la phase de traitement.

Les analyses de variance sur chaque paramètre géométrique ont été effectuées en utilisant le modèle décrit en section 7.8.5. On remarque que comme il était attendu, l'effet de la

lignée	$V$ (cm <sup>3</sup> )	$S$ (m <sup>2</sup> )	$\bar{b}$ (km)	$N$ (millions)
Antisens	74,7 (4,3)	2,94 (0,20)	8,8 (0,7)	32,9 (3,7)
Sauvage	59,0 (3,1)	2,31 (0,12)	6,9 (0,4)	24,7 (2,0)

TAB. 8.6 – Résultats des valeurs moyennes pour les lignées antisens et sauvage de DR12. Les valeurs entre parenthèses indiquent l'écart type de la moyenne.

paramètre	$p$ -valeurs (%)		
	variété	position	inter.
$V$	0,4 **	< 0,1 ***	53,6
$S$	0,4 **	< 0,1 ***	20,2
$\bar{b}$	2,4 *	< 0,1 ***	14,2
$N$	10,1	< 0,1 ***	7,4

TAB. 8.7 – Résultats de l'analyse de variance pour les propriétés géométriques globales des péricarpes de la campagne DR12. On donne les  $p$ -valeurs en pourcentage. \* :  $p < 5\%$  , \*\* :  $p < 1\%$  , \*\*\* :  $p < 0.1\%$ .

position est particulièrement significatif.

Pour le volume, nous avons trouvé un effet très significatif ( $p$ -valeur < 1%) de la variété : le péricarpe des tomates antisens a un volume plus important. On retrouve bien ici le fait que le péricarpe de la lignée antisens soit plus épais.

On remarque aussi des différences significatives pour la surface  $S$  et l'épaisseur moyenne  $\bar{b}$  des particules du péricarpe : elles sont plus élevées pour la lignée antisens. Il est pertinent de savoir si l'augmentation de ces deux paramètres chez antisens est dû à l'augmentation du volume, ou à une augmentation de la densité surfacique, ou d'épaisseur des particules. Une analyse des rapports  $S/V$ ,  $\bar{b}/V$ ,  $\chi/V$  n'a mis en évidence aucun effet significatif de la lignée. L'augmentation de la surface et de l'épaisseur moyenne est donc une conséquence de l'augmentation du volume.

Afin de s'affranchir de l'effet de la position géodésique, nous avons aussi comparé les estimations sommées pour chaque tomate. On retrouve un effet significatif ( $p$ -valeur < 1%) de la lignée pour le volume et la surface, et peu significatif ( $p$ -valeur = 7%) pour l'épaisseur moyenne, ce qui est cohérent avec l'analyse sur les traversées.

Au niveau global, le péricarpe est donc plus épais chez la lignée antisens, mais il n'y a pas de différence au niveau de la morphologie globale des particules.

### 8.2.3 Analyse locale des paramètres morphométriques

La variété antisens a été décrite comme ayant une division cellulaire qui continue pendant la maturation. Cette division cellulaire se produit dans la zone de péricarpe localisée sous la cuticule. Des observations visuelles de coupes faites en microscopie optique (figure 8.9) ne permettent pas de déceler de manière nette des différences, mais l'étude des profils

devrait permettre de confirmer ou d'infirmar la modification de structure engendrée par cette division cellulaire.

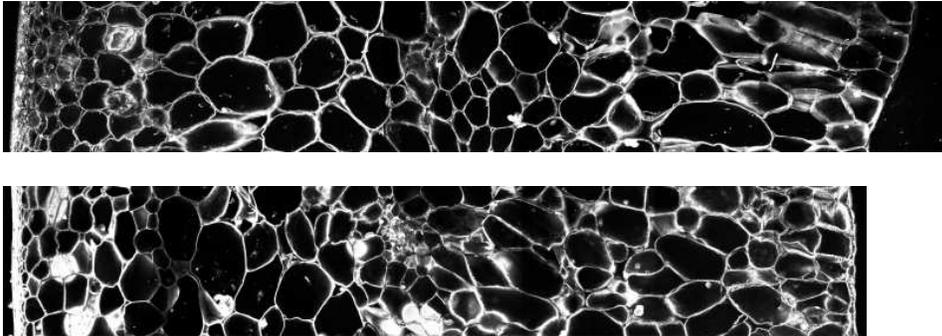


FIG. 8.9 – Images de traversées typiques de péricarpe de la lignée antisens (en haut) et sauvage (en bas). La largeur des images est de 1.2 mm.

La figure 8.10 montre les profils de densité surfacique moyens pour chaque lignée. Les profils des deux variétés ont des allures assez similaires, mais on peut noter des petites différences entre les profils moyens, notamment dans le premier tiers de péricarpe, et dans la zone centrale du péricarpe.

Les profils moyens calculés pour la densité d'élongation et la densité numérique ont des allures relativement similaires aux profils de densité surfacique, mais sont beaucoup plus bruités (figure 8.11). L'interprétation des profils d'épaisseur moyenne étant difficile, et les profils de densité numérique étant trop bruités, nous nous limitons à l'étude des profils de densité surfacique.

Afin de mettre en évidence les différences entre les différents profils de densité, nous extrayons par une analyse en composantes principales les variations qui représentent le mieux les profils (figure 8.8). L'analyse de variance sur la première composante principale révèle une différence significative ( $p$ -valeur  $< 0.1\%$ ) de la position géodésique de l'acquisition. Le premier vecteur propre indique qu'il s'agit probablement d'un effet de variation d'intensité générale des profils.

L'analyse de la deuxième composante permet de trouver une différence significative à 5% entre les lignées antisens et sauvage. L'examen du deuxième vecteur propre permet d'expliquer les différences (figure 8.12). On remarque deux zones particulières, correspondant aux deux premiers tiers du péricarpe, dans lesquelles les densités surfaciques sont plus ou moins importantes.

Pour la lignée antisens, les valeurs de la composante principale 2 sont significativement inférieures à celles du type sauvage. D'après le profil, il y a donc une plus grande densité de surface entre dans le premier tiers du péricarpe et une moins grande densité dans le deuxième tiers, c'est-à-dire vers le milieu du fruit.

Ainsi, même si la densité surfacique globale ne présente pas de différence entre les lignées, le profil de densité en fonction de la profondeur permet de mettre en évidence une différence.

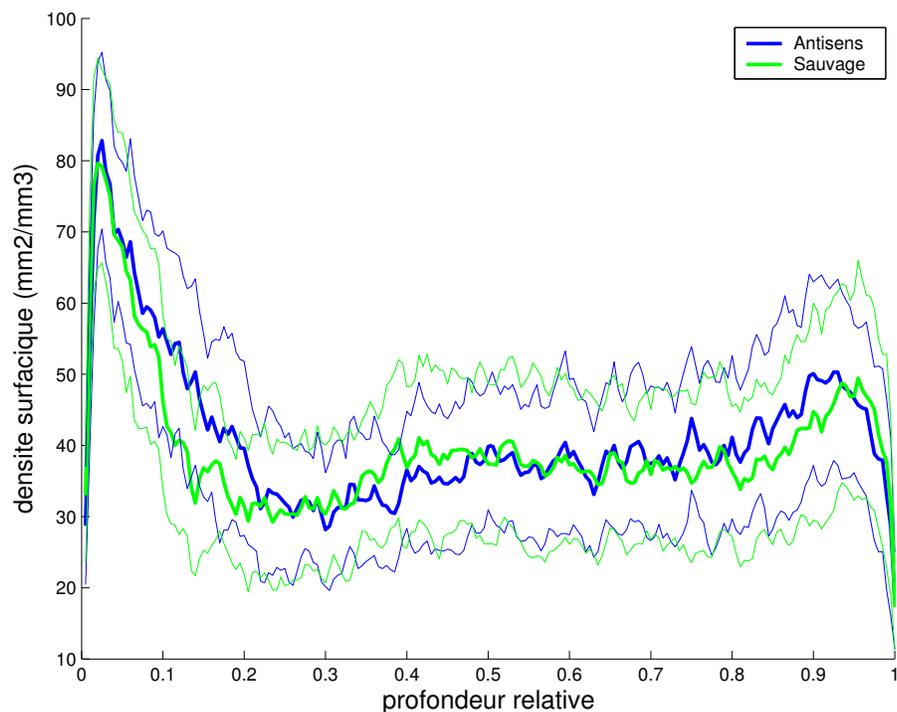


FIG. 8.10 – Profils moyens de densité surfacique en fonction de la profondeur relative (DR12). Chaque profil est entouré d'une courbe formée par les intervalles de confiance à 95% de chaque point.

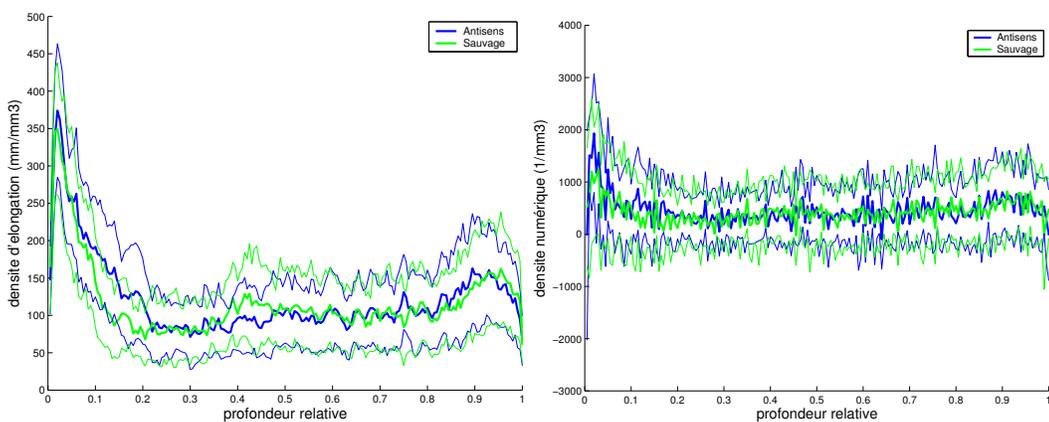


FIG. 8.11 – Profils moyens des densité d'épaisseur et de nombre en fonction de la profondeur relative (DR12) . Chaque profil est entouré d'une courbe formée par les intervalles de confiance à 95% de chaque point.

