

Caractérisation statistique d'une assemblée de nanotubes en imagerie microscopique

Pierre CHAINAIS¹, Bérengère LEBENTAL²

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

²Université Paris-Est, IFSTTAR
58 boulevard Lefebvre 75732 Paris Cedex 15, France

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

Résumé – Le prototypage de la plupart des dispositifs incorporant des nano-objets nécessite une bonne maîtrise des techniques de manipulation des nanoparticules. Les différents procédés de fabrication sont en général validés à l'aide d'images de microscopie souvent interprétées de manière qualitative. Une caractérisation systématique et automatique de ces images est particulièrement désirable pour mieux contrôler ces procédés. Nous nous intéressons ici à des images en microscopie électronique à balayage de nanomembranes de nanotubes de carbone utilisées dans des capteurs ultrasoniques. Pour caractériser de façon reproductible ces membranes, nous avons développé une chaîne complète de traitement d'image. Les principales étapes sont un débruitage anisotrope, une amélioration de contraste et une segmentation utilisant la morphologie mathématique ainsi qu'une estimation de l'orientation locale des filaments grâce au tenseur de structure. Nous abordons aussi l'extraction de filaments individuels. La méthode développée n'implique aucune intervention de l'utilisateur et peut être utilisée automatiquement sur des ensembles de plusieurs centaines d'images. Nous avons obtenu pour la première fois des histogrammes détaillés de l'orientation d'assemblées de nanotubes et accédons ainsi à une mesure objective de la qualité de l'alignement des nanotubes, essentielle pour le développement de dispositifs aux propriétés physiques bien contrôlées.

Abstract – The prototyping of nano-objects based devices requires well-mastered processes for the manipulation of nano-objects. However, the various manufacturing processes are validated thanks to microscopy images that are most often interpreted qualitatively. A systematic and automatic characterization of these observations would be highly valuable to devise reliable processes. In the present paper, we specifically focus on carbon nanotubes membranes used in ultrasonic sensors. To characterize the membranes reproducibly, we developed a complete procedure for the processing of scanning electron microscopy images. The main steps are anisotropic denoising, contrast enhancement, segmentation based on mathematical morphology and estimation of the local orientation of filaments by using structure tensors. We also deal with the extraction of individual filaments. This approach does not require any user interaction and can be used in a fully automated way on hundreds of images. We obtained for the first time detailed histograms of the nanotubes orientations within the assembly. The histograms provide objective indicators of the quality of the alignment of nanotubes. It is essential to develop devices with well controlled physical properties.

1 Introduction

Dans le domaine des nanotechnologies, les dispositifs intègrent souvent des distributions de nano-objets, tels que nanotubes ou nanofils. Les caractéristiques statistiques de ces distributions de nano-objets déterminent les propriétés physiques des dispositifs. Nous nous intéressons ici à de fines nanomembranes (20 nm d'épaisseur) constituées de nanotubes de carbone déposés entre deux électrodes en or espacées de 1 μm , fig. 1(a). Ces membranes, suspendues et mises en vibration, constituent la brique élémentaire de microtransducteurs ultrasonores capacitifs destinés à des applications en instrumentation [1]. La densité et le degré d'alignement des nanotubes de ces membranes doivent être bien contrôlés pour assurer un fonctionnement reproductible du dispositif. La microscopie électronique à balayage (MEB) est couramment utilisée dans ce

but, mais les images ne sont exploitées que par des techniques manuelles [2]. Nous proposons une méthode reproductible de caractérisation quantitative de telles assemblées de filaments.

