

# COLLOQUE NATIONAL SUR LE TRAITEMENT DU SIGNAL ET SES APPLICATIONS

NICE du 26 au 30 AVRIL 1977

---

ESTIMATION DES TAILLES DE PARTICULES CIRCULAIRES  
APPLICATION A UN FROTTIS SANGUIN

J.F. THERY

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES TELECOMMUNICATIONS, Laboratoire-Image  
46 Rue Barrault Paris 13ème.

---

## RESUME

## SUMMARY

### RESUME FRANCAIS

Nous proposons une méthode de caractérisation d'une population de globules rouges à partir de leur spectre de diffraction. La méthode fournit la répartition complète des cellules en fonction de leur taille.

On montre que celle-ci est obtenue à partir d'une transformée de Hankel portant sur l'intensité lumineuse diffractée, à laquelle on applique un prétraitement optique et numérique.

La méthode est vérifiée expérimentalement sur divers types de sang. Elle est particulièrement simple et rapide, et peut s'appliquer à d'autres problèmes de granulométrie.

### RESUME ANGLAIS

We suggest a method for characterizing a red cells size distribution, knowing their diffraction pattern.

We show that the distribution curve derives from a Hankel Transform of the diffracted intensity, which has been previously processed both in an optical and numerical way.

This method has been applied to various types of blood, and verified by direct measurements. It appears to be particularly fast and simple, and can be used for other problems dealing with granulometry.



ESTIMATION DES TAILLES DE PARTICULES CIRCULAIRES  
APPLICATION A UN FROTTIS SANGUIN

J.F. THERY

ESTIMATION DES TAILLES DE PARTICULES CIRCULAIRES  
APPLICATION A UN FROTTIS SANGUIN

A INTRODUCTION

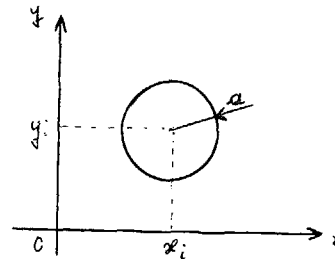
Les mesures statistiques de tailles sur des objets microscopiques ont donné naissance à diverses méthodes utilisant la figure de diffraction. Nombre d'entre elles effectuent plusieurs mesures à l'aide de masques ou d'autres dispositifs, permettant ainsi d'obtenir une série de paramètres caractérisant les populations étudiées (II, III, IV et V).

Nous présentons ici une méthode très générale utilisant l'ensemble de l'information contenue dans le spectre de diffraction, afin d'obtenir la répartition complète d'une population de particules circulaires en fonction de leur taille. Elle est basée sur la Transformée de Fourier inverse du spectre de diffraction, relevé suivant un rayon. Sa réalisation est facile, et le temps de traitement très acceptable. Nous en exposons ici la démonstration complète, puis son déroulement en diverses étapes.

La méthode, qui a été suscitée par des problèmes de mesures de tailles et de déformation sur des globules rouges (Pr. BESSIS, Institut de Pathologie cellulaire), est applicable à des domaines très divers.

Nous présentons ici des courbes de répartition calculées, concernant différents frottis sanguins. La précision de ces courbes est mise en évidence par leur comparaison avec des histogrammes réalisés sur photographies de ces mêmes frottis.

B PRINCIPE DE LA METHODE



Plan objet

Fig 1

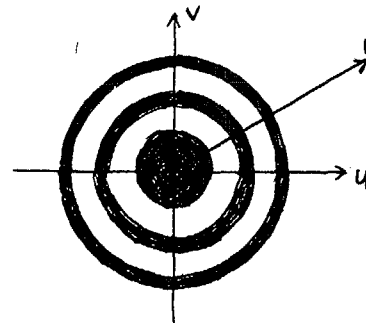


Figure de diffraction Fig. 2

On observe en lumière cohérente la figure de diffraction d'un frottis sanguin :

un globule rouge est identifié à une ouverture circulaire de rayon  $a$  (on peut également introduire un contraste de phase ; le calcul donne des résultats tout à fait analogues), et de position  $(x_i, y_i)$  (Figure 1).