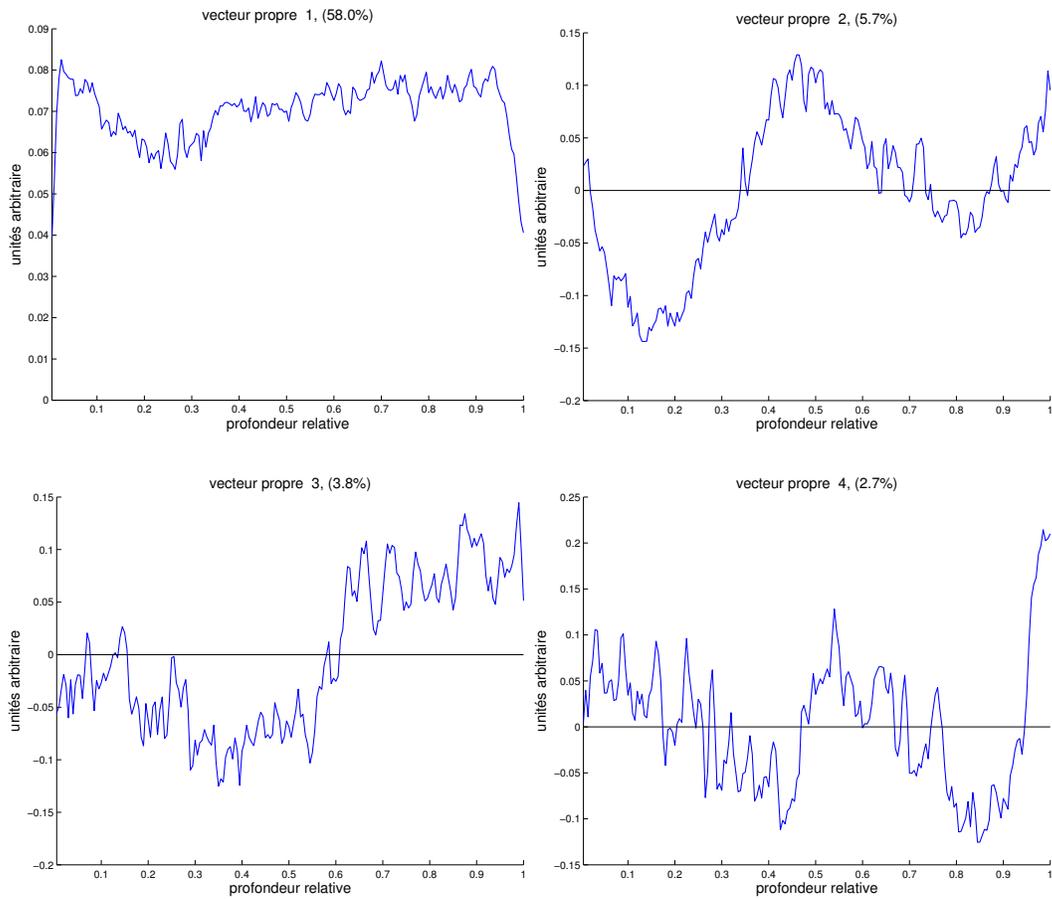


FIG. 8.12 – Les trois premiers vecteurs propres de l'analyse en composantes principales pour la densité surfacique en fonction de la profondeur dans le péricarpe.

surf.	inertie (%)	<i>p</i> -valeurs (%)		
		lignée	position	int.
comp. 1	58,0	80,9	< 0,1 ***	34,5
comp. 2	5,6	2,5 *	88,2	25,1
comp. 3	3,8	28,6	43,9	84,6
comp. 4	2,7	83,5	10,3	61,0
comp. 5	2,2	17,3	14,3	89,4

surf.	inertie (%)	<i>p</i> -valeurs (%)		
		lignée	position	int.
comp. 1	42,3	91,9	< 0,1 ***	13,6
comp. 2	7,6	1,8 *	97,5	18,0
comp. 3	5,5	41,7	38,9	74,8
comp. 4	3,5	81,7	16,7	83,5
comp. 5	3,2	77,7	20,4	94,6

TAB. 8.8 – Résultats de l'analyse de variance pour les profils de surface relatifs (en haut) et pour les profils d'épaisseur moyenne relatifs (en bas). On donne les *p*-valeurs en pourcentage. \* :  $p < 5\%$ , \*\* :  $p < 1\%$ , \*\*\* :  $p < 0,1\%$ .

#### 8.2.4 Profils de densité tronqués

Afin de mieux comprendre les variations géométriques dans la zone sous-cuticulaire, nous avons repris l'analyse des profils de densité, mais en ne gardant cette fois qu'une profondeur fixe de péricarpe, et en abandonnant la partie profonde.

La variation des profils est ici aussi étudiée par analyse en composantes principales, qui sont ensuite soumises à une analyse de variance. Les résultats sont donnés dans le tableau 8.9. Nous donnons les résultats pour les profils de surface et d'épaisseur moyenne, mais les profils étant relativement similaires, nous ne donnons les interprétations que pour la surface.

Une première observation est que les pourcentages d'inertie des composantes sont plus importants pour les profils tronqués. On a donc des profils moins bruités. On observe que sur la première composante principale, on retrouve encore l'effet de la position géodésique. C'est le même effet que celui décrit précédemment, dû à la différence de volume de péricarpe en fonction de la position. Ce qui est plus intéressant, c'est qu'une influence significative de la lignée puisse être mise en évidence sur les 3 premières composantes principales. La *p*-valeur est égale à 3,1 pour la première composante, et à 0,4 et 0,6 pour les composantes 2 et 3. Cet effet lignée est illustré sur la carte de ressemblance des composantes 2 et 3 (figure 8.14), qui différencie le plus significativement les lignées. Malgré une grande variabilité des images de chaque lignée, et un recouvrement des nuages de points, la différence entre les moyennes est significative.

L'interprétation nécessite d'analyser les vecteurs propres. Le deuxième vecteur propre montre une densité surfacique plus élevée pour une zone de péricarpe comprise entre 0,5 et 1,5 mm. D'après la figure 8.14, la composante 2 est plus élevée pour la lignée antisens.

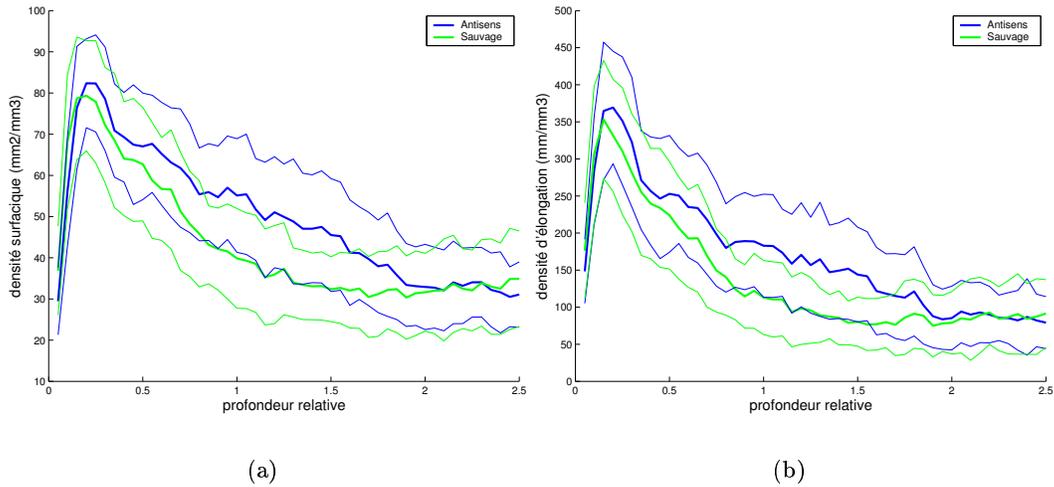


FIG. 8.13 – Profils de longueurs fixe moyens pour les deux lignées. (a) Profil de densité surfacique en fonction de la profondeur. (b) Profil de densité d'épaisseur moyenne en fonction de la profondeur. Un point correspond à une zone de péricarpe d'épaisseur  $50 \mu\text{m}$ . Chaque profil est entouré d'une courbe formée par les intervalles de confiance à 95% de chaque point.

surf.	inertie (%)	p -valeurs (%)		
		lignée	position	int.
comp. 1	60,1	3,1 *	< 0,1 ***	25,0
comp. 2	8,8	0,4 **	30,0	8,0
comp. 3	5,2	0,6 **	13,6	42,2
comp. 4	3,1	17,8	6,1	95,6
comp. 5	2,5	75,9	66,4	12,8

épais.	inertie (%)	p -valeurs (%)		
		lignée	position	int.
comp. 1	49,7	2,9 *	< 0,1 ***	11,5
comp. 2	11,0	2,2 *	34,1	15,5
comp. 3	6,9	1,2 *	0,1 **	80,7
comp. 4	3,8	13,2	10,1	60,5
comp. 5	3,4	70,6	41,6	51,0

TAB. 8.9 – Résultats de l'analyse de variance pour les profils de surface tronqués (en haut), et les profils d'épaisseur moyenne tronqués (en bas). On donne les  $p$ -valeurs en pourcentage. \* :  $p < 5\%$ , \*\* :  $p < 1\%$ , \*\*\* :  $p < 0,1\%$ .

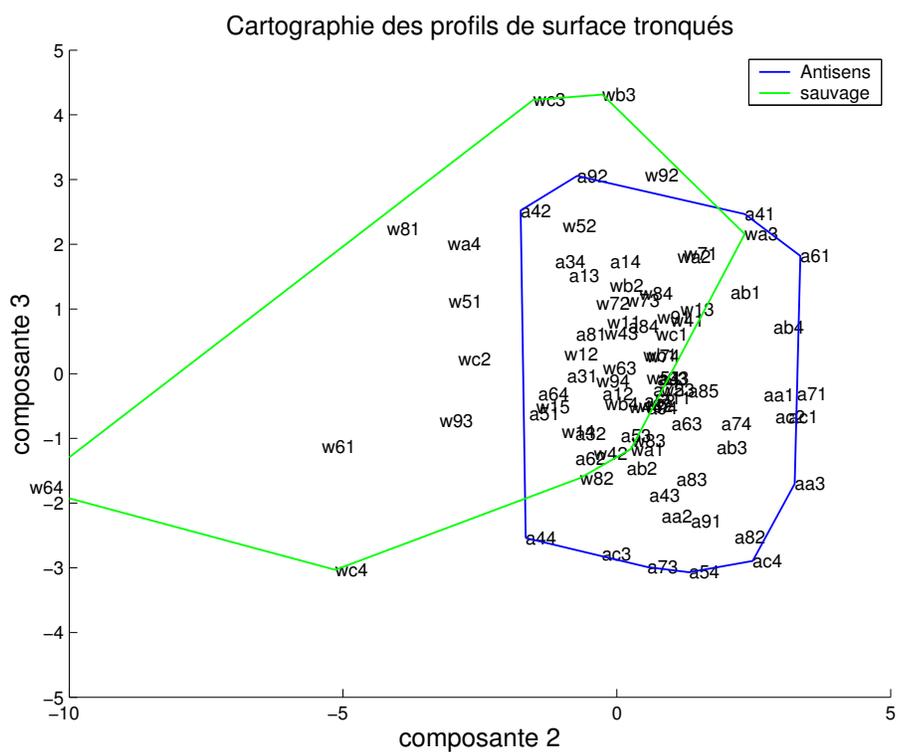


FIG. 8.14 – Carte de ressemblance des acquisitions en fonction des composantes principales 2 et 3 des profils de surface tronqués.

