

Influence du rapport d'agrandissement sur deux méthodes d'analyse informatisée d'image de microscopie électronique à balayage

Ph. GUIGNES¹, J. FAURE², A. MAURETTE³

¹Département d'Odontologie Conservatrice — Endodontie, Pr. A. Maurette, Faculté de Chirurgie-Dentaire, Toulouse III, France.

²Laboratoire de Biologie Buccale et Matières Fondamentales, Pr. J.P. Lodter, Faculté de Chirurgie-Dentaire, Toulouse III, France.

³Département d'Odontologie Conservatrice — Endodontie, Faculté de Chirurgie-Dentaire, Toulouse III, France.

RESUME

Le but de cette étude est de comparer deux méthodes informatisées d'analyse de clichés de microscopie électronique à balayage de parois dentinaires, et d'évaluer l'influence du rapport d'agrandissement ($\times 750$, $\times 5000$). La première méthode, servant de référence, fait appel à un marquage des régions d'intérêt et une mesure secondaire. La seconde technique utilise le seuillage des niveaux de gris. Une méthode informatisée de mesure des surfaces recouvertes de smear-layer par sélection des niveaux de gris n'est fiable qu'à un fort rapport d'agrandissement ($\times 5000$).

MOTS CLES:

MEB, analyse d'image, agrandissement.

ABSTRACT

The aim of this study is to compare two computerized analysis methods of SEM dentinal walls views. The first technic is an indirect one using a primary marking and a secondary measurement. The second one is a direct threshold analyse, using the grey levels selection. The influency of the magnification is analysed in a second part.

The first technic is considered as a reference one. The results show that the threshold measurement technic is only reliable at a high magnification. A direct surface measurement cannot be used at a low magnification.

A pretreatment could enhance the ability of a computer to measure the areas covered with smear-layer or organic debris on SEM micrographs.

KEY WORDS:

SEM, computerized image analysis, magnification.

1. INTRODUCTION

L'appréciation de l'état de surface de la dentine après divers traitements chimico-mécaniques est une application importante de la microscopie électronique à balayage en recherche odontologique. Si les protocoles de préparation ont été abondamment décrits, les techniques d'évaluation des résultats restent

qualitatives et soumises à l'entière subjectivité des opérateurs.

En endodontie les critères appréciés sont généralement l'importance du dépôt de débris organiques, ou de smear-layer présents à la surface de la dentine endocanalaire, Cameron (1983, 1987), Goldman & Coll (1979), Yamada & Coll. (1983), Baker & Coll. (1975, 1988), Ahmad & Coll. (1987), Bolands &

Coll. (1988), Cymerman & Coll. (1983), ainsi que la visualisation plus ou moins nette de l'entrée des tubuli dentaires.

La méthode la plus classique consiste à faire examiner les clichés en double aveugle par différents expérimentateurs et à les noter selon une échelle de 0 à 4, Ahmad (1987), qui tient compte de la quantité de smear-layer. Le premier, Goldman (1981) a cherché à avoir une approche quantitative et non plus qualitative du problème par l'intermédiaire de grilles millimétrées transparentes apposées sur les clichés de M.E.B.

L'utilisation de techniques informatisées de mesure ou de comptage est déjà largement répandue dans les domaines de la radiologie ou de la cytologie quantitative. Ces méthodes commencent à faire leur apparition dans notre discipline, Jasty & Coll. (1989), Shimizu & Coll. (1988), Roulet & Coll. (1989), Grine & Coll. (1988), Guignes & Coll. (1991, 1992) d'où l'idée d'utiliser conjointement avec les images de M.E.B. un système de traitement et d'analyse d'image.

Le but de ce travail est d'étudier:

— la fiabilité de deux techniques d'analyse de clichés de microscopie électronique à balayage de parois dentinaires endocanalaire:

* indirecte par marquage et mesure secondaire,

* directe par seuillage et binarisation;

— l'influence du rapport d'agrandissement sur ces deux méthodes.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Composition de l'échantillon

Deux séries de clichés photographiques de parois dentinaires réalisées sur film Polaroid à développement immédiat sont utilisées:

— Groupe 1 (Gr 1): 20 images à un rapport d'agrandissement $\times 5000$;

— Groupe 2 (Gr 2): 20 images à un rapport d'agrandissement $\times 750$.