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

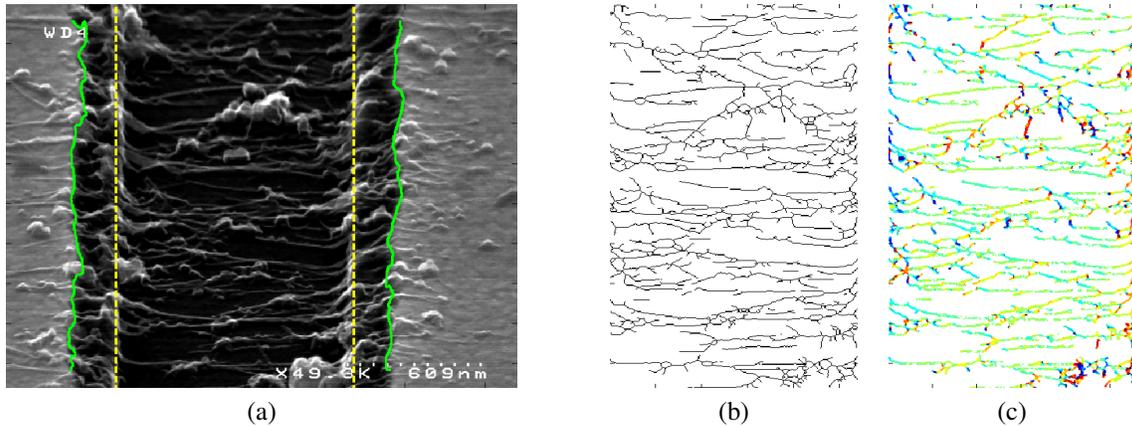


FIGURE 1 – (a) Image MEB d’une membrane de nanotubes déposés entre deux électrodes en or. Les électrodes (contours verts) sont les régions brillantes à gauche et à droite. La région d’intérêt se trouve entre les lignes pointillées jaunes ; (b) squelette des nanotubes dans la région d’intérêt ; (c) la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

tenseur de structure notamment. Nous en déduisons des indicateurs statistiques pertinents et objectivement comparables d’un échantillon à l’autre. De plus, le codage couleur de l’orientation locale améliore la lisibilité des images segmentées, ce qui est utile pour un premier jugement visuel, fig. 1(c).

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

2 La chaîne complète de traitement

Ce travail est motivé par le souhait de comparer un ensemble de 660 images MEB de taille 480x640. Lors de l’acquisition, la membrane est inclinée de 45° par rapport au faisceau d’électrons. Certaines images peuvent être franchement bruitées. Nous souhaitons estimer la position mais aussi la largeur et surtout l’orientation locale des nanotubes. Nous nous intéressons uniquement à la partie suspendue des nanotubes, ce qui nécessite la détection des électrodes, voir fig. 1(a).

2.1 Pré-traitement des images et segmentation

La première étape est un débruitage par diffusion anisotrope (GREYStoration) [7] qui préserve remarquablement les bords des électrodes aussi bien que la géométrie filamenteuse des nanotubes. La détection des électrodes, nécessaire pour définir la région d’intérêt -voir fig. 1(a)- est réalisée après un fort débruitage (10 itérations) et convolution par une fonction de forme

”aiguille” verticale de 20 pixels de long et de profil transversal gaussien ($\sigma = 3$ pixels). Le reste de la procédure utilise les images légèrement débruitées (2 itérations) de façon à ne pas abîmer les nanotubes. La correction du fond non-uniforme est obtenue grâce à une soustraction du fond morphologique utilisant un disque de rayon 15 pixels comme élément structurant [8]. L’amélioration de contraste utilise une opération de filtrage morphologique. Le principe du filtre est de créer une ouverture de l’image initiale avec chacun des éléments structurants qui sont ici 16 segments de droites discrets de longueur 17 pixels (largeur maximum typique des nanotubes) et d’orientations régulièrement espacées de 0° à 180° . Chaque élément a pour effet de sélectionner dans l’image les objets possédant la même orientation que lui. L’image finale est obtenue en affectant en chaque pixel la différence des valeurs maximale et minimale sur les 16 images.

L’image est alors normalisée entre 0 et 1 avant un seuillage en niveau de gris. Le seuil peut être fixé à la main ou être optimisé de façon non supervisée entre 0.05 et 0.35 *a priori*. Dans ce dernier cas, le seuil est déterminé itérativement en étudiant l’évolution de la longueur totale du squelette résultant lorsque le seuil augmente à partir de sa valeur minimale. En effet, la longueur du squelette varie rapidement pour de faibles valeurs de seuil, puis faiblement lorsque seuls les nanotubes sont reconnus dans l’image. Le seuil optimal correspond à la transition entre ces régimes. Après ce seuillage, nous utilisons des opérations classiques de morphologie mathématique [8] (fonction MATLAB `bwmorph`) pour ne conserver que le squelette de l’image obtenue (option `thin`) et éliminer les points isolés (option `clean`).