La deuxième composante principale permet donc de mettre en évidence que la densité surfacique est plus importante dans une zone de 0,5-1,5 mm de profondeur chez la lignée antisens. Cela correspond bien aux différences observées sur les profils moyens (Figure 8.13).

Le troisième vecteur propre montre lui aussi des différences de densité surfacique. Ces différences sont localisées dans les premiers 0,7 mm du péricarpe, ainsi que dans une zone de 1,3 à 2,2 mm de profondeur, où elle est de signe opposé. La mise en correspondance avec la carte de ressemblance de la figure 8.14 permet de déduire que la densité surfacique est plus importante pour la lignée sauvage dans la zone peu profonde du péricarpe, et plus importante pour la lignée antisens dans la zone de 1,3 à 2,2 mm de profondeur.

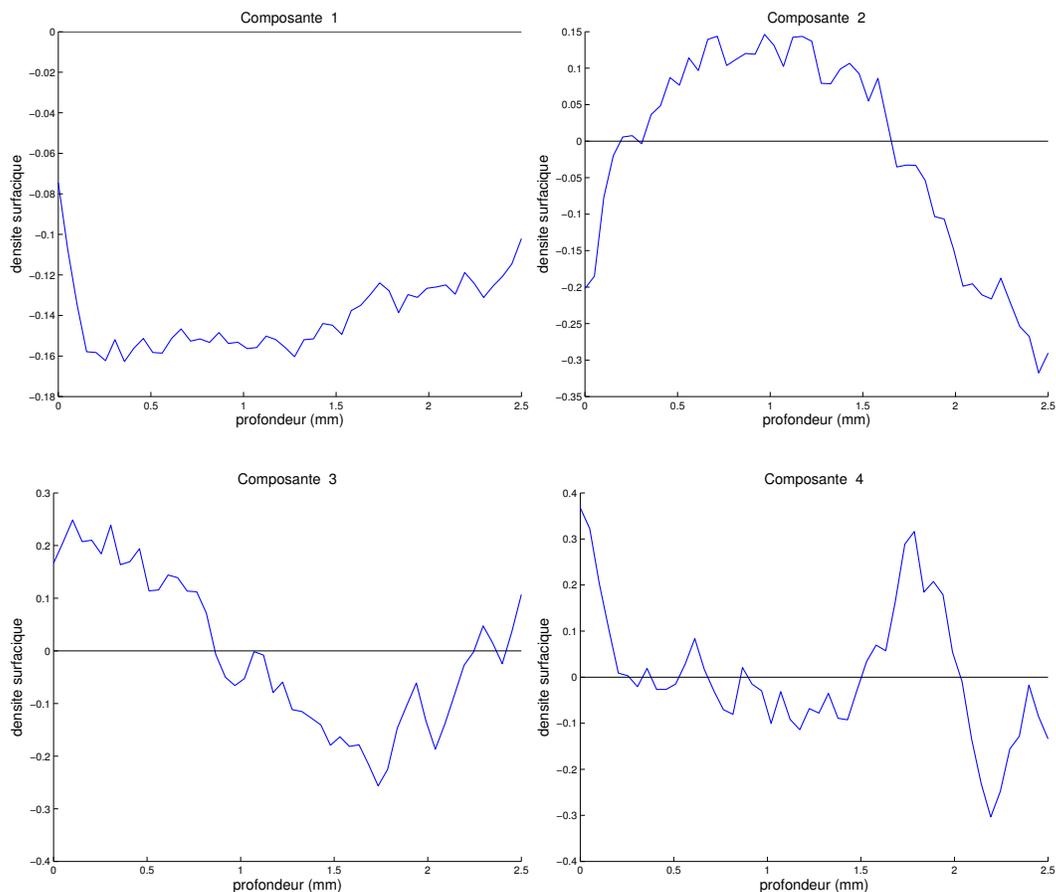


FIG. 8.15 – Les trois premiers vecteurs propres de l'analyse en composantes principales des profils de densité de surface tronqués.

Il est intéressant de noter qu'en concentrant l'analyse sur les premiers millimètres du péricarpe, les différences entre les lignées apparaissent de manière plus marquée qu'en considérant le profil global. Deux explications peuvent être avancées. Le fait de normaliser par l'épaisseur du péricarpe peut avoir pour effet de gommer les différences si elles sont localisées à une profondeur précise.

Une autre explication est que la segmentation des particules est beaucoup plus difficile dans les zones profondes du péricarpe. Les difficultés de segmentation rencontrées entraî-

neraient donc une variabilité plus importante des profils de densité estimés à ces niveaux, ce qui rendrait difficile une analyse statistique précise.

### 8.2.5 Utilisation des coupes verticales

Nous reprenons les profils de densité surfacique, mais obtenus cette fois à partir de coupes verticales. Nous utilisons l'estimateur de densité surfacique (6.4), présenté au chapitre 6. La correction de probabilité d'échantillonnage en fonction de la profondeur n'est pas prise en compte. On tient cependant compte de la différence de densité des points d'acquisition en fonction de la position géodésique. Nous pourrions donc comparer les variations des profils, mais pas les utiliser de manière quantitative. La figure 8.16 présente les profils de densité surfacique normalisés en fonction de la profondeur, et tronqués à 2,5 mm.

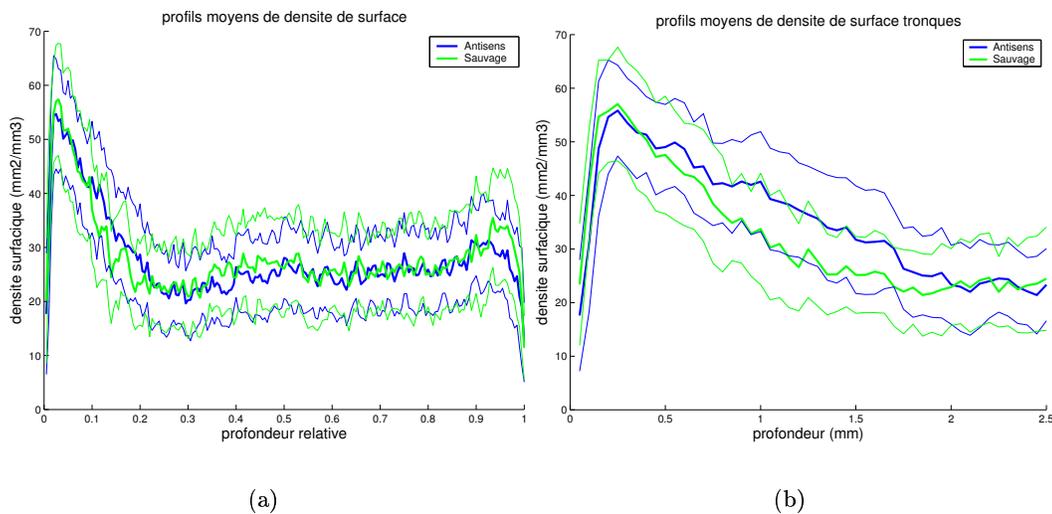


FIG. 8.16 – Profils de densité surfacique obtenus par les coupes verticales. (a) Profils normalisés par rapport à l'épaisseur du péricarpe. (b) Profil tronqué à 2.5 mm (1 point correspond à une épaisseur de  $50 \mu\text{m}$ ). Chaque profil est entouré d'une courbe formée par les intervalles de confiance à 95% de chaque point.

Une première observation est que ces deux profils sont très semblables à ceux obtenus à partir des observations 3D (figures 8.10 et 8.13-a), à la fois pour l'allure générale, et pour la valeur de la densité estimée.

Les composantes principales des profils sont extraites, et sont soumises à une analyse de variance (tableau 8.10). On remarque que les inerties des composantes sont globalement moins importantes qu'en utilisant les images 3D. Pour les profils relatifs de densité, seule la composante 5 permet de mettre en évidence un effet de la lignée. L'interprétation de la composante 5 est cependant délicate dans la mesure où les composantes 1 à 4 ne sont pas significatives. Nous retiendrons surtout qu'avec les profils relatifs de densité surfaciques obtenus à partir de coupes verticales, l'effet de la variété ne peut pas être mis en évidence de manière claire.

param	inertie (%)	p-valeurs (%)		
		lignée	position	int.
comp. 1	51,1	48,4	< 0,1 ***	76,5
comp. 2	4,7	7,5	64,7	39,1
comp. 3	3,1	96,6	3,9 *	73,5
comp. 4	2,7	51,3	33,2	91,5
comp. 5	2,4	1,4 *	59,7	53,8

param	inertie (%)	p-valeurs (%)		
		lignée	position	int.
comp. 1	55,4	10,4	< 0,1 ***	55,8
comp. 2	6,4	22,9	42,9	17,1
comp. 3	5,5	< 0,1 ***	1,4 *	55,8
comp. 4	3,6	74,2	73,5	51,5
comp. 5	2,7	86,8	5,0 *	88,1

TAB. 8.10 – Analyse de variance des valeurs propres des profils de densité surfacique relatifs (en haut) et tronqués (en bas), obtenus sur des coupes verticales. On donne les  $p$ -valeurs en pourcentage. \* :  $p < 5\%$ , \*\* :  $p < 1\%$ , \*\*\* :  $p < 0,1\%$ .

L'étude des premiers vecteurs propres (figure 8.17) permet de remarquer que leur forme est similaire à celle des profils obtenus avec les acquisitions en 3 dimensions, bien qu'ils soient plus bruités.

L'étude des profils tronqués permet de trouver un effet très significatif de la lignée sur la composante 3. La figure 8.18 donne les quatre premiers vecteurs propres de l'analyse. Les vecteurs propres 2 et 3 présentent des variations similaires à celles obtenues sur les images 3D (figure 8.15). La densité surfacique est plus élevée pour la lignée antisens dans une zone allant de 0,6 à 1,2 mm de profondeur.

Ainsi, l'estimation des profils de densité surfacique en fonction de la profondeur à partir de coupes verticales donne des résultats qualitatifs presque équivalents à ceux obtenus à partir des acquisitions 3D. La différence se situe au niveau de la variabilité des résultats : les profils sont moins bruités en utilisant des image 3D. Cela se traduit par un effet de la lignée qui est plus significatif dans les acquisitions 3D qu'en utilisant uniquement les coupes verticales. Il faut cependant noter que la probabilité d'échantillonnage des observation n'a pas été prise en compte, et donc que ces estimations sont biaisées.

### 8.2.6 Roses de direction

La rose des directions en 3 dimensions donnant des résultats non interprétables, nous avons effectué la mesure de la rose des direction sur les coupes planes, choisies toujours à la même profondeur dans la pile. Nous ne prenons donc pas en compte la probabilité d'échantillonnage des configurations, et cherchons plutôt à avoir une description qualitative de l'orientation des parois.