Le calcul de l'amplitude de diffraction  $f(u, v)$ , (figure 2) est bien connu. On obtient de même, dans le cas d'une diffraction produite par  $N_a$  globules de même taille ( $a$ ) :

$$(1) \quad f_{N_a}(u, v) = \pi a^2 \frac{2J_1(ka \sqrt{u^2 + v^2})}{ka \sqrt{u^2 + v^2}} \sum_{i=1}^{N_a} e^{jk(ux_i + vy_i)}$$

ESTIMATION DES TAILLES DE PARTICULES CIRCULAIRES  
APPLICATION A UN FROTTIS SANGUIN

A condition que les positions  $(x_i, y_i)$  soient aléatoires et  $N_a$  suffisamment grand, on peut remplacer la somme d'exponentielles complexes par  $\sqrt{N_a}$ . (Voir discussion en annexe). D'où

$$(2) \hat{f}_{N_a}(r) = \pi a^2 \frac{2J_1(kar)}{kar} \sqrt{N_a} \text{ avec } r = \sqrt{u^2 + v^2}$$

Considérons une répartition  $n(a)$  des globules en fonction de leur rayon :

$$(3) \hat{f}_n(r) = \int_0^\infty \pi a^2 \frac{2J_1(kar)}{kar} \sqrt{n(a)} da$$

La transformée de Fourier bidimensionnelle de l'amplitude de diffraction se ramène à une transformée de Hankel puisque la figure présente une symétrie circulaire :

$$(4) F(t) = \int_0^\infty \hat{f}(r) r J_0(rt) dr \\ = \int_0^\infty \int_0^\infty \pi a^2 \frac{2J_1(kar)}{kar} \sqrt{n(a)} r J_0(rt) da dr$$

d'où après permutation des intégrales et utilisation de l'orthogonalité entre  $J_0$  et  $J_1$ , fonctions de Bessel d'ordre zéro et un :

$$(5) F(t) = \frac{2\pi}{k^2} \int_0^\infty \sqrt{n(a)} da$$

On en déduit enfin la répartition cherchée :

$$(6) n(a) = \left[ \frac{k^3}{2\pi} \frac{d F(t)}{dt} \right]^2$$

Il est donc théoriquement possible de connaître la distribution exacte des globules suivant leur taille, à partir du relevé de l'amplitude de diffraction  $F(t)$  suivant un rayon.

C ETAPES DE TRAITEMENT

1. relevé de l'intensité lumineuse  $I(r)$
2. divers traitements préliminaires (optiques)
3. retour à l'information d'amplitude à partir de l'intensité
4. transformation de Hankel
5. dérivation et élévation au carré : résultat final

Simulation numérique

Nous avons effectué au préalable une simulation numérique de cette méthode afin de définir la valeur de certains paramètres, comme le nombre de points à traiter, et les limites à donner à des intégrales de bornes infinies.

Le nombre de points  $N$  de la courbe relevée n'est pas critique (un minimum de 50 points assure un résultat correct, nous avons choisi en général  $N = 100$ ).

La transformée  $F(t)$  est d'autre part calculée pour  $M$  valeurs de  $t$  (par exemple  $M = 50$ ). Le temps de calcul total pour la transformée est proportionnel au nombre  $N \times M$ , qui est peu élevé dans notre cas.

Plus critique est par contre la valeur  $r_{max}$  de

$$\hat{F}(t) = \int_0^{r_{max}} f(r) r J_0(rt) dr \text{ au lieu de } F(t) = \int_0^\infty \dots dr$$

$f(r)$  provient de la courbe relevée  $I(r)$ . Les formules de la diffraction utilisées ici ne sont rigoureuses que pour des angles faibles :

$r_{max}$  doit donc être petit. A l'inverse, la décroissance lente de l'intégrale (approximativement en  $\frac{1}{r}$ ) impose à  $r_{max}$  d'être aussi grand que possible.

La simulation a ainsi montré que  $r_{max}$  devait être au moins supérieur à 0,3 radian, des valeurs  $r_{max} > 0,8$  ou 1 donnant des résultats excellents. (figure 3)

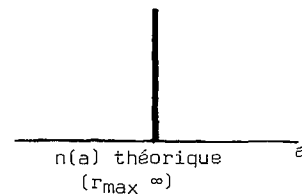


Fig. 3a

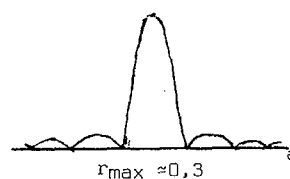


Fig. 3b

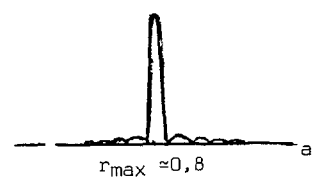


Fig. 3c

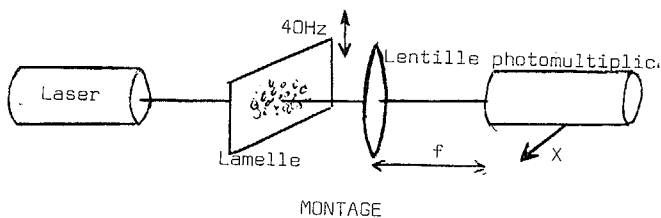
ESTIMATION DES TAILLES DE PARTICULES CIRCULAIRES

APPLICATION A UN FROTTIS SANGUIN

Dans la pratique, au delà de  $r = 0,45$  rad. environ l'intensité lumineuse utile se perd dans le bruit, ce qui conduit à utiliser cette valeur limite pour  $r_{max}$ .