2.2 Estimation des histogrammes d’orientation locale

Nous déterminons l’orientation locale des nanotubes après un lissage par une gaussienne à l’échelle 1,5 pixels. Pour une

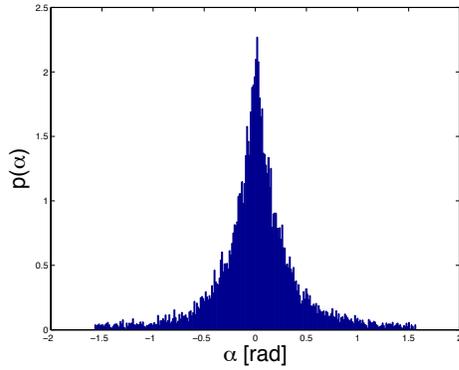


FIGURE 2 – Histogramme des orientations d'une image. Une distribution piquée est caractéristique d'un bon alignement.

image $f(x_1, x_2)$, l'estimation de l'orientation du premier vecteur propre associé à la plus grande valeur propre du tenseur de structure $\mathbf{S} = (\partial_i f \partial_j f)_{1 \leq i, j \leq 2}$ fournit cette information. On peut montrer qu'il s'agit de la direction du gradient orienté maximal [9]. Nous utilisons l'implémentation de G. Peyré¹. L'estimation de l'orientation est ensuite lissée par un noyau gaussien à l'échelle 3 pixels horizontalement et 1 pixel verticalement. Remarquons que la représentation du squelette des nanotubes est notablement améliorée par le codage couleur des orientations de bleu (-90°) à rouge ($+90^\circ$), voir fig. 1(c). Les histogrammes sont calculés pour 256 directions linéairement espacées $-90^\circ < \alpha \leq 90^\circ$, l'horizontale correspondant à 0° .

Les orientations locales sont affectées par l'inclinaison de l'échantillon à 45° autour d'un axe horizontal pendant l'acquisition MEB. Nous en tenons compte non seulement dans la détermination des orientations, mais aussi dans le calcul des histogrammes. Soit β l'angle entre le plan de l'échantillon et le plan de l'image. Soit α (resp. α') l'orientation locale dans chacun des plans. On a la relation

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

qui permet de déterminer l'orientation dans le plan de l'échantillon en fonction de l'orientation estimée dans l'image. L'historgramme est initialement estimé en nombre de pixels. Cependant le poids réel de chaque pixel du squelette de l'image correspond à une longueur effective de nanotube qui dépend de son orientation, les poids des éléments verticaux étant sous-estimés. L'historgramme physiquement pertinent s'exprime en longueur cumulée de nanotubes segmentés. Nous introduisons donc un facteur de pondération des pixels correspondant au rapport entre la longueur ℓ d'un filament dans le plan de l'échantillon et sa longueur apparente ℓ' dans le plan de

l'image. Ce rapport vaut $\sqrt{\frac{(1 + \tan^2 \alpha)}{(1 + \tan^2 \alpha \cos^2 \beta)}}$.

2.3 Indicateurs statistiques pertinents

Munis d'un tel histogramme, nous pouvons définir des indicateurs quantitatifs objectifs de qualité d'alignement des assemblées de nanotubes.

La surface de l'historgramme avant normalisation correspond à la longueur totale du squelette. Le rapport entre cette quantité et la largeur de l'image définit un nombre moyen de nanotubes dans l'image ; rapporté à la hauteur de l'échantillon observé nous obtenons une densité moyenne de nanotubes par unité de longueur des électrodes, une quantité usuelle de la littérature sur les nanotubes et nanofils.

La qualité de l'alignement des nanotubes est habituellement caractérisée par le paramètre d'ordre $\langle \cos^2 \alpha \rangle$ issu des mesure de polarisation de la lumière [10]. Ce paramètre vaut 1 pour un alignement parfait et 0,5 pour une distribution uniformément isotrope. Ce paramètre n'est pas très sensible au caractère plus ou moins piqué de la distribution de α puisque la dérivée de $\cos^2 \alpha$ est nulle en 0. Nous utilisons par conséquent des indicateurs complémentaires tels que l'écart-type mais surtout la proportion (en longueur réelle) de nanotubes pointant dans un secteur angulaire donné autour de l'horizontale, par exemple $\pm 20^\circ$. Ce dernier indicateur rend bien mieux compte que l'écart-type ou le paramètre d'ordre de la forme plus ou moins piquée des histogrammes.