La figure 8.19 montre les zonoïdes équivalents associés à chaque lignée. Contrairement à

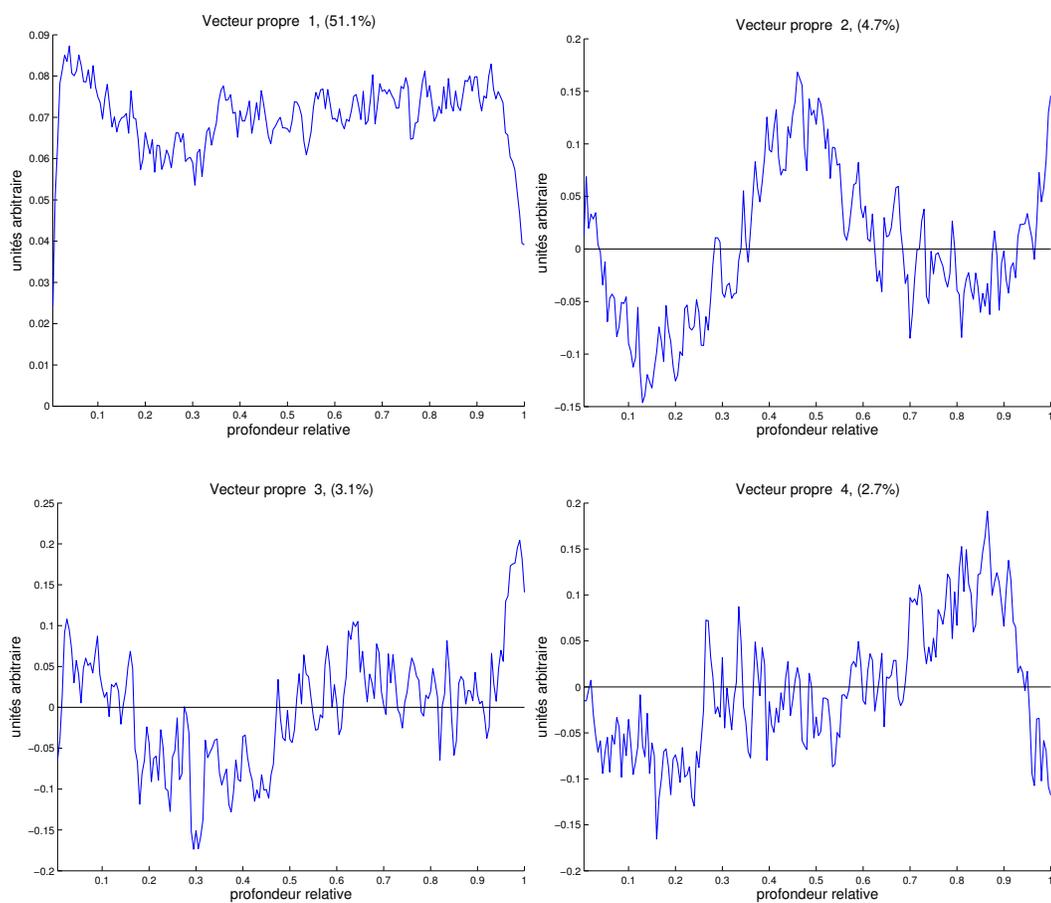


FIG. 8.17 – Trois premiers vecteurs propres des profils de densité surfacique par rapport à la profondeur relative obtenus à partir des coupes verticales.

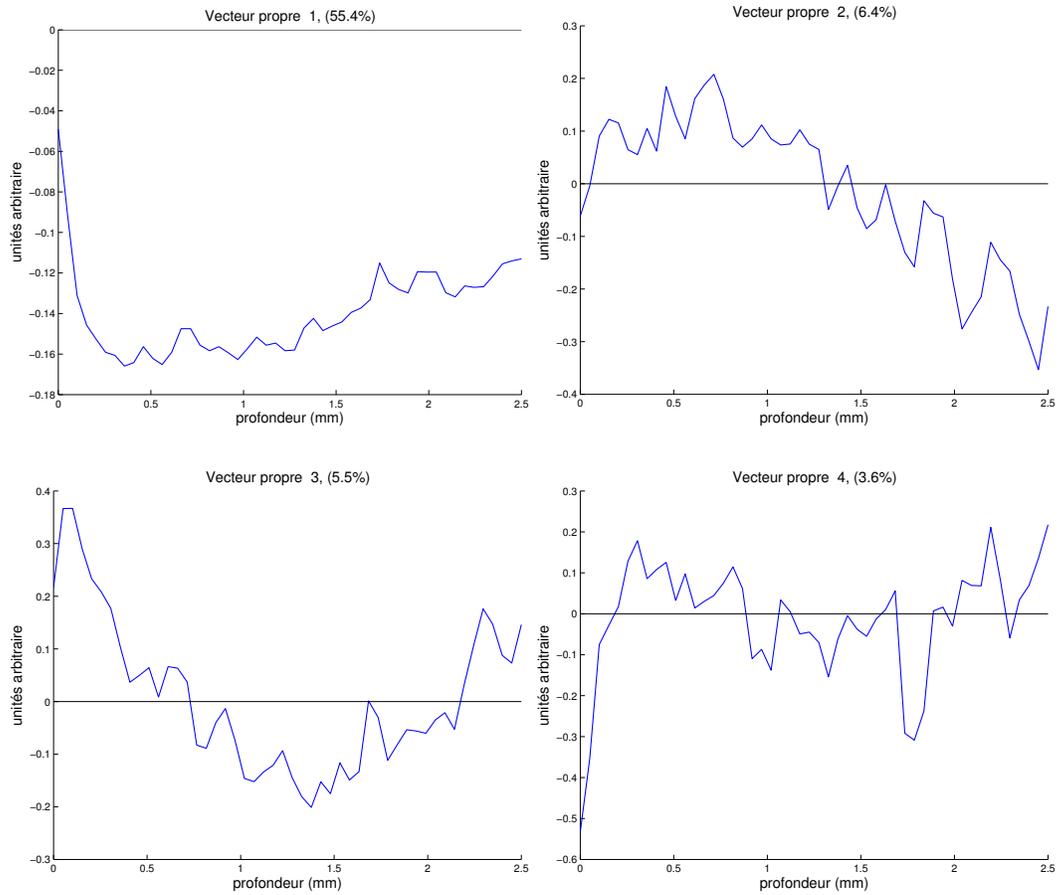


FIG. 8.18 – Trois premiers vecteurs propres de l'analyse en composantes principales sur les profils de densités surfacique tronqués, obtenus à partir des coupes verticales.

la campagne d'acquisition sur Cameron et Quest, aucune différence d'orientation ne semble cette fois visible. On peut remarquer que l'intensité de la rose de direction de la lignée sauvage est globalement plus importante que celle de la lignée mutante. Les probabilités d'échantillonnage n'étant pas prises en compte, il n'est cependant pas possible de relier cette différence à une différence de surface dans le péricarpe.

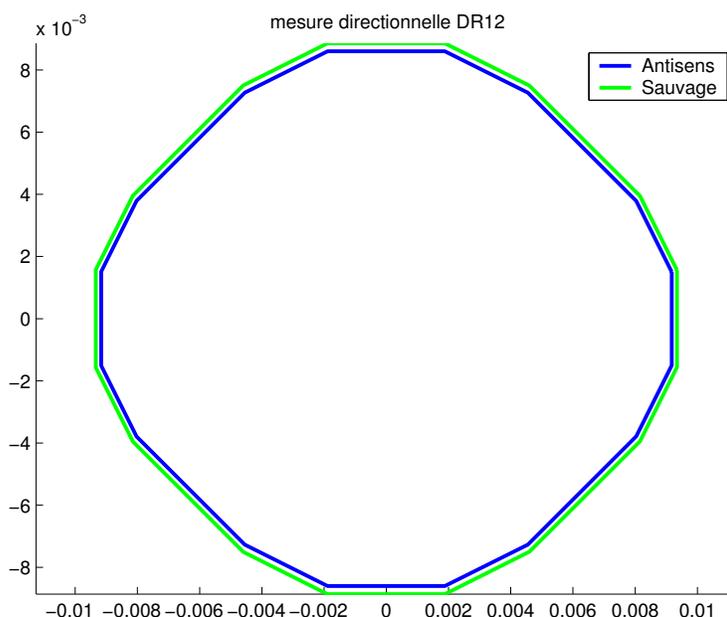


FIG. 8.19 – Représentation par les zonoïdes équivalents de la mesure directionnelle des lignées antisens et sauvage.

## Conclusion

L'analyse de la structure des particules du péricarpe par imagerie microscopique s'est révélée instructive, à la fois pour l'analyse globale de la structure que pour l'analyse locale.

Pour les lignées antisens et sauvage, nous avons pu mettre en évidence que le péricarpe de la lignée antisens est plus épais que celui de la lignée sauvage. De plus, nous avons pu caractériser les variations d'épaisseur en fonction de la position géodésique. Nous obtenons aussi une caractérisation de la morphologie des particules du péricarpe de chaque variété ou lignée, en utilisant le volume, la surface, l'épaisseur moyenne et le nombre des particules. Le nombre de particules estimé est supérieur au nombre de cellules donné par la littérature, mais il nous a été difficile de différencier les cellules des espaces intercellulaires.

Si l'étude des densités surfaciques globales dans le péricarpe ne permet pas de différencier les lignées, l'étude des profils de densité est plus instructive. Les profils de densité surfacique et d'épaisseur moyenne ont des aspects globaux très comparables, les profils de densité étant moins variables. On constate une densité surfacique très élevée au niveau de

la cuticule, plus basse dans la zone médiane du péricarpe, puis une légère augmentation près de la cuticule interne du péricarpe. Cette variation est interprétée comme un nombre de cellules plus élevé sous la cuticule.

Le fait d'utiliser des profils tronqués à une profondeur constante de 2,5 mm permet d'augmenter les contrastes entre les lignées antisens et sauvage. La première interprétation est que c'est la zone la plus pertinente au sens biologique, car c'est ici qu'on trouve une différence au niveau de la différenciation cellulaire. La deuxième interprétation est qu'il est préférable d'utiliser les profils tronqués, car les variations de densités dans la couche sous-cuticulaire se font sur une épaisseur constante, qui ne dépend pas de l'épaisseur du péricarpe.

Nous avons estimé les profils de densité surfacique à partir de coupes verticales, en utilisant une hypothèse plus forte sur la forme de la tomate : le péricarpe est considéré comme plat autour de chaque point. Si les profils obtenus, relatifs à la profondeur du péricarpe, ou tronqués à une profondeur fixe, ont un aspect général équivalent à ceux obtenus avec les acquisitions 3D, il est beaucoup plus difficile de mettre en évidence un effet de la variété. De plus, dans le cas de la tomate, les coupes verticales ne prennent pas en compte la correction de probabilité d'échantillonnage en fonction de la profondeur, ce qui les rend difficile à utiliser de manière quantitative.

Enfin, l'étude de la rose des directions du matériau, si elle semblait prometteuse, n'a pas permis de mettre en évidence de différences entre les variétés ou les lignées. Elle permet cependant de montrer un effet de l'acquisition sur la forme des images, qui sont aplaties dans la direction perpendiculaire aux coupes optiques. Si on se concentre sur le plan horizontal, la rose des directions des particules est globalement isotrope.