Ils représentent divers aspects caractéristiques en microscopie électronique à balayage de parois dentinaires endocanalaire après réalisation d'une préparation par une séquence instrumentale mixte (manuelle et ultrasonore).

Les dents ont toutes été examinées à l'aide d'un microscope électronique à balayage Cambridge Stéréo Scan S250 (Cambridge Instrument) avec les constantes d'examen suivantes: distance de travail

35 mm, inclinaison du support 0° , tension d'accélération 15 Kv. L'analyse fait appel à la détection des électrons secondaires.

2.2. Chaîne de traitement

Elle comprend:

— une unité de saisie composée d'une caméra vidéo CCD Type DCX 101 P (Sony Corporation-Japon) disposée sur un statif éclairé de façon constante par quatre lampes spot 100 watts, ainsi qu'un système de positionnement des photos;

— une interface de digitalisation: la carte Optiscan;

— une unité de traitement composée d'un ordinateur Macintosh IICX (Apple computer) et de ses périphériques d'entrée et de sortie;

— une unité de stockage comprenant le disque dur du système (40 Mo) ainsi qu'une extension mémoire de 40 Mo grâce à un système Bernoulli;

— une unité de contrôle: moniteur TV Sony.

Les logiciels utilisés sont:

— Neotech Image Graber TM 2.03 pour la saisie (Neotech Ltd);

— Optilab TM 24, 2.04 pour le traitement (Graftek-Paris).

2.3. Méthodes d'analyse

Préalablement à toute analyse, il paraît nécessaire de définir le terme d'image et d'image numérisée.

En M.E.B. l'image est une représentation graphique noir et blanc, appelée image monochrome, qui orientée selon un repère orthonormé peut être représentée par une fonction $f(x, y)$. Elle est donc une représentation mathématique ou f représente l'intensité lumineuse, également appelé la densité optique, en tout point de coordonnées (x, y) .

Après digitalisation cette image peut s'écrire sous forme de tableau de chiffres dont le nombre de lignes et de colonnes est fonction des caractéristiques du digitaliseur utilisé. La case ou pixel est l'élément de base de cette image.

2.3.1. TECHNIQUE 1 (T1): Analyse directe

Cette technique est l'application informatisée d'une méthode d'analyse par grilles millimétrées. Elle servira de méthode de référence.

Elle comprend un marquage primaire puis une mesure secondaire.

Quatre phases vont se succéder:

- 1) détermination des régions recouvertes de smear-layer ou de débris organiques à l'aide d'un stylo électronique se déplaçant sur l'écran, délimitation de leurs contours;
- 2) soustraction des zones précédemment tracées du fond de l'image;
- 3) mesure du pourcentage de pixels composant ces zones par rapport au nombre de pixels total de l'image;
- 4) l'analogie pixel=surface permet d'interpréter ces chiffres en terme de surface.

Les figures 1 et 2 montrent le déroulement du processus sur une image du groupe 1.



Fig. 1: Cliché de paroi dentinaire en M.E.B. après préparation ultrasonore, $\times 750$.

Fig. 1: SEM dentinal wall micrograph after ultrasound preparation, magnification $\times 750$.

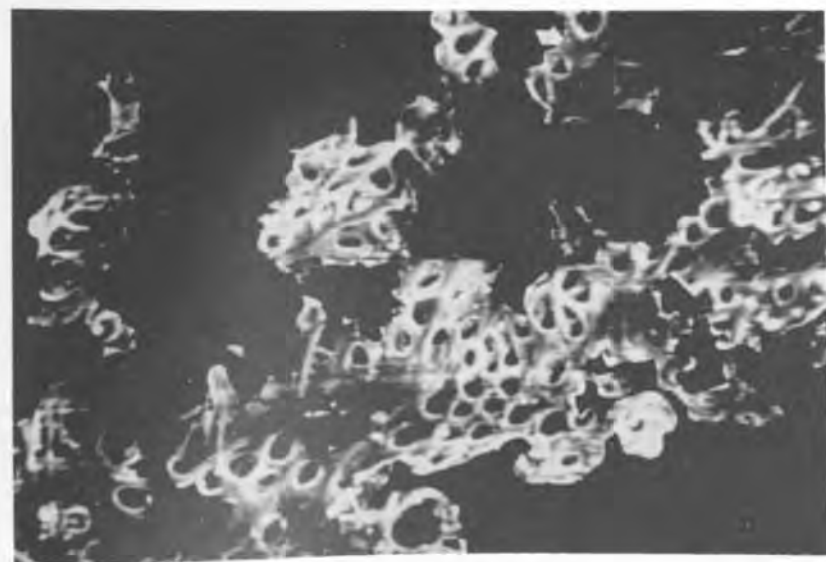


Fig. 2: Technique 1. Marquage à l'aide du curseur. Les zones sélectionnées apparaissent en noir.

