

CARACTERISATION DE NANOMATERIAUX EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE : VERS UNE ANALYSE D'IMAGE ENTIEREMENT AUTOMATISEE

S. Merouane*¹, O. Rastoix¹, S. Bau¹ et R. Payet¹

¹Institut National de Recherche et de Sécurité, 54519 Vandœuvre-lès-Nancy, France

*sihane.merouane@inrs.fr

TITLE

Characterization of nanomaterials by electron microscopy: towards a fully automated image analysis.

RESUME

Les poudres nanostructurées, c'est-à-dire constituées de plus de 50% en nombre d'objets ayant au moins une dimension comprise entre 1 nm et 100 nm, sont utilisées dans de nombreux secteurs industriels. Pour évaluer l'exposition des salariés à des nano-objets, leurs agglomérats et agrégats (NOAA), le caractère nanostructuré des aérosols collectés dans l'air est étudié via la microscopie électronique. La taille d'un nombre représentatif de particules constitutives doit être mesuré manuellement sur les images obtenues. Cette opération chronophage et fastidieuse rend nécessaire l'automatisation de l'analyse. Plusieurs outils d'analyse d'images appliqués à des nanomatériaux ont été comparés dans ce travail qui a permis de démontrer l'intérêt des algorithmes d'apprentissage pour effectuer cette tâche.

ABSTRACT

Nanostructured powders, i.e. comprised of more than 50% by number of objects with at least one dimension between 1 nm and 100 nm, are used in numerous industrial fields. To determine the exposure of workers to nano-objects, the nanometric character of collected aerosols in the workplace air is studied using electron microscopy. The size of a large number of constituent particles needs to be measured on the obtained images. This task being time-consuming and tedious, it is useful automatizing the analysis. We compare some tools for image analyses applied to nanomaterials and show the interest of deep learning algorithms to perform this task.

MOTS-CLES : nanomatériaux, microscopie électronique, deep learning / **KEYWORDS**: nanomaterials, electron microscopy, deep learning

1. CONTEXTE

Par définition, un nano-objet est un matériau dont au moins une dimension externe est comprise entre 1 nm et 100 nm, une poudre étant dite « nanostructurée » dès lors qu'elle est constituée d'au moins 50% en nombre de nano-objets (Recommandation de la commission européenne, 2022). Au-delà de leur composition chimique, le danger que représentent les nano-objets, leurs agglomérats et agrégats (NOAA) est dû à leur taille, qui leur permet de pénétrer jusqu'au poumon profond, et à leur plus grande surface spécifique résultant en une réactivité de surface particulièrement importante leur permettant d'interagir plus facilement avec les milieux biologiques (Oberdörster *et al.*, 2005 ; Binet *et al.*, 2013). De nombreux secteurs industriels sont concernés par l'utilisation de ces nanomatériaux : l'agroalimentaire, la construction, la cosmétique, l'énergie, la pharmacie, la plasturgie, etc... Des situations d'exposition des travailleurs à des aérosols de NOAA peuvent avoir lieu tout au long du cycle de vie, de la synthèse des nanomatériaux, à leur transfert et conditionnement, ou lors de l'utilisation de matériaux contenant des NOAA (abrasion, nettoyage, maintenance) (Kuijpers *et al.*, 2017 ; Ding *et al.*, 2017).

Pour évaluer l'exposition des opérateurs aux nanomatériaux, il est nécessaire de déterminer si des aérosols nanostructurés sont présents dans l'air de leurs lieux de travail et, si oui, en quelle proportion. La mesure de la distribution en taille des aérosols et de leurs particules constitutives pour un échantillon donné repose sur l'analyse d'images de microscopie électronique et nécessite généralement des centaines de mesures manuelles de manière à avoir un nombre de particules statistiquement représentatif. C'est donc une tâche chronophage et fastidieuse et dont le résultat peut être influencé par de nombreux paramètres comme l'homogénéité du prélèvement, l'état d'agglomération des particules, le nombre d'images traitées, le biais opérateur... Une comparaison inter-laboratoires portant sur la mesure de la taille de particules constitutives avec diverses techniques incluant la microscopie électronique a ainsi montré une dispersion des mesures de l'ordre de 40% (Favre *et al.*, 2020).

Pour limiter le biais opérateur et limité le temps dédié à l'analyse des images, ce travail a pour objectif d'identifier, valider et mettre à disposition des acteurs de la prévention des méthodes automatisées de comptage et de mesure de distribution en taille de particules à partir d'images acquises en microscopie électronique à balayage et à transmission. Des premiers résultats obtenus avec différents outils disponibles en *open source* sont ici présentés.

2. METHODE

Dans un premier temps, cinq outils d'analyse d'images ont été sélectionnés en se basant sur différents critères : outil entièrement automatique ou automatisable, disponible gratuitement, facile d'utilisation, et dont les performances sont documentées dans la littérature. Les cinq méthodes ainsi retenues dans le cadre de ce travail sont : le plugin ParticleSizer sous ImageJ (Wagner, 2016), la méthode CSES (Center Selected Edge Scoring, Anderson *et al.*, 2017), la méthode EDM-SBS (Euclidean Distance mapping Surface-Based Scale analysis, Bescond *et al.*, 2014), une méthode basée sur la détection de point d'intérêts dans l'image et des contours (Zafari *et al.*, 2015), la transformée de Hough (Bourrous *et al.*, 2018).

Après quelques premiers résultats obtenus avec ces outils, il s'est avéré utile d'introduire des méthodes capables d'apprendre (*deep learning*). Le logiciel Cellpose (Stringer *et al.*, 2021), disponible gratuitement et dont la prise en main est relativement simple, a donc été intégré à l'étude dans un second temps.

Ces méthodes ont tout d'abord été mises en œuvre sur des matériaux « simples », c'est-à-dire étant constitués de particules sphériques avec très peu de recouvrement entre elles, et dont la distribution en taille est bien connue.

Le premier matériau analysé est un échantillon certifié de silice (FD304), dont les particules constitutives présentent une distribution monodispersée avec un diamètre équivalent moyen déterminé par microscopie électronique de $27,8 \text{ nm} \pm 1,5 \text{ nm}$. Le second matériau est un échantillon de TiO_2 ayant fait l'objet de comparaisons inter-laboratoires (Favre *et al.*, 2020) qui ont permis de définir une distribution en taille des particules bimodale, avec un premier mode à $42,2 \text{ nm} \pm 0,7 \text{ nm}$ et un second mode à $93,3 \text{ nm} \pm 0,5 \text{ nm}$. Ces échantillons ont été préparés pour une analyse en microscopie à balayage (MEB) et à transmission (MET) avec la méthode spin coating (Favre *et al.*, 2020) et avec la méthode de la goutte (Mast & De Temmerman, 2015) respectivement.

Nous avons ensuite évalué les performances de ces méthodes sur un échantillon dont les particules constitutives ont des formes irrégulières. Pour cela, nous avons utilisé un échantillon de ZnO certifié fourni par le *Joint Research Center* (NM110), dont les particules ont des formes cylindriques à base hexagonale et ont un diamètre de Feret moyen de $151 \text{ nm} \pm 55,6 \text{ nm}$. Pour cet échantillon, des aérosols générés à partir de poudre avec un agitateur Vortex selon la norme EN 17199-5 ont été prélevés sur grille avec support carbone pour la MET à l'aide du dispositif MPS (Xiang *et al.*, 2021) et sur filtre en polycarbonate doré pour la MEB.

3. RESULTATS

La Figure 1 illustre, pour l'échantillon de TiO_2 , les résultats de l'analyse d'images obtenues avec quatre méthodes mentionnées précédemment. La méthode EDM-SBS n'a pas été utilisée ici car inappropriée aux échantillons polydispersés.

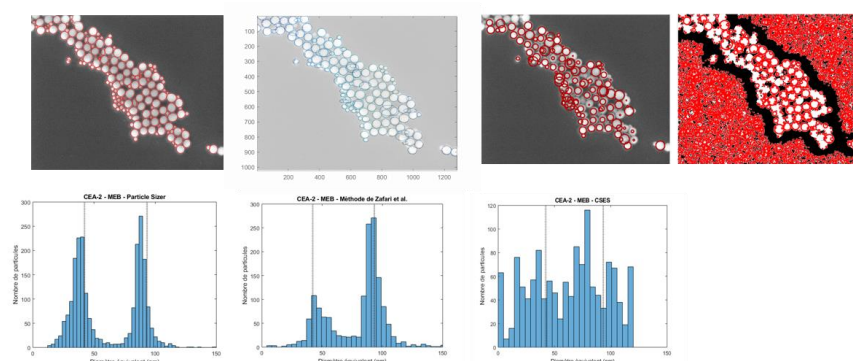


Figure 1. Résultats obtenus avec quatre outils d'analyse d'image automatisés sur une image MEB de l'échantillon de TiO_2 . De gauche à droite : le plugin ParticleSizer sous ImageJ, la méthode de Zafari *et al.* (2015), la méthode CSES et la transformée de Hough (Bourrous *et al.*, 2015). En haut : les images MEB sur lesquelles sont superposées les particules détectées. En bas, les distributions en taille obtenues. Les traits verticaux marquent les valeurs de référence du diamètre moyen dans les deux modes de la distribution.

L'outil proposé par Bourrous *et al.* (2018) est très sensible aux variations d'intensité dans le fond de l'image. Une correction de ce fond avant l'analyse avec la méthode de « *rolling ball* » usuellement utilisée ou encore en appliquant divers filtres permettant de lisser l'image n'améliore malheureusement pas les résultats. La

méthode CSES donne des résultats légèrement meilleurs mais donne une distribution en taille trop dispersée pour être exploitable. La méthode de Zafari *et al.* (2015) et ParticleSizer donnent des résultats bien meilleurs. Les particules sont correctement identifiées et la distribution en taille est cohérente avec celle attendue, comme le montrent les valeurs reportées dans le Tableau 1. Les mêmes résultats ont été obtenus avec les images MET et sur l'échantillon de silice FD304.

Tableau 1. Diamètres équivalents des deux modes de la distribution en taille de l'échantillon de TiO₂

	Diamètre de référence	ParticleSizer	Méthode de Zafari <i>et al.</i> , 2015	CSES	Méthode de Bourrous <i>et al.</i> , 2015
Mode 1	42,2 nm ± 2,7 nm	37,6 nm ± 7,8 nm	46,8 nm ± 11,3 nm	26,6 nm ± 14,3 nm	-
Mode 2	93,3 nm ± 0,5 nm	89,0 nm ± 8,2 nm	91,2 nm ± 6,7 nm	84,4 nm ± 18,7 nm	-

Ces deux méthodes prometteuses pour des échantillons simples, i.e. ParticleSizer et celle de Zafari *et al.* (2015), ont aussi été appliquées à l'échantillon de ZnO. Cet échantillon est constitué de particules de formes très irrégulières comme le montrent les images MEB en Figure 2. Les deux méthodes se sont avérées incapables de distinguer correctement les particules constitutives.