## Chapitre 9

# Conclusion et perspectives



Nous dressons ici le bilan du travail effectué au cours de cette thèse. Nous discutons d'abord les développements méthodologiques effectués, et nous évoquons les possibilités d'applications de la méthode à d'autres matériaux. Nous faisons ensuite le point sur ce que les méthodes mises en œuvre ont permis de mettre en évidence pour la caractérisation du produit biologique étudié, le péricarpe de tomate.

## Démarche statistique de quantification

Le premier résultat de ce travail consiste en la mise en place d'une démarche complète de quantification d'un produit biologique complexe. Des questions ont été soulevées tout au long du processus, depuis la modélisation mathématique et l'échantillonnage de la population, jusqu'à l'analyse des résultats, en passant par la construction d'estimateurs et leur implémentation sur des images discrètes tridimensionnelles.

Nous avons voulu développer et utiliser des méthodes génériques, qui puissent être adaptées facilement à d'autres types de structures. Si certaines de ces méthodes peuvent être utilisées directement, telles que les mesures dans les images discrètes, d'autres comme le calcul des probabilités d'échantillonnage dépendent du matériau étudié (ici la tomate), et leur adaptation sera peut-être moins directe. Si l'on étudie des produits végétaux tels que des fruits, ou des organes biologiques (rein, foie...), on retrouve toutefois une forme globale similaire, et la plupart des hypothèses utilisées devraient rester valides.

La modélisation de la structure d'intérêt par des ensembles aléatoires peut par certains côtés sembler technique et artificielle, mais elle est nécessaire pour prendre en compte de manière quantitative la variabilité naturelle du matériau. Cette variabilité intervient souvent à différentes échelles imbriquées. Dans le cas du péricarpe de tomate, nous avons différencié la variabilité du péricarpe, et la variabilité des cellules qui le composent. Cela permet de caractériser la géométrie des cellules en fonction de la géométrie du péricarpe.

Cette formalisation permet aussi de définir de manière précise ce que l'on veut mesurer sur la structure d'intérêt. Nous nous sommes concentrés sur 4 paramètres géométriques principaux : le volume, la surface, l'épaisseur moyenne, et le nombre, ainsi que sur les paramètres directionnels. Le nombre de paramètres retenus n'est pas très élevé, mais leur étude en fonction de la position permet d'enrichir la qualité de la description du matériau. Pour les cellules du péricarpe, l'influence de la profondeur a ainsi été caractérisée.

Il pourrait être intéressant d'étudier l'influence d'autres paramètres, tels que la présence ou l'absence de faisceaux dans la coupe, l'orientation des cellules par rapport au méridien de la tomate, ou la position géodésique. Une possibilité alternative serait d'estimer les moments d'ordres supérieurs des lois du volume, de la surface de l'épaisseur moyenne et du nombre de cellules.

## Observation des échantillons

La nature des observations est prépondérante dans l'analyse morphométrique. Le choix le plus important concerne le type des observations : coupes planes, ou observations tridimensionnelles. Si les premières sont beaucoup plus simples à obtenir, le lien entre les observations et les caractéristiques morphométriques 3D nécessite obligatoirement la mise

en œuvre de méthodes d'estimations issues de la stéréologie. L'observation directe d'échantillons 3D semble donc préférable, car elle permet de mesurer directement les paramètres géométriques.

Nous avons voulu caractériser la morphologie cellulaire du péricarpe de tomate. La taille de cellules pouvant être de l'ordre du millimètre, les observations doivent permettre de distinguer les cellules, ainsi que leur organisation spatiale. Nous voulions de plus observer des coupes fraîches de péricarpe, afin de nous rapprocher de la structure dans son état naturel, sans congélation ni inclusion dans de la résine. Le stade des tomates observées a été défini dans une optique comparative avec d'autres méthodes : les caractérisations sensorielles et mécaniques sont faites sur des tomates en début de maturité.

La microscopie confocale est une technique qui permet d'observer en 3 dimensions la morphologie et l'organisation spatiale des cellules, en limitant les phases de préparation. L'influence de la préparation n'est cependant pas nulle : les coupes sont obtenues au vibrotome, colorées et rincées, tout en étant immergées. Le matériel utilisé limite les contraintes mécaniques, mais il a été constaté que des coupes trop fines se disloquaient avant de pouvoir être observées. Il est probable que la pression de turgescence à l'intérieur des cellules soit modifiée, ce qui peut entraîner des changements dans la structure (taille de cellules, méats...). Enfin, le fait de placer l'échantillon entre deux lames de verre ajoute aussi des contraintes mécaniques.

Les observations au microscope confocal que nous avons obtenues sont encore loin d'être idéales. La profondeur d'observation est très limitée, et très peu de cellules peuvent être observées entièrement. À cela s'ajoute le fait que la résolution verticale reste floue. Bien que le filtrage optique améliore considérablement cette résolution, elle reste encore inférieure à la résolution latérale. De plus, les mesures directionnelles ont permis d'identifier clairement un "écrasement" de la structure reconstruite en 3D. Les explications possibles sont soit un biais dû à l'acquisition, soit une influence mécanique des lames utilisées.

Certaines zones de péricarpe se sont révélées difficiles à interpréter. L'apport de la 3ème dimension se révèle utile, bien que limité du fait de la profondeur, mais il est parfois difficile de différencier de manière claire les cellules des espaces intercellulaires. Une explication possible serait que la dissociation cellulaire déforme les parois, ce qui les rend difficile à reconnaître. L'observation de tomates avant le stade rouge pourrait dans ce cas peut-être améliorer l'interprétation.

Il semble cependant difficile de trouver une technique plus adaptée que la microscopie confocale. L'imagerie par résonance magnétique nucléaire ou la tomographie permettent une observation globale du péricarpe, mais les cellules sont difficiles à identifier. L'observation à des échelles plus fines (par microscopie confocale à un plus fort grossissement, ou par microtomographie) améliore la résolution des parois mais l'information sur l'organisation spatiale est plus difficile à obtenir, et nécessite l'acquisition d'un nombre encore plus important d'images.

En résumé, bien que la microscopie confocale ne soit pas exempte de défauts, elle reste une technique adaptée pour l'observation de matériaux cellulaires végétaux.

## Importance de l'échantillonnage

Que l'observation soit plane ou volumique, la taille du champ de vue par rapport à la structure est capitale. Idéalement il faudrait observer la totalité de la structure, ce qui n'est pas toujours possible. Dans le cas de la tomate, la taille des images ( $1,28 \times 1,28 \times 0,01$  mm) nécessitait clairement une distribution des observations dans le péricarpe.

Nous avons accordé une attention particulière à la définition du protocole d'échantillonnage. Bien qu'il ne soit pas toujours totalement évident de concilier les exigences de représentativité des observations et les contraintes techniques d'acquisition, il importe de le prendre en compte lors de la définition de l'étude. Pour la tomate, nous avons choisi un échantillonnage non uniforme, ce qui a entraîné le développement d'estimateurs tenant compte de cette non-uniformité.

Afin de pouvoir connaître la profondeur de chaque point de l'image, les observations ont été faites perpendiculairement à la surface du péricarpe, en distribuant les points uniformément par rapport à la latitude. Ce type d'échantillonnage a l'avantage d'être plus facile à effectuer qu'un échantillonnage uniforme dans le péricarpe. La probabilité d'échantillonnage est donc plus forte dans les zones profondes du péricarpe, et vers les pôles de la tomate.

Afin d'obtenir une méthode simple de correction des biais dus à l'échantillonnage, nous avons utilisé des hypothèses de régularité sur le péricarpe. L'épaisseur maximale du péricarpe doit être inférieure au rayon de courbure maximal de la tomate, et la taille des sondes d'échantillonnage doit être petite par rapport aux rayons de courbure principaux. Ces conditions sont vérifiées pour la tomate : l'épaisseur du péricarpe est toujours inférieure à 1 cm, et le rayon de courbure est au minimum de 1.5 cm. La taille de la sonde est inférieure d'un facteur 10 aux rayons de courbures.

Ces conditions de régularité sont assez souples, et devraient pouvoir convenir à d'autres types de structures organisées en couches : le péricarpe d'autres fruits, les couches cellulaires de l'épiderme ou d'organes. Il importe cependant de contrôler que l'épaisseur de la structure est inférieure au rayon de courbure.

La répartition des points d'échantillonnage à la surface de la structure est par contre un problème délicat. En modélisant le péricarpe par un solide de révolution, il est possible de calculer la distribution surfacique des points à partir de leur distribution selon la position géodésique. Si cette modélisation n'est pas valide, la densité surfacique des points peut être difficile à déterminer.

## Estimation des paramètres géométriques

Nous avons montré qu'en dépit d'observations partielles et d'un échantillonnage non uniforme de la structure d'intérêt, l'estimation de ses caractéristiques géométriques globales (volume, surface, épaisseur moyenne et nombre de cellules) était possible. Nous avons aussi pu estimer les paramètres sous forme de densité en fonction de la profondeur.

Un aspect non négligeable du développement des estimateurs est leur adaptation à des images discrètes. La mesure des paramètres morphométriques dans des images discrètes nécessite de tenir compte de nombreux facteurs techniques : résolution de la grille dans chaque direction, choix des voisinages à utiliser, discrétisation de l'espace des directions, effets de bord... Certains des choix sont faits en fonction d'a priori sur la structure : une structure fine sera par exemple étudiée en tenant compte de tous les voisins.

L'utilisation du complexe cellulaire permet d'exprimer les paramètres géométriques comme une somme de contributions localisées sur les sommets du complexe. Cette localisation est nécessaire pour l'estimation des paramètres dans un cadre non uniforme, ainsi que pour la construction de profils de densité sur une direction donnée. Les mesures de surface et d'épaisseur moyenne ne sont pas faites directement sur la reconstruction, mais en utilisant les formules de Crofton. Elles permettent de réduire le biais dû à la discrétisation, et dépendent assez peu du type de reconstruction utilisé. La question principale reste le choix du nombre de directions discrètes, qui peut être choisi à 26 si la résolution est élevée, ou à 6 si elle est faible.

## Apport de l'imagerie tridimensionnelle

Nous nous sommes intéressés à l'estimation de la densité surfacique à partir de coupes verticales. Nous avons utilisé des hypothèses différentes des estimations effectuées en 3D. Pour les coupes verticales, nous avons considéré que le péricarpe pouvait être mis localement à plat, et nous n'avons utilisé aucune correction de probabilité d'échantillonnage. Le calcul de ces corrections pour des coupes perpendiculaires à une surface quelconque est un problème assez difficile, et qui pourrait nécessiter des développements plus poussés.