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

2.4 Extraction de filaments individuels

Nous souhaitons également identifier les filaments individuellement. Une première approche en ce sens repose sur le suivi de particules inertielles se déplaçant le long du squelette. Les filaments isolés sont facilement identifiés par un simple étiquetage des composantes connexes du squelette. Les difficultés apparaissent lorsque plusieurs filaments se croisent, sans structure a priori. Dans ces régions où apparaît au moins 1 intersection nous utilisons la procédure itérative suivante. On lance une particule à une l'extrémité (1-connectivité) avec une vitesse \mathbf{v}_0 selon l'orientation locale estimée. Au pas de temps n , la particule se déplace vers le pixel le plus proche (s'il existe) dans un secteur de $\pm 45^\circ$ sur le squelette. La mémoire inertielle de la particule est introduite en posant $\mathbf{v}_n \leftarrow \sum_{k=0:3} h_k \mathbf{v}_{n-k}$ avec $h_k = 1/2^k$; on impose ensuite $\|\mathbf{v}_n\| = 1$. On considère qu'un filament individuel est extrait lorsqu'une autre extrémité est atteinte. On itère jusqu'à ce que toute la région connexe ait été visitée. La figure 3 illustre le résultat de cette procédure sur un exemple. Cette méthode ne fonctionne pour l'instant effi-

1. www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/5103

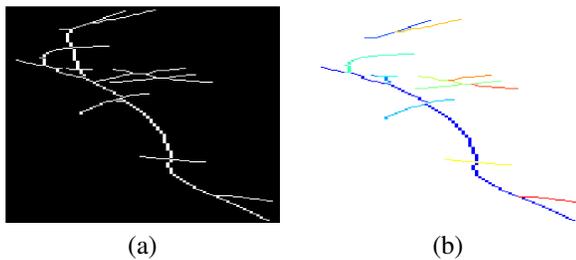


FIGURE 3 – (a) Squelette de filaments superposés ; (b) chaque couleur correspond à un filament individuel.

cacement que pour des distributions peu denses de nanotubes. Nous étudions le traitement d’images plus complexes.

3 Application et résultats

Le traitement de chaque image ne prend que quelques secondes, sans intervention de l’utilisateur. Un ensemble de 660 images peut ainsi être traité en quelques dizaines de minutes sur un PC. L’indispensable analyse des images est considérablement simplifiée par rapport aux techniques existantes et fournit de précieuses informations. Nous avons pu déterminer une densité verticale moyenne de 19 nanotubes/ μm . Nous avons observé des histogrammes d’orientation le plus souvent piqués autour de 0 (non gaussiens, voir fig. 2) avec un paramètre d’ordre $\langle \cos^2 \alpha \rangle$ variant de 0.5 (distribution isotrope) à 0.93 (alignement horizontal quasi-parfait) pour des écart-types variant de 50° à 13° . Ces valeurs se comparent très favorablement aux meilleurs résultats de la littérature sur les nanotubes, confirmant l’intérêt des nanomembranes étudiées.

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

4 Conclusion

La procédure présentée ici de traitement d’images de nanotubes de carbone en microscopie électronique fournit une estimation précise de la distribution des orientations locales des nanotubes de manière non supervisée et applicable à des centaines

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

Références

- [1] B. Lebental et al., “Carbon nanotubes based ultrasonic microtransducers for durability monitoring in civil engineering,” *Eur. J. of Env. Civ. Eng.*, vol. 15, no. 4, pp. 649–662, 2011.
- [2] J.M. Russel et al., “Alignment of nematic liquid crystals using carbon nanotubes films,” *Thin Solid films*, vol. 509, pp. 53–57, 2006.
- [3] E. Meijering et al., “Neurite tracing in fluorescence microscopy images using ridge filtering and graph searching : principles and validation,” in *IEEE Int. Symp. on Biomed. Im.*, April 2004, vol. 2, pp. 1219–1222.
- [4] B. Bödvarsson et al., “A morphological image processing method for locating myosin filaments in muscle electron micrographs,” *Im. Vis. Comp.*, vol. 26, no. 8, pp. 1073–1080, 2008.
- [5] C. Kirbas and F.K.H. Quek, “Vessel extraction techniques and algorithms : a survey,” in *3rd IEEE Symp. on Bioinfo. & Bioeng.*, 2003, pp. 238–245.
- [6] I. Laptev et al., “Automatic extraction of roads from aerial images based on scale space and snakes,” *Mach. Vis. & App.*, vol. 12, pp. 23–31, 2000.
- [7] D. Tschumperlé, “Fast anisotropic smoothing of multi-valued images using curvature-preserving PDE’s,” *Int. J. of Comp. Vis.*, vol. 68, no. 1, pp. 65–82, 2006.
- [8] P. Soille, *Morphological image analysis*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1999.
- [9] E. Fonck et al., “Effect of aging on elastin functionality in human cerebral arteries,” *Stroke*, vol. 40, no. 7, pp. 2552–2556, 2009.
- [10] J. Lagerwall et al., “Nanotube alignment using lyotropic liquid crystals,” *Adv. Mater.*, vol. 19, pp. 359–364, 2007.