Fig. 2: Technic 1. Marking with the aid of a cursor. The selected areas appear in black.

2.3.2. TECHNIQUE 2 (T2): Analyse indirecte par seuillage

Préalablement à la description de la technique proprement dite, définissons la notion d'histogramme, De Coulom (1985), Marion (1987).

Prenons le cas d'une image continue dont la densité lumineuse croît régulièrement de la périphérie vers le centre. On peut définir une fonction $S(D)$ qui dépend de la densité et qui est égale à la surface des zones de l'image, de densité inférieure à D . Cette fonction croît avec D , atteignant la totalité de l'image pour sa valeur maximale.

Si l'on considère de la même façon une densité comprise entre D et $D + dD$, la surface correspondante est égale à $S(D + dD) - S(D)$.

Ceci peut s'écrire $S(D + dD) - S(D) = S'(D)d(D)$

et $S'(D)$ est la fonction dérivée de $S(D)$ quand $d(D)$ tend vers 0; cette fonction est appelée histogramme et notée $h(D)$.

Sur un plan pratique l'étude de l'histogramme met en évidence:

- le nombre de pixels affecté à chaque niveau;
- la répartition des niveaux de gris.

Ces deux données permettent de juger:

- la dynamique de l'image;
- le niveau de gris moyen.

Elles vont aussi permettre le choix du seuil dans la technique de seuillage.

Le postulat ayant amené à l'utilisation de cette technique est lié au principe de formation de l'image dans un M.E.B. et en particulier du contraste. L'interaction faisceau d'électron incident-échantillon entraîne l'apparition d'électrons secondaires vrais (électrons arrachés aux couches externes des atomes de l'échantillon sous l'influence du faisceau incident). Le contraste de l'image est déterminé par l'inclinaison et la quantité d'électrons émis localement par l'échantillon. Nous aurons donc un rendement proportionnel à sa topographie et à sa composition chimique.

Ces différences liées à la nature chimique et à la morphologie de surface vont avoir une traduction lumineuse.

L'œil ne pouvant distinguer qu'environ une quinzaine de nuances de gris, l'utilisation d'un système de traitement et d'analyse d'image devrait permettre un isolement de certaines structures par leurs caractéristiques photométriques et en particulier leurs niveaux de gris.

Dans notre cas, le seuillage est donc l'opération qui consiste à isoler les débris présent à la surface dentinaire par l'intermédiaire de leurs niveaux de gris.

Cette analyse se décompose en cinq temps: (figures 3 à 6)

1. Examen de l'histogramme de répartition des niveaux de gris.
2. Réalisation de trois profils de lignes dans la partie supérieure, médiane et inférieure des images. Ces profils permettent de visualiser la répartition des niveaux de gris sur une ligne quelconque, dont les coordonnées initiales et terminales sont déterminées par l'opérateur. Ils permettent d'évaluer les niveaux de gris correspondant aux zones à isoler (tubuli dentinaires, smear-layer ou débris organiques).
3. Détermination des bornes de la plage de seuillage.
4. Binarisation de l'image. Tous les pixels situés dans la zone choisie seront affectés de la valeur 1, ceux hors zone de la valeur 0 (image binaire visualisée en deux pseudo-couleurs).
5. Mesure du nombre de pixels affecté à chaque niveau.

Chaque mesure a été répétée trois fois par le même opérateur.