Nous avons utilisé un estimateur basé sur des mesures d'angles avec une droite horizontale dans la coupe, ce qui permet de construire des profils de densité surfacique en fonction de la profondeur. Nous avons proposé une modification de l'estimateur dans le cas discret, qui permet d'améliorer légèrement la précision. La comparaison des estimations basées sur les coupes verticales avec les estimations basées sur les images en 3D est particulièrement intéressante, car elle permet d'apprécier l'apport que fournit une acquisition en 3 dimensions. Pour une structure échantillonnée uniformément, les observations sur la tomate montrent que les coupes verticales suffisent à estimer la densité surfacique en fonction de la profondeur. L'apport de la troisième dimension consiste en une amélioration de la précision.

Les coupes verticales ne permettent cependant pas d'estimer l'épaisseur moyenne et le nombre des cellules. L'épaisseur moyenne requiert soit des observations volumiques, soit des coupes planes isotropes. Quant au nombre de cellules, il ne peut être estimé qu'à partir d'observations volumiques, ou à partir de coupes planes parallèles. Rappelons enfin que pour la tomate, les estimations à partir de coupes verticales présentent un biais dû à la courbure du péricarpe, et que seules les observations volumiques permettent pour l'instant de corriger ce biais.

## Traitement des images

Le traitement des images, qui permet de passer des observations brutes à des images binaires sur lesquelles appliquer les mesures a été une étape délicate. La variation d'intensité lumineuse a pu être en partie corrigée, ce qui a permis d'uniformiser la luminosité en fonction de la profondeur. La qualité des coupes optiques situées en profondeur reste cependant en deçà de celles situées plus près de la surface, avec des phénomènes d'absorption.

Ces problèmes d'acquisition ont pu être en partie corrigés, en utilisant des a priori sur la forme des parois. De plus, l'étape de segmentation est basée sur l'algorithme de

ligne de partage des eaux, en partant du principe que l'on cherche à trouver les bassins versants correspondant aux cellules. Malgré cela, la segmentation des cellules reste très problématique. Une majorité des cellules est correctement segmentée, mais de nombreux espaces intercellulaires sont soit incorporés aux cellules, soit sur-segmentés. Les régions accidentées des acquisitions ne peuvent être segmentées avec beaucoup de succès. C'est notamment le cas des cellules constituant les faisceaux, ou bien des zones où les cellules se dissocient fortement. On se retrouve face à un problème de validation : il est difficile, même pour un opérateur entraîné, de délimiter les cellules de certaines régions.

L'utilisation de filtres basés sur les ondelettes pourrait permettre d'améliorer l'image des parois. Le compromis entre la sursegmentation et la soussegmentation est difficile à trouver. Une piste envisageable est de garder une méthode qui globalement sursegmente les espaces, et d'utiliser ensuite une classification afin de discriminer les espaces intercellulaires des cellules. Il peut être envisageable de fusionner les régions appartenant au même espace cellulaire, cellule ou méat.

Ces difficultés permettent en tous cas de préciser les limites de la segmentation automatique des structures. S'il est souhaitable de pouvoir automatiser cette étape, pour des raisons de temps ou de répétabilité, la variabilité de la qualité des acquisitions peut parfois poser des problèmes de mise en place ou de validation de la segmentation.

## Morphologie du péricarpe de tomate

Les paramètres géométriques globaux et locaux du péricarpe de tomate ont été estimés à partir d'observations microscopiques. La quantification de la morphologie des structures biologiques n'est pas très courante à l'échelle du fruit.

Un point important de cette quantification est que nous disposons de points de repères qui permettent de vérifier que les estimations obtenues ont une validité au sens biologique. Le volume de péricarpe total peut être calculé à partir du modèle de révolution, et des analyses par cytométrie ont permis d'estimer le nombre total de cellules dans une tomate à environ 10 millions. Le nombre d'espaces cellulaires estimé par morphométrie est beaucoup plus important. Une des raisons est que l'on prend en compte aussi bien les cellules que les espaces intercellulaires. De plus, beaucoup d'espaces intercellulaires apparaissent sursegmentés, ce qui entraîne une surestimation de leur nombre.

Le fait de pouvoir caractériser l'hétérogénéité du péricarpe en fonction de la profondeur fournit des informations sur les variations de morphologie à l'intérieur du péricarpe. Nous pouvons reconnaître très clairement l'augmentation des cellules dans la zone de la cuticule, ainsi que, dans une moindre mesure, dans la partie interne du péricarpe. L'effet des structures internes comme les faisceaux n'a par contre pas pu être mis en évidence.

Les profils de densité se sont aussi révélés utiles pour comparer les lignées antisens et sauvage. Nous avons pu mettre en évidence que la densité surfacique est plus importante pour la lignée antisens dans une zone de 0.5 à 1.5 mm de profondeur dans le péricarpe. Cette zone est située toujours à la même profondeur, même pour des épaisseurs de péricarpe différentes. Cette différence de densité surfacique a été interprétée comme la conséquence de la division cellulaire plus importantes chez la lignée antisens. Il est ainsi particulièrement utile de pouvoir quantifier un phénomène qui joue un rôle dans l'établissement des propriétés mécaniques du péricarpe.

Les analyses sur les tomates présentant des caractéristiques sensorielles différentes n'ont pas permis de mettre en évidence de différence significative en fonction de la variété. Si les cellules semblent légèrement plus allongées chez la variété Cameron, les cellules de la variété Quest et des lignées DR12 sont globalement rondes. L'analyse directionnelle semble donc être une voie prometteuse.

La caractérisation du péricarpe peut éventuellement être enrichie par des informations sur la variabilité des propriétés en fonction de la position. Il semble possible à court terme de produire une cartographie des propriétés géométriques et de leur variabilité en fonction de la position dans le péricarpe. Ces cartographies peuvent ensuite être utilisées comme base pour construire des modèles géométriques tridimensionnels de cellules de péricarpe, qui serviront d'entrée pour des modèles mécaniques cellulaires. Le travail de caractérisation s'inscrit ainsi dans une démarche d'intégration des connaissances à différents niveaux d'observation, et de construction de modèles hiérarchisés en différents niveaux de complexité.

## Synthèse

À partir d'un produit modèle, la tomate, nous avons mis en place une démarche complète et générique de caractérisation morphométrique de la structure étudiée. Les estimations ont pu être effectuées à la fois au niveau global (le fruit) et au niveau local (la profondeur). La cartographie des variations des paramètres permet de caractériser l'hétérogénéité de la structure au niveau spatial. Pour les lignées DR12, il a de plus été possible de mettre en évidence des différences morphologiques dues à une division cellulaire plus importante.

La généralité des méthodes utilisées devrait permettre leur adaptation rapide à d'autres types de produits. Les perspectives envisagées pour ce travail sont l'utilisation des paramètres géométriques pour construire des modèles mécaniques, afin de fournir des pistes d'explication de la texture sensorielle et des propriétés mécaniques du péricarpe de tomate.

# Bibliographie

- Abbott, J. A. (1999). Quality measurement of fruits and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.*, 15(3).
- Adams, S. R., Cockshull, K. E., et Cave, C. R. J. (2001). Effect of temperature on the growth and development of tomato fruits. *Ann. Bot.*, 88(5) :869–877.
- Alexander, L. et Grierson, D. (2002). Ethylene biosynthesis and action in tomato : a model for climacteric fruit ripening. *J. Exp. Bot.*, 53(377) :2039–2055.
- Allende, A., Desmet, M., Vanstreels, E., Verlinden, B. E., et Nicolai, B. M. (2004). Micro-mechanical and geometrical properties of tomato skin related to differences in puncture injury susceptibility. *Postharvest Biol. Technol.*, 34(2) :131–141.
- Alvarez, M. D., Saunders, D. E. J., et Vincent, J. F. V. (2000). Fracture properties of stored fresh and osmotically manipulated apple tissue. *Eur. Food Res. Technol.*, 211 :284–290.
- Antoine, C., Peyron, S., Mabilhe, F., Lapierre, C., Bouchet, B., Abecassis, J., et Rouau, X. (2003). Individual contribution of grain outer layers and their cell wall structure to the mechanical properties of wheat bran. *J. Agric. Food Chem.*, 51 :2026–2033.
- Auerswald, H., Peters, P., Brückner, B., Krumbein, A., et Kuchenbuch, R. (1999). Sensory analysis and instrumental measurements of short-term stored tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Postharvest Biol. Technol.*, 15(3) :323–334.
- Babin, P. (2005). *Matériaux alvéolaires à base de bio-polymères : structure et propriétés mécaniques*. PhD thesis, INP Grenoble.
- Baddeley, A. et Jensen, E. B. V. (2005). *Stereology for statisticians*. Number ISBN 1-58488-405-3. Chapman and Hall/CRC, Boca Raton.
- Baddeley, A. J., Gundersen, H. G. J., et Cruz-Orive, L. M. (1986). Estimation of surface area from vertical sections. *J. Microsc.*, 142(3) :259–276.
- Badel, E. et Perré, P. (2001). Using a digital x-ray imaging device to measure the swelling coefficients of a group of wood cells. *NDT&E International*, 34 :345–353.
- Banchoff, T. (1967). Critical points and curvature for embedded polyhedra. *J. Diff. Geom.*, 1 :245–256.
- Banchoff, T. (1970). Critical points and curvature for embedded polyhedral surfaces. *Amer. Math. Monthly*, 77 :475–485.

- Barber, P. R., Vojnovic, B., Ameer-Beg, S. M., Hodgkiss, R. J., Tozer, G. M., et Wilson, J. (2003). Semi-automated software for the three-dimensional delineation of complex vascular networks. *J. Microsc.*, 211(1) :54–54.
- Bargel, H. et Neinhuis, C. (2005). Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit growth and ripening as related to the biomechanical properties of fruit skin and isolated cuticle. *J. Exp. Bot.*, 56(413) :1049–60.
- Berger, M. et Gostiaux, B. (1992). *Géométrie différentielle : variétés, courbes et surfaces*. PUF mathématiques, 2nd edition.
- Bertin, N., Borel, C., Brunel, B., Cheniclet, C., et Causse, M. (2003). Do genetic make-up and growth manipulation affect tomato fruit size by cell number, or cell size and DNA endoreduplication? *Ann. Bot.*, 92 :415–424.
- Bertin, N., Gautier, H., et Roche, C. (2002). Number of cells in tomato fruit depending on fruit position and source-sink balance during plant development. *Plant Growth Regulation*, 36 :105–112.
- Beucher, S. et Lantuéjoul, C. (1979). Use of watersheds in contour detection. In *Proc. Int. Workshop Image Processing, Real-time edge and motion detection/estimation*, pages 433–482.
- Brett, C. et Waldron, K. W. (1996). *Physiology and Biochemistry of plant cell walls*. Chapman & Hill, 2nd edition.
- Bron, F. et Jeulin, D. (2004). Modelling a food microstructure by random sets. *Image Anal. Stereol.*, 23(3) :33–44.
- Brovelli, E. A., Brecht, J. K., Sherman, W. B., et Sims, C. A. (1998). Anatomical and physiological responses of melting and non melting flesh peaches to postharvest chilling. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 123(4) :668–674.
- Bruce, D. M. (2003). Mathematical modelling of the cellular mechanics of plants. *Phil. Trans. : Biol. Sci.*, 358(1437) :1437–1444.
- Čapek, M. et Krekule, I. (1999). Alignment of adjacent picture frames captured by a CLSM. *IEEE Trans. Inf. Technol. Biomed.*, 3(119–24).
- Carpita, N. C. et Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary-cell wall in flowering plants - consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.*, (3) :1–30.
- Causse, M., Duffe, P., Gomez, M. C., Buret, M., Damidaux, R., Zamir, D., Gur, A., Chevalier, C., Lemaire-Chamley, M., et Rothan, C. (2004). A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition. *J. Exp. Bot.*, 55(403) :1671–1685.
- Causse, M., Saliba-Colombani, V., Lecomte, L., Duffé, P., Rousselle, P., et Buret, M. (2002). QTL analysis of fruit quality in fresh market tomato : a few chromosome regions control the variation of sensory and instrumental traits. *J. Exp. Bot.*, 53(377) :2089–2098.