1. Montage

Le montage est classique: le faisceau laser traverse le frottis sanguin étalé sur une lame de verre. Après la lamelle est placée une lentille; puis un photomultiplicateur peut se déplacer horizontalement, toujours dans ce plan, à l'aide d'une table mobile.



Les premières courbes d'intensité relevées présentaient une importante modulation haute fréquence, due à la cohérence de la lumière, responsable notamment de la modulation de phase rencontrée dans la formule (1). Sur la tache de diffraction, on observe de fait un important phénomène de granularité.

Nous avons éliminé cette structure granulaire en faisant une moyenne temporelle sur les phases tout en conservant l'enveloppe de la figure : à cet effet on déplace continuellement la population de cellules interceptée par le faisceau laser, en faisant légèrement vibrer la lamelle. (Dans le montage, celle-ci était solidaire du cône d'un haut-parleur vibrant à environ 40 Hz).

On réalise de plus une intégration spatiale de l'image par le biais de la fenêtre d'analyse appliquée à l'entrée du photomultiplicateur.

2. Traitement de la courbe relevée  $I(r)$

L'observation directe des frottis au microscope révèle l'existence d'agglomérats et de diverses particules en général de petite taille ; de plus certains globules ont une membrane anormalement irrégulière et sont même parfois complètement déformés.

Cela est dû en partie aux conditions peu favorables d'observation des globules sanguins. Des supports plus élaborés - suspension liquide - permettraient d'éviter ces inconvénients.

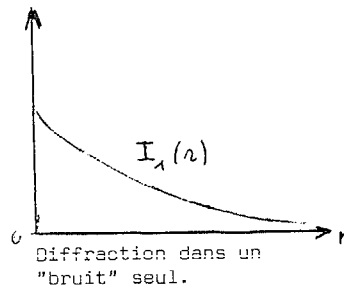


Fig. 4-a

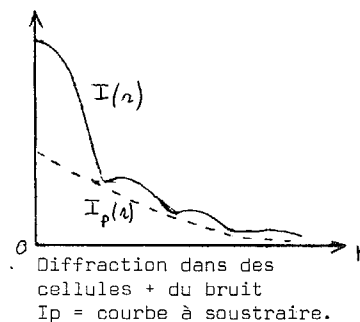


Fig. 4-b

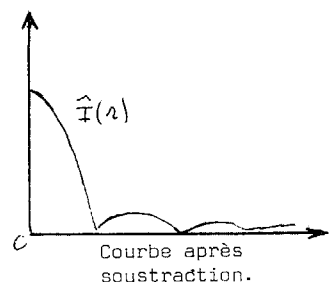


Fig. 4-c

On observe ainsi une diffraction parasite certaine (qui est très gênante pour les traitements devant suivre). L'observation des plages très pauvres en cellules "normales" conduit en effet à des courbes d'intensité  $I_1(r)$  représentatives de ce phénomène (fig. 4.a.).

## ESTIMATION DES TAILLES DE PARTICULES CIRCULAIRES

## APPLICATION A UN FROTTIS SANGUIN

Le rapport entre les deux populations, "normale" et "parasite", étant difficilement chiffrable, on a élaboré la méthode automatique de correction suivante : les minima de  $I(r)$  sont annulés par une courbe paramétrique de type  $\phi(x) = \frac{1}{x^2 + 1}$  ( $\alpha > 1$ ), les paramètres étant ajustés par une méthode de minimisation supervisée.

Il est intéressant de noter que les exemples traités ont tous conduit à des valeurs sensiblement égales de  $\alpha \approx 1,8$ .

### 3. Retour à l'information d'amplitude à partir de l'intensité.

La transformation de Hankel doit être effectuée à partir de l'amplitude  $A(r)$  de diffraction ; il faut donc en chaque point de la courbe d'intensité  $I(r)$  extraire la racine carrée et récupérer le signe correct.

Celui-ci peut se retrouver grâce à la condition de continuité de la dérivée : en partant de  $r = 0$ , la fonction  $A(r)$  s'annule puis croît à nouveau, présentant un point de rebroussement d'où la détection d'un changement de signe à effectuer et ainsi de suite.