Moy: 117.48 Sigma: 83.94

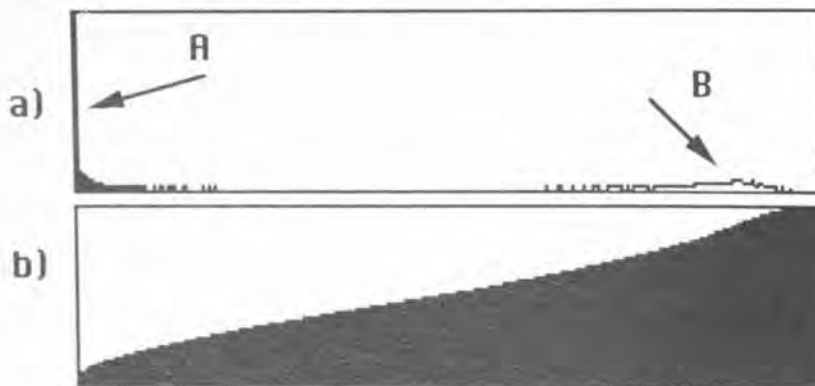


Fig. 3: a) Histogramme linéaire montrant la répartition des niveaux de gris de la fig. 1. On notera la présence de deux pics le premier correspondant au fond de l'image (A) paroi dentinaire, le second au débris organique ou à la smear-layer (B).
b) Histogramme cumulé.

Fig. 3: a) Linear histogramme showing the grey levels repartition from the figure 1. We could note the presence of two peaks, the first one corresponding to the background of the image (A: dentinal wall), the second one corresponding to the smear-layer or to the organic debris (B).
b) Cumulated histogramme.

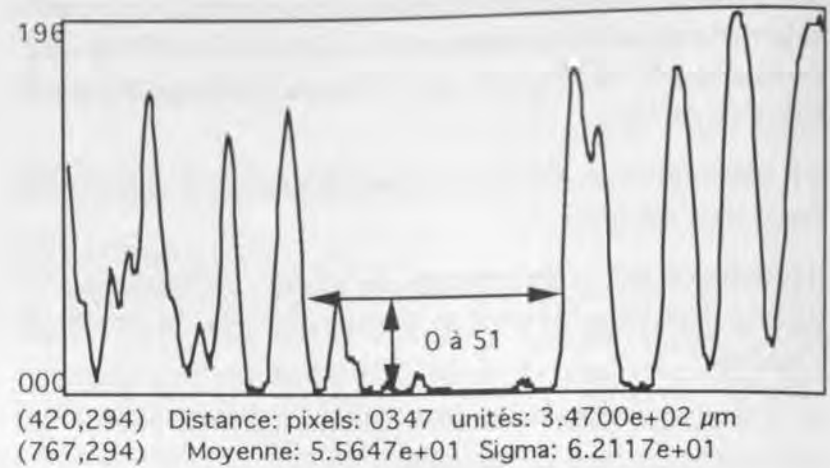


Fig. 4: Profil de ligne. Répartition des niveaux de gris sur la ligne A-B (flèche fig. 1). Notez que la paroi dentinaire se situe entre les niveaux 0-51; les zones recouvertes de débris entre 145 et 255.
Fig. 4: Line profile. Repartition of the grey levels on the line A-B (fig. 1). The dentinal wall is situated between the level 0 and 51, the areas covered with smear-layer between 168 and 255.

Moy: 117.48 Sigma: 83.94

47,28%

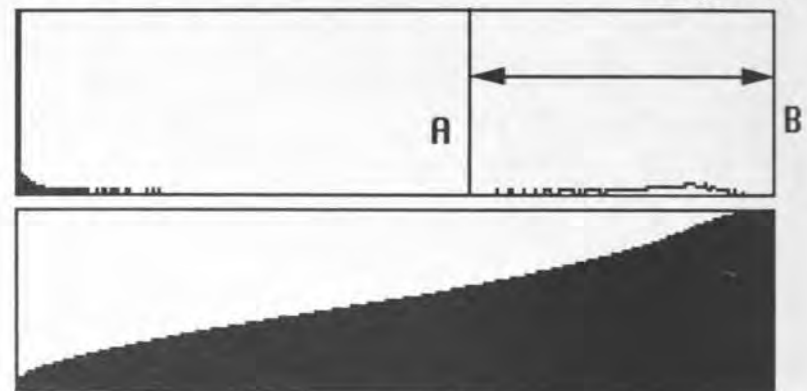


Fig. 5: Technique 1. Seuillage: de A à B zone sélectionnée. Coin supérieur droit de l'histogramme: affichage du pourcentage de pixels composant cette zone par rapport à l'ensemble des pixels de l'image.