- Cheng, P. C., Wu, W. L., Lin, T. H., et Wu, J. L., editors (1994). *Multidimensional microscopy*. Springer-Verlag.
- Chiralt, A. et Talens, P. (2005). Physical and chemical changes induced by osmotic dehydration in plant tissues. *J. Food Eng.*, 67 :167–177.
- Cochran, W. G. (1977). *Sampling Techniques*. John Wiley and Sons, 3d edition.
- Cocquerez, J. P. et Philipp, S. (2000). *Analyse d'images : filtrage et segmentation*. Enseignement de la physique. Masson.
- Coster, M. et Chermant, J.-L. (1989). *Précis d'analyse d'images*. CNRS PLUS. Presses du CNRS.
- Crisosto, C. H. et Labavitch, J. M. (2002). Developping a quantitative method to evaluate peach (*prunus persica*) flesh mealiness. *Postharvest Biol. Technol.*, 25 :151–158.
- Cruz-Orive, L.-M. et Weibel, E. R. (1981). Sampling designs for stereology. *J. Microsc.*, 122(3) :235–257.
- CTIFL, editor (2000). *Tomate, pour un produit de qualité*. CTIFL.
- Davies, G. C., Hilelr, C., et Bruce, D. M. (1998). A membrane model of elastic deflection of individual plant cell walls. *J. Text. Stud.*, 29 :645–667.
- De Smedt, V., Pauwels, E., De Baerdmaeker, J., et Nicolai, B. (1998). Microscopic observation of mealiness in apples : a quantitative approach. *Postharvest Biol. Technol.*, 14(2) :151–158.
- Desmet, M., Lammertyn, J., Scheerlink, N., Verlinden, B. E., et Nicolai, B. M. (2003). Determination of puncture injury susceptibility of tomatoes. *Postharvest Biol. Technol.*, 27(3) :293–303.
- Desmet, M., Lammertyn, J., Verlinden, B. E., et Nicolai, B. M. (2002). Mechanical properties of tomatoes as related to puncture injury susceptibility. *J. Text. Stud.*, 33 :415–429.
- Devaux, M.-F., Barakat, A., Robert, P., Bouchet, P., Guillon, F., Navez, B., et Lahaye, M. (2005). Mechanical breakdown and cell wall structure of mealy tomato pericarp tissue. *Postharvest Biol. Technol.*, 37(3) :209–221.
- Fazekas, A., Dendievel, R., Salvo, L., et Bréchet, Y. (2002). Effect of microstructural topology upon the stiffness and strength of 2D cellular structures. *Int. J. Mech. Sci.*, 44(10) :2047–2066.
- Federer, H. (1969). *Geometric Measure Theory*. Springer-Verlag, Berlin.
- Ferguson, I., Volz, R., et Woolf, A. (1999). Preharvest factors affecting physiological disorders of fruit. *Postharvest Biol. Technol.*, 15(3) :255–262.
- Fromont, L. (2003). Assemblage d'images de cellules végétales acquises en microscopie confocale à balayage laser. Technical report, Institut de Recherche en Informatique de Nantes.

- Fromont, L., Devaux, M.-F., et Barba, D. (2005). Three-dimensional assembling of confocal images using multiresolution pyramids. In *9th European Congress for stereology and image analysis, 10-13 May 2005, Zakopane (Poland)*.
- Gautier, H., Rocci, A., Buret, M., Grasselly, D., et Causse, M. (2005). Fruit load or fruit position alters response to temperature and subsequently cherry tomato quality. *J. Sci. Food Agric.*, 85(6) :1009–1016.
- Gibson, L. J. (2005). Biomechanics of cellular solids. *J. Biomechanics*, 38 :377–399.
- Gibson, L. J. et Ashby, M. F. (1997). *Cellular Solids, Structure and Properties*. Cambridge University Press, 2nd edition.
- Gokhale, A. M. (1998). Estimation of integral mixed surface curvature from vertical metallographic sections. *Acta Materialia*, 46(5) :1741–1748.
- Gray, J. D., Kolesik, P., Hoj, P. B., et Coombe, B. G. (1999). Confocal measurement of the three-dimensional size and shape of plant parenchyma cells in a developing fruit tissue. *Plant J.*, 19(2) :229–229.
- Gundersen, H. J. G. (1986). Stereology of arbitrary particles. *J. Microsc.*, 143(1) :3–45.
- Gundersen, H. J. G. et al. (1988a). The new stereological tools : Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, 96 :857–881.
- Gundersen, H. J. G. et al. (1988b). Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, 96 :379–394.
- Gundersen, H. J. G., Jensen, E. B. V., Kieu, K., et Nielsen, J. (1999). The efficiency of systematic sampling in stereology reconsidered. *J. Microsc.*, 193(3) :199–200.
- Gutkowski, P., Jensen, E. B. V., et Kiderlen, M. (2004). Directional analysis of digitized three-dimensional images by configuration counts. *J. Microsc.*, 216(2) :175–185.
- Hahn, U., Micheletti, A., Pohlink, R., Stoyan, D., et Wendrock, H. (1999). Stereological analysis and modelling of gradient structures. *J. Microsc.*, 195(2) :113–124.
- Hahn, U. et Stoyan, D. (1998). Unbiased stereological estimation of the surface area of gradient surface processes. *Adv. Appl. Prob.*, 30 :904–920.
- Harker, F. R., Lau, K., et Gunson, F. A. (2003). Juiciness of fresh fruit : a time-intensity study. *Postharvest Biol. Technol.*, 29 :55–60.
- Harker, F. R. e. a. (1997). Texture of parenchymatous plant tissue : a comparison between tensile and other instrumental and sensory measurements of tissue strength and juiciness. *Postharvest Biol. Technol.*, 11 :63–72.
- Hertog, M. L. A. T. M., Lammertyn, J., Desmet, M., Scheerlink, N., et Nicolaï, B. (2004). The impact of biological variation on postharvest behaviour of tomato fruit. *Postharvest Biol. Technol.*, 34(3) :271–284.

- Horvitz, D. G. et Thompson, D. J. (1952). A generalization of sampling without replacement from a finite universe. *J. Am. Stat. Assoc.*, (47) :663–685.
- Jackman, R. L. Stanley, D. W. (1995). Perspectives in the textural evaluation of plant foods. *Trends Food Sci. Technol.*, 6 :187–194.
- Jackman, R. L. et Stanley, D. W. (1995). Creep behaviour of tomato pericarp tissue as influenced by ambient temperature ripening and chilled storage. *J. Text. Stud.*, 26 :537–552.
- Jarvis, M. C., Briggs, S. P. H., et Knox, J. P. (2003). Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant, Cell and Environment*, 26(7) :977–1190.
- Jensen, E. B. et Gundersen, H. J. G. (1989). Fundamental stereological formulae based on isotropically orientated probes through fixed points, with applications to particle analysis. *J. Microsc.*, 153(3) :249–267.
- Jensen, E. B. V. (1998). *Local Stereology*. Advanced Series on Statistical Science & Applied Probability. World Scientific.
- Jensen, E. B. V. et Kiderlen, M. (2003). Directional analysis of digitized planar sets by configuration counts. *J. Microsc.*, 212(2) :158–168.
- Jones, B., Frasse, P., Olmos, E., Zegzouti, H., Guo Li, Z., Latche, A., Pech, J.-C., et Bouzayen, M. (2002). Down-regulation of DR12, an auxin-response-factor homolog, in the tomato results in a pleiotropic phenotype including dark green and blotchy ripening fruit. *Plant J.*, 32(4) :603–613.
- Joubès, J., Walsh, D., Raymond, P., et Chevalier, C. (2000). Molecular characterization of the expression of distinct classes of cyclins during the early development of tomato fruit. *Planta*, 211(3) :430–439.
- Karen, P., Jirkovská, M., Tomori, Z., Demjénová, E., Janáček, J., et Kubínova, L. (2003). Three-dimensional computer reconstruction of large tissue volumes based on composing series of high-resolution confocal images by GlueMRC and LinkMRC softwares. *Microsc. Res. Tech.*, (62) :415–422.
- Kervrann, C., Legland, D., et Pardini, L. (2004). Robust incremental compensation of the light attenuation with depth in 3D fluorescence microscopy. *J. Microsc.*, 214(3) :297–314.
- Kiderlen, M. et Jensen, E. B. V. (2003). Estimation of the directional measure of planar random sets by digitization. *Adv. Appl. Prob.*, 35 :583–602.
- Kiêu, K. et Jensen, E. B. V. (1991). Stereological estimation based on isotropic slices through fixed points. *J. Microsc.*, 170(1) :45–51.
- Klette, R. et Rosenfeld, A. (2004). *Digital Geometry*. Morgan Kaufman.
- Knee, M. (2002). *Fruit Quality and its biological basis*. Sheffield.
- Konstankiewicz, K., Czachor, H., Gancarz, M., Król, A., Pawlak, K., et Zdunek, A. (2002). Cell structural parameters of potato tuber tissue. *Int. Agrophysics*, 16 :119–127.