### 4. Transformée de Hankel

Une transformation de Hankel numérique est appliquée à la courbe ainsi traitée :

$$F(A) = \int_0^{r_{\max}} A(r)r J_0(rt)dr$$

### 5. Résultat final

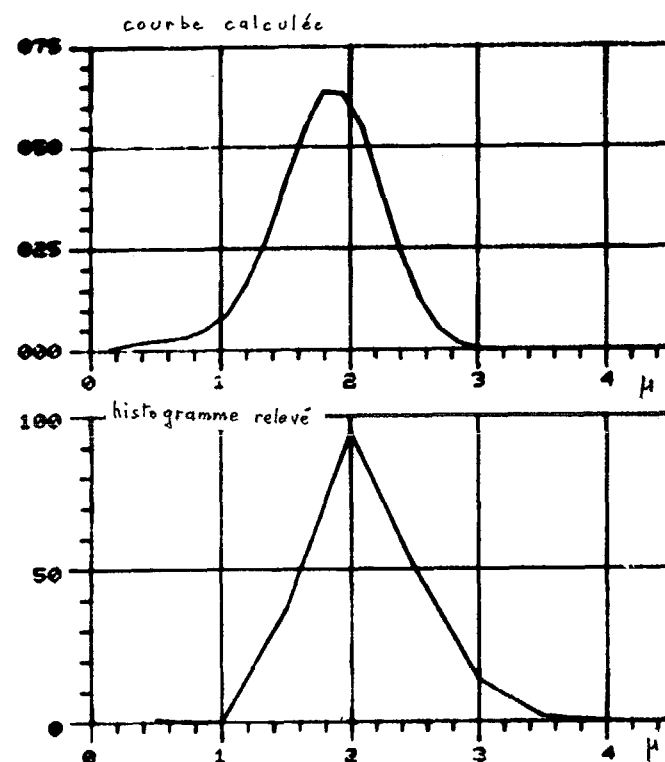
Il reste enfin à réaliser une dérivation numérique de la courbe transformée  $F(t)$  et à l'élever au carré : on obtient alors la répartition du nombre de cellules en fonction de leur rayon (histogramme des tailles) qui est le résultat recherché (cf. formule (6))

## D. RESULTATS

Des essais ont été faits sur des frottis sanguins humains ou animaux (chien, chat, rat, porc, mouton). Nous avons confronté les résultats avec des histogrammes obtenus par des statistiques directes sur photographies. Les rayons d'environ 100 à 200 cellules ont été relevés, permettant de tracer l'histogramme des tailles correspondant.

La corrélation entre les résultats des deux méthodes est très bonne. (l'allure des courbes est très voisine, les pics centraux sont corrects, etc ...)

Il faut noter que la qualité des frottis joue un rôle important pour la facilité de traitement et l'exactitude des résultats.



## E CONCLUSION

Nous avons signalé plus haut que le montage optique proprement dit était extrêmement simple et classique. La saisie des données peut bien sûr se faire de façon automatique.

Le temps de calcul global est toujours très raisonnable (le nombre de points à traiter est assez faible et le traitement rapide).

L'automatisation semble réalisable au moyen d'équipements assez simples. Il est souhaitable cependant de conserver un contrôle par l'observateur.

La méthode est enfin parfaitement susceptible de conduire à des développements plus généraux tels que des mesures statistiques de formes.



ESTIMATION DES TAILLES DE PARTICULES CIRCULAIRES  
APPLICATION A UN FROTTIS SANGUIN

## ANNEXE

On étudie la somme d'exponentielles suivante

$$\rho = \sum_{n=1}^N e^{jk (ux_n + vy_m)}$$

$$\rho \rho^* = \sum_{n=1}^N \sum_{m=1}^N e^{jk [u(x_n - x_m) + v(y_n - y_m)]}$$

$$\rho \rho^* = N + 2 \sum_n \sum_m \cos k [u(x_n - x_m) + v(y_n - y_m)]$$

$$= N + \phi (u, v, (x_i, y_i)_{i=1, N})$$

Lorsque les positions  $(x_i, y_i)$  varient,  $\phi$  peut-être considéré comme un nombre aléatoire de moyenne nulle (excepté près de l'origine  $u = v = 0$  : intensité en  $N^2$ ), d'où le résultat  $\langle |\rho| \rangle = \sqrt{N}$  (valeur moyenne du module de  $\rho$ ) utilisé dans la formule (2).

D'autre part, l'effet de granularité observé s'explique en partie par les variations rapides et d'amplitude importante de la somme des cosinus en fonction des variables spatiales  $u$  et  $v$ .

## REFERENCES

- I. M. BESSIS Institut de Pathologie, Hôpital de Bicêtre
- II. J. CORNILLAUD "Particle Size Analyser", Applied Optics Feb 72
- III. WERTHEIMER and WILCOCK "Light Scattering Measurements on Particle Distribution", Applied Optics June 76
- IV. A. PIJPER, J.Lab.Clin.Med. 32,857 (1947)
- V. M.E. TAYLOR, U.S. Patent 3469921 (1969)
- VI. S. LOWENTHAL Déplacement fini d'un diffuseur mobile  
D. JOYEUX Optics Communications (Sept. 70)  
H. ARSENAULT