Fig. 5: Technic 1. Threshold: Selected zone, from A to B. Left right upper corner: Percentage of pixels of these zone compared to the total number of pixel of the image.

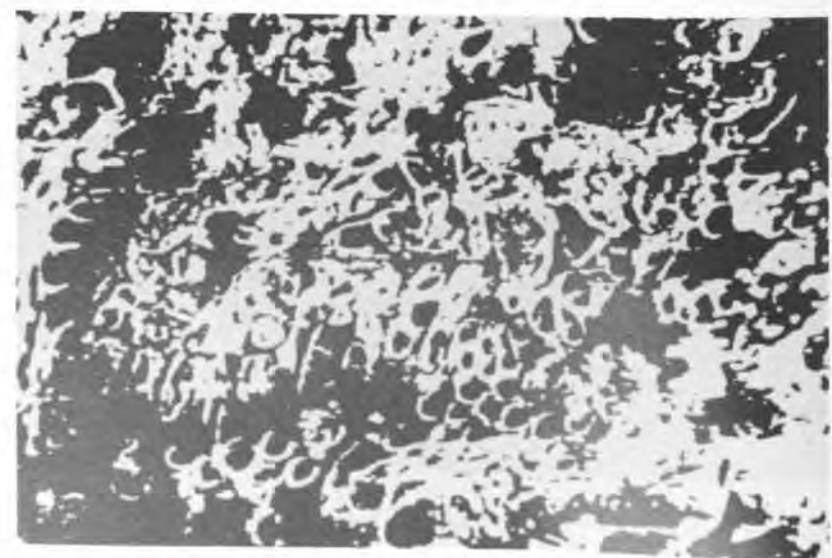


Fig. 6: Résultats du seuillage, image binaire.
Fig. 6: Binary image after threshold technic.

2.4. Etude statistique

Les résultats d'analyse par les techniques de seuillage ou de mesure directe sont exprimés en pourcentage de surface examinée, recouverte de smear-layer ou de débris organiques.

Une analyse de l'écart moyen entre les surfaces mesurées par les méthodes T1 et T2 ainsi qu'une analyse de la distribution en fréquence des différents modes est effectuée.

Au sein de chaque groupe les techniques T1 et T2 sont comparées par le test t de Student appliqué aux séries appariées. Une différence est considérée comme statistiquement significative si le degré de signification bilatéral est inférieur à 5 % ($p < 0,05$). L'analyse a été effectuée grâce au logiciel Stat View™II (Abacus Concept, Berkeley, USA).

3. RESULTATS

3.1. Groupe 1 (x 5000):

L'écart moyen T2-T1 est de 2,597, avec une déviation standard de 1,591 et un écart type de 0,356.

La moyenne s'établit entre les bornes -5,49 et 5,99.

L'analyse de la répartition en fréquence fait apparaître 80 % de mesures inférieures à 3,339, le mode étant situé dans la fourchette de valeurs 0,69-1,23 qui représente 25 % des cas.

Il existe une différence négative entre T1 et T2 dans 30 % des cas, les mesures obtenues par T2 étant supérieures à celles obtenues par T1 dans 70 % des cas.

Il n'existe pas de différence statistiquement significative entre T1 et T2 ($t = -1,121$, $p = 0,2761$) (Fig 7).

Test-t apparié X 1: GR1-T1 Y 1: GR1-T2			
DDL :	Moy. X - Y:	T apparié :	Prob. (bilatéral):
19	-,754	-1,121	,2761

Test-t apparié X 2: GR2-T1 Y 2: GR2-T2			
DDL :	Moy. X - Y:	T apparié :	Prob. (bilatéral):
19	-5,603	-3,026	,0069

Fig. 7: Test t de Student Fischer, bilatéral sur séries appariées.
Fig. 7: Student's t Test, paired and double sided test.

Le carré du coefficient de corrélation ($r^2 = 0,986$) très fortement positif indique une corrélation réelle entre les deux techniques (Fig 8).

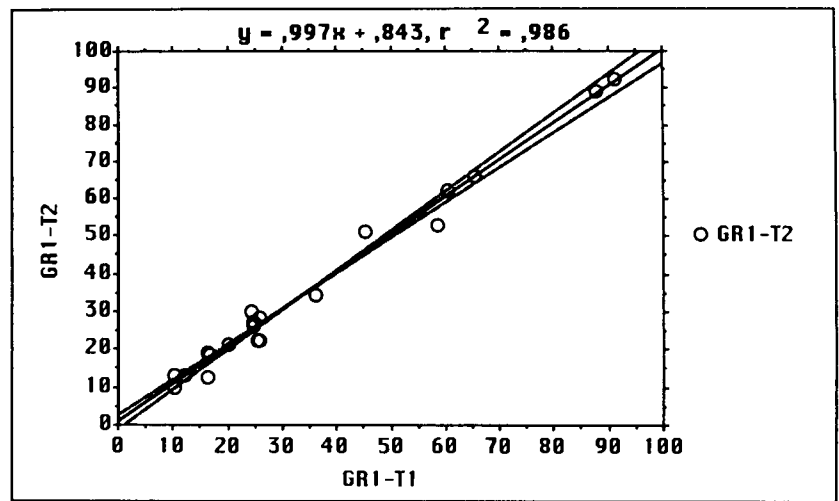


Fig. 8: Groupe 1. Analyse de la droite de régression, T2 par rapport à T1. L'intervalle de confiance à un niveau de 95 % est représentée de part et d'autre de la droite de régression.
Fig. 8: Group 1. Regression line analysis, relationship between T2 and T1. Confidence interval (5 %) for the regression line.

3.2. Groupe 2 (x 750)

La moyenne des écarts est de 5,603 avec une déviation standard de 8,281 et un écart type de 1,852.

Cette moyenne s'établit entre les bornes -13,08 et 27,68 donc une étendue de 40,76.

L'analyse de la répartition en fréquence montre qu'il existe 50 % des valeurs situées entre 3,624 et 7,8.

On ne trouve une différence négative entre T1 et T2 que dans 15 % des cas, les mesures obtenues par T2 étant le plus souvent supérieures à celles obtenues par T1.

Une différence statistiquement significative existe entre la technique 1 et 2 ($t = -3,026$, $p = 0,0069$) $p < 0,05$ (Fig 7).

Le carré du coefficient de corrélation ($r^2 = 0,893$) est très fortement positif (Fig 9).

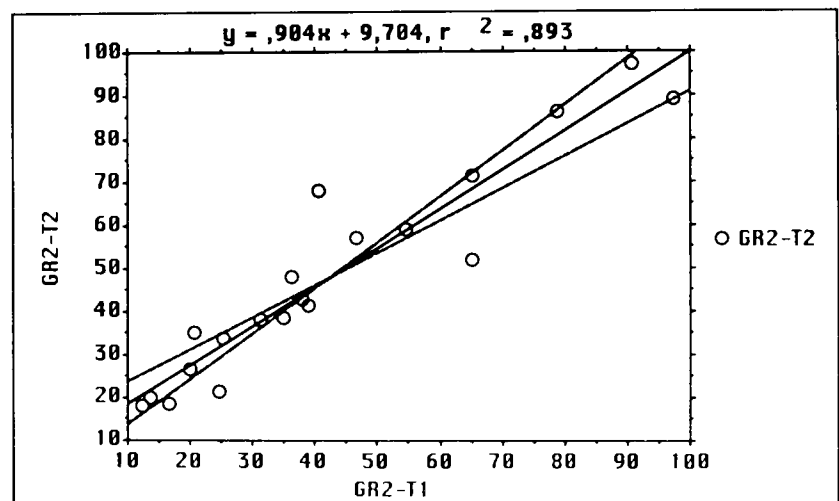


Fig. 9: Groupe 2. Analyse de la droite de régression.
Fig. 9: Group 2. Regression line analysis.

4. DISCUSSION

L'analyse en double aveugle des clichés de M.E.B. de parois dentinaires, méthodologie la plus employée actuellement, présente tous les inconvénients liés à la subjectivité des opérateurs. Une appréciation uniquement qualitative des résultats ne permet pas d'obtenir une analyse comparative fiable des différentes techniques de préparation mécaniques. Seule une analyse quantitative permet de différencier leurs efficacités.

La méthode de marquage et de mesure secondaire facilite ce travail par une mesure automatisée extrêmement précise des régions d'intérêt. Cette technique, utilisée ici comme méthode de référence demeure néanmoins compliquée, nécessitant un temps de travail important et présentant toutes les sources d'erreurs liées au choix par l'opérateur des zones mesurées.

Elle est facile à mettre en œuvre dans le cas d'image à fort rapport d'agrandissement, plus délicate dans le cas d'image à faible rapport. Une image à un rapport d'agrandissement de 750 laisse apparaître plusieurs dizaines d'entrées de tubuli dentinaires, alors qu'à $\times 5000$ seul 4 à 5 tubulis sont visibles. L'accroissement de la taille de la zone examinée entraîne une diminution du contraste entre smear-layer ou débris organiques et la paroi dentinaire; ce qui accentue les erreurs lors du marquage.

De plus la qualité photographique des images est un paramètre intervenant de façon plus marquée à faible agrandissement.

Si nous prenons le cas de l'étude de l'efficacité des ultrasons comme système de nettoyage endocanalaire, l'étude de la littérature met en évidence une grande diversité de résultats concluant tantôt à l'efficacité, tantôt à l'inefficacité de cette méthode Martin et Coll. (1982), Dietschi & Coll. (1984), Auther & Coll. (1984), Cameron (1983, 1987), Goldman & Coll. (1979), Ahmad & Coll. (1987), Cymermann (1983). Cette diversité peut s'expliquer par l'absence d'examen systématique d'un grand nombre de zones. Même si l'analyse en double aveugle diminue ce facteur subjectif, la mesure demeure imprécise.

L'utilisation de grilles millimétrées apporte une réponse partielle à ce type de problèmes mais nécessite un temps important de manipulation. La technique de marquage est la simple transposition informatique de cette méthode.

La méthode de seuillage est une première approche semi-automatisée d'un système de mesure. Elle fait intervenir à un degré moindre l'opérateur. Cependant, le choix des bornes de seuillage est sous son contrôle. Le système informatique permet d'obtenir des profils de lignes de coordonnées toujours identiques mais l'interprétation est sous la responsabilité de l'expérimentateur.

Dans le groupe 1, seule une différence positive apparaît entre T1 et T2, par contre dans le groupe 2 l'écart de mesures fait apparaître une dispersion de l'échantillon beaucoup plus importante, révélant la difficulté du choix des bornes de seuillage.

La méthode semble généralement entraîner une majoration de la mesure, d'autant plus importante que le rapport d'agrandissement est faible.

Elle n'est fiable que dans le cas d'image à fort grossissement présentant un aspect de surface moins polymorphe qu'à faible grossissement, ainsi qu'un meilleur contraste.

L'augmentation de contraste simplifie l'analyse de l'aspect de surface par la limitation des caractéristiques photométriques des structures à détecter.

Quelle que soit la méthode utilisée, elle implique une analyse légèrement différente pour chaque cliché, car bien que les conditions de prise de vue soient similaires, elles ne sont pas parfaitement identiques, il existe inévitablement de légères variations du réglage du contraste et de la brillance lors de la prise du cliché.

Les meilleurs résultats sont obtenus avec les images à fort rapport d'agrandissement, or ces derniers ne permettent qu'un examen très partiel de la globalité de la surface endocanalaire, et n'autorisent pas une évaluation correcte de son aspect. Les systèmes de traitement et d'analyse permettent de multiples traitements par filtrage, lissage, rehaussement de contours, etc..., qu'il sera utile d'envisager en prétraitement afin d'améliorer la visualisation des zones d'intérêt et les possibilités d'analyse automatisée.

5. CONCLUSION

Une étude directe par un système de traitement et d'analyse d'image, n'est fiable dans les conditions expérimentales décrites qu'à un fort rapport d'agrandissement. Les clichés à un plus faible rapport, les plus utilisés dans les cas d'analyse de surface, se prêtent mal à une analyse par seuillage. Les

caractéristiques photométriques (niveaux de gris ou densité optique) ne peuvent être appréciées hors de leur contexte et leur influence sur une méthode de traitement automatisée devra être ultérieurement envisagée.

Une analyse automatisée ne peut être utilisée qu'avec un traitement préalable des images permettant l'amélioration de la mise en évidence des structures étudiées.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahmad M., Pitt Ford T.R.** — Ultrasonic debridment of root canals: acoustic streaming and its possible role. *J. Endodon.*, 10: 490-499, 1987.
- Auther A., Laurichesse J.M., Launay Y., Calas P.** — Etude au microscope électronique à balayage des surfaces radiculaires traitées par les instruments endo-sonores. *Rev. Franç. Endod.*, 1: 29-39, 1984.
- Baker M.C., Ashrafi S.H., Van Cura J.E., Remeikes N.A.** — Ultrasonic compared with hand instrumentation: a scanning electron microscope study. *J. Endodon.*, 9: 435-440, 1988.
- Baker N.A., Eleazer P.D., Averbach R.E., Seltzer S.** — Scanning electron microscopic study of the efficacy of various irrigating solutions. *J. Endodon.*, 1: 127-135, 1975.
- Bolanos O.R., Jensen J.R.** — Scanning electron microscope comparison of the efficacy of various methods of root canal preparation. *J. Endodon.*, 6: 815-822, 1980.
- Cameron J.A.** — The use of ultra-sonic in the removal of the smear-layer, a scanning electron microscope study. *J. Endodon.*, 7: 289-292, 1983.
- Cameron J.** — The synergistic relationship between ultrasound and sodium hypochlorite: a scanning electron microscope evaluation. *J. Endodon.*, 13: 541-545, 1987.
- Cymerman J.J., Jerome L.A., Moodnik R.M.** — A scanning electron microscope study comparing the efficacy of hand instrumentation with ultrasonic instrumentation of the root canal. *J. Endodon.*, 9: 327-331, 1983.
- De Coulom F.** — Théorie et traitement des signaux. *Lausanne, Presses polytechniques romandes*, 1985.
- Dietschi J.M., Ciuchi B., Cergneux M., Holtz J., Baume L.J.** — Préparation du canal radiculaire à l'aide d'ultra-sons. Etude au MEB. *Rev. Franç. Endo.* 1: 15-27, 1984.
- Goldman L.B., Goldman M., Kronman J.H., Lin P.S.** — The efficacy of several endodontic irrigating solutions; a scanning electron microscopic study. *Oral Surg.*, 52: 199-204, 1981.
- Goldman L.B., Goldman M., Kronman J.H., Lin P.S.** — Scanning electron microscope study of a new irrigation method in endodontic treatment. *Oral Surg.*, 48: 79-83, 1979.
- Grine F.E., Kay R.F.** — Early hominid diets from quantitative image analysis of dentail microwear. *Nature*, 333: 765-768, 1988.
- Guignes Ph., Maurette A.** — Computerised image analysis of SEM photographs. *J. Dent. Res.*, 71: 1007, Abstract n° 23, 1992.
- Guignes Ph., Calas P., Maurette A.** — Interprétation des images de MEB à l'aide d'un système de traitement et d'analyse d'image. Etude préliminaire, *Rev. Franç. Endodon.*, 10: 31-39, 1991.
- Jasty M., Bragdon C.R., Schutzer S., Rubash H., Haire T., Harris W.H.** — Bone ingrowth into porous coated canine total hip replacements. Quantification by backscattered scanning electron microscopy and image analysis. *Scanning Microsc.*, 4: 1051-1057, 1989.
- Marion A.** — Introduction aux techniques de traitement d'images. Paris, Ed. Eyrolles, 1987.
- Martin H., Cunningham W.** — A scanning electron microscope evaluation of root canal debridment with the endosonic ultrasonic synergistic system. *Oral surg.*, 53: 527-531, 1982.
- Roulet J.F., Reich T., Blunck U., Noack M.** — Quantitative margin analysis in the scanning electron microscope. *Scanning Microsc.*, 3: 147-158, 1989.
- Shimizu T., Zerwekh J.E., Videman T., Gill K., Mooney V., Holmes R.E., Hagler H.K.** — Bone ingrowth into porous calcium phosphate ceramics: influence of pulsing electromagnetic field. *J. Orthop. Res.*, 6: 248-258, 1988.
- Yamada R., Armas A., Goldman M., Lin P.S.** — A scanning electron microscopic comparison of a high volume final flush with several irrigating solutions. Part 3. *J. Endodon.*, 9: 137-142, 1983.

Adresse des auteurs:

Faculté de Chirurgie Dentaire, Toulouse III
3, Chemins des Maraîchers, 31 400 TOULOUSE