- Konstankiewicz, K., Król, A., et Pukos, A. (1995). Confocal microscopy for investigations of agricultural materials. *Int. Agrophysics*, 9 :287–292.
- Konstankiewicz, K., Pawlak, K., et Zdunek, A. (2001a). Influence of structural parameters of potato tuber cells on their mechanical properties. *Int. Agrophysics*, 15 :243–246.
- Konstankiewicz, K., Pawlak, K., et Zdunek, A. (2001b). Quantitative method for determining cell structural parameters of plant tissues. *Int. Agrophysics*, 16 :161–164.
- Konstankiewicz, K. et Zdunek, A. (2001). Influence of turgor and cell size on the cracking of potato tissue. *Int. Agrophysics*, 15 :27–30.
- Lang, C., Ohser, J., et Hilfer, R. (2001). On the analysis of spatial binary images. *J. Microsc.*, 203(3) :303–313.
- Laurent, M., Johannin, G., Le Guyader, H., et Fleury, A. (1992). Confocal scanning optical microscopy and three dimensional imaging. *Biol. Cell*, 76 :113–124.
- Lecomte, L., Saliba-Colombani, V., Gautier, A., Gomez-Jimenez, M. C., Duffé, P., Buret, M., et Causse, M. (2004). Fine mapping of QTLs of chromosome 2 affecting the fruit architecture and composition of tomato. *Mol. Breeding*, 13 :1–14.
- Li, J., Tan, J., Martz, F. A., et Heymann, H. (1999). Image texture features as indicators of beef tenderness. *Meat Sci.*, 53 :17–22.
- Lin, T.-T. et Pitt, R. A. (1986). Rheology of apple and potato tissue as affected by cell turgor pressure. *J. Text. Stud.*, 17 :291–313.
- Majumdar, S. Kothari, M., Augat, P., Newitt, D. C., Link, T. M., Lin, J. C., Lang, T., Lu, Y., et Genant, H. K. (1998). High-resolution magnetic resonance imaging : Three-dimensional trabecular bone architecture and biomechanical properties. *Bone*, 22(5) :445–454.
- Martin, C., Bhat, K., et Baumann, K. (2001). Shaping in plant cells. *Cur. Opin. Plant Biol.*, (4) :540–549.
- Matheron, G. (1975). *Random Sets and Integral Geometry*. John Wiley & Sons, New York/London.
- McAndrew, A. et Osborne, C. (1997). The Euler characteristic on the face-centred cubic lattice. *Pattern Recognition Lett.*, 18(3) :229–237.
- Mecke, J. (1981). Formulas for stationary planar fibre process III - intersections with fibre systems. *Math. Operationforsch. Stat., Ser. Statistics*, 12(2) :201–210.
- Mecke, J. et Stoyan, D. (1980). Formulas for stationary planar fibre process I - general theory. *Math. Operationforsch. Stat., Ser. Statistics*, 11(2) :267–279.
- Meyer, F. (1992). Mathematical morphology : from two dimensions to three dimensions. *J. Microsc.*, 165(1) :5–28.

- Munn, L. L. (2003). Aberrant vascular architecture in tumors and its importance in drug-based therapies. *Drug Discovery Today*, 8(9) :396–403.
- Nagel, W., Ohser, J., et Pischang, K. (2000). An integral-geometric approach for the Euler-Poincaré characteristic of spatial images. *J. Microsc.*, 198(1) :54–54.
- Nicholson, P. H. F., Cheng, X. G., Lowet, G., Boonen, S., Davie, M. W. J., Dequeker, J., et Van der Perre, G. (1997). Structural and material mechanical properties of human vertebral cancellous bone. *Med. Eng. Phys.*, 19 :729–737.
- Ohser, J. et Mücklich, F. (2000). *Statistical Analysis of Microstructures in Materials Sciences*. J. Wiley & Sons, Chichester.
- Ohser, J. et Nagel, W. (1996). The estimation of the Euler-Poincaré characteristic from observations on parallel sections. *J. Microsc.*, 184(2) :117–126.
- Ohser, J., Nagel, W., et Schladitz, K. (2002). The Euler number of discretized sets - on the choice of adjacency in homogeneous lattices. Technical Report 33, Fraunhofer ITWM.
- Overton, W. S. et Stehman, S. V. (1995). The Horvitz-Thompson theorem as a unifying perspective for probability sampling : with examples from natural resource sampling. *Am. Stat.*, 49 :261–268.
- Pawley, J. B. (1989). *Handbook of Biological confocal Microscopy*.
- Perré, P. et Badel, É. (2003). Predicting of oak wood properties using X-ray inspection : representation, homogenisation and localisation. part II : Computation of macroscopic properties and microscopic stress fields. *Ann. For. Sci.*, 60 :247–257.
- Petracek, P. D. et Bukovac, M. J. (1995). Rheological properties of enzymatically isolated tomato fruit cuticle. *Plant Physiol.*, 109 :675–679.
- Rataj, J. (2004). On estimation of the Euler number by projection of thin slabs. *Adv. Appl. Prob. (SGSA)*, 36(3) :715–724.
- Raynal-Roques, A. (1994). *La botanique redécouverte*. Belon, INRA éditions.
- Redgwell, R. J., MacRae, E., Hallet, I., Fisher, M., Oerry, J., et Harker, R. (1997). In vivo and in vitro swelling of cell walls during fruit ripening. *Planta*, 203 :162–173.
- Reeve, R. M. (1970). Relationships of histological structure to texture of fresh and processed fruits and vegetables. *J. Text. Stud.*, 1 :247–284.
- Salveit, M. E. (1999). Effect of ethylene on fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.*, 15(3) :279–292.
- Scanlon, M. et Zghal, M. (2001). Bread properties and crumb structure. *Food Res. Int.*, 34 :841–864.
- Serra, J. (1982). *Image Analysis and Mathematical Morphology. Volume 1*. Academic Press, London.

- Seymour, G. B., Manning, K., Eriksson, E. M., Popovich, A. H., et King, G. J. (2002). Genetic identification and genomic organization of factors affecting fruit texture. *J. Exp. Bot.*, 53(377) :2065–2071.
- Shotsmans, W., Verlinden, B. E., Lammertyn, J., et Nicolaï, B. M. (2004). The relationship between gas transport properties and the histology of apple. *J. Sci. Food Agric.*, 84 :1131–1140.
- Smith, A. E., Moxham, K. E., et Middelberg, A. P. J. (1998). On uniquely determining cell-wall material properties with the compression experiment. *Chem. Eng. Sci.*, 53(23) :3913–3922.
- Smith, L. G. (2003). Cytoskeletal control of plant cell shape : getting the fine points. *Current Opinion in Plant Biology*, (6) :63–73.
- Snedecor, G. W. et Cochran, W. G. (1971). *Méthodes Statistiques*. Association de Coordination Technique Agricole.
- Soille, P. (2003). *Morphological Image Analysis*. Springer, 2nd edition.
- Stoyan, D., Kendall, W. S., et Mecke, J. (1995). *Stochastic Geometry and its Applications*. John Wiley & Sons, Chichester, 2nd edition.
- Stoyan, D., Mecke, J., et Pohlmann, S. (1980). Formulas for stationary planar fibre process I - partially oriented fibre systems. *Math. Operationforsch. Stat., Ser. Statistics*, 11(2) :281–286.
- Thibaut, B., Gril, J., et Fournier, M. (2001). Mechanics of woods and trees : some new highlights for an old story. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 329 :701–716.
- Thorpe, J. A. (1979). *Elementary topics in differential geometry*. Undergraduate Texts in Mathematics. Springer-Verlag.
- Travis, A. J., Murison, S. D., et Chasson, A. (1993). Estimation of plant cell wall thickness by image skeletonization. *J. Agric. Sci.*, 120 :279–287.
- Tu, K., De Baerdemaeker, J., Deltour, R., et de Barys, T. (1996). Monitoring post-harvest quality of granny smith apple under simulated shelf-life conditions : destructive, non-destructive and analytical measurements. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 31(3) :267–276.
- van Lenthe, G. et Huiskes, R. (2002). How morphology predicts mechanical properties of trabecular structures depends on intra-specimens trabecular thickness variations. *J. Biomechanics*, 35 :1191–1197.
- Vincent, L. et Soille, P. (1991). Watersheds in digital spaces : An efficient algorithm based on immersion simulation. *IEEE Trans. Pattern Anal. Machine Intel.*, 13(6).
- Waldron, K. W., Smith, A. C., Parr, A. J., Ng, A., et Parker, M. L. (1997). New approaches to understanding and controlling cell separation in relation to fruit and vegetable texture. *Trends Food Sci. Technol.*, 8(7) :213–221.

- Wang, C. X., Wang, L., et Thomas, C. R. (2004). Modelling the mechanical properties of single suspension-cultured tomato cells. *Ann. Bot.*, 93(4) :443–453.
- Wardrop, A. B. (1951). Cell wall organization and the properties of the xylem. *Aust. J. Sci. Res.*, 4B :391–417.
- Weibel, E. R. (1979). *Stereological Methods. Vol. 1. Practical Methods for Biological Morphometry*. Academic Press.
- Weil, W. (1988). Expectation formulas and isoperimetric properties for non isotropic boolean models. *J. Microsc.*, 151(3) :235–245.
- Weil, W. (1990). Iterations of translative integral formulae and non-isotropic Poisson processes of particles. *Math. Z.*, 205 :531–549.
- Weil, W. (1995). The estimation of mean shape and mean particle number in overlapping particle systems in the plane. *Adv. Appl. Prob.*, 27 :102–119.
- Weil, W. (1996). The mean normal distribution of stationary random sets and particle processes. In Jeulin, D., editor, *Advances in Theory and Applications of Random Sets, Proc. Internat. Symp.*, pages 21–33, Fontainebleau, France. World Scientific Publications, Singapore.
- Weil, W. (1997). Mean bodies associated with random closed sets. *Suppl. Rend. Circ. Mat. Palermo*, 50(2) :387–412.
- Weil, W. (1999). Intensity analysis of boolean models. *Pattern Recognition*, 32 :1675–1684.
- Weil, W. (2001). Densities of mixed volumes for booleans models. *Adv. Appl. Prob. (SGSA)*, 33 :39–60.
- Weil, W. et Wieacker, J. A. (1984). Densities for stationary random sets and point processes. *Adv. Appl. Prob.*, 16 :324–346.
- Wells, B., McCann, M. C., Shedletzky, E., Delmer, D., et Roberts, K. (1994). Structural features of cell walls from tomato cells adapted to grow on the herbicide 2,6-dichlorobenzonitrile. *J. Microsc.*, 173(2) :155–164.
- Whitney, S. E. C., Gothard, M. G. E., Mitchell, J. T., et Gidley, M. J. (1999). Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls. *Plant Physiol.*, 121 :657–663.
- Wu, N. et Pitts, M. (1999). Development and validation of a finite element model of an apple fruit cell. *Postharvest Biol. Technol.*, 16 :1–8.
- Zähle, M. (1984). Curvature measure and random sets, I. *Math. Nachr.*, 119 :327–339.
- Zähle, M. (1986). Integral and current representation of Federer's curvature measures. *Arch. Math.*, 46 :557–567.
- Zähle, M. (1987). Curvatures and currents for unions of sets with positive reach. *Geom. Dedicata*, 23 :155–171.

- Zghal, M. C., Scanlon, M. G., et Sapirstein, H. D. (2002). Cellular structure of bread crumb and its influence on mechanical properties. *J. Cer. Sci.*, 36 :167–176.
- Zhu, H. et Windle, A. (2002). Effects of cell irregularity on the high strain compression of open-cell foams. *Acta Materialia*, 50 :1041–1052.
- Zhu, H. X., Hobbdel, J., et Windle, A. H. (2001). Effects of cell irregularities on the elastic properties of 2D Voronoi honeycombs. *J. Mech. Phys. Solids*, 49 :857–870.
- Zhu, H. X. et Melrose, J. R. (2003). A mechanical model for the compression of plant and vegetative tissue. *J. Theor. Biol.*, 221 :89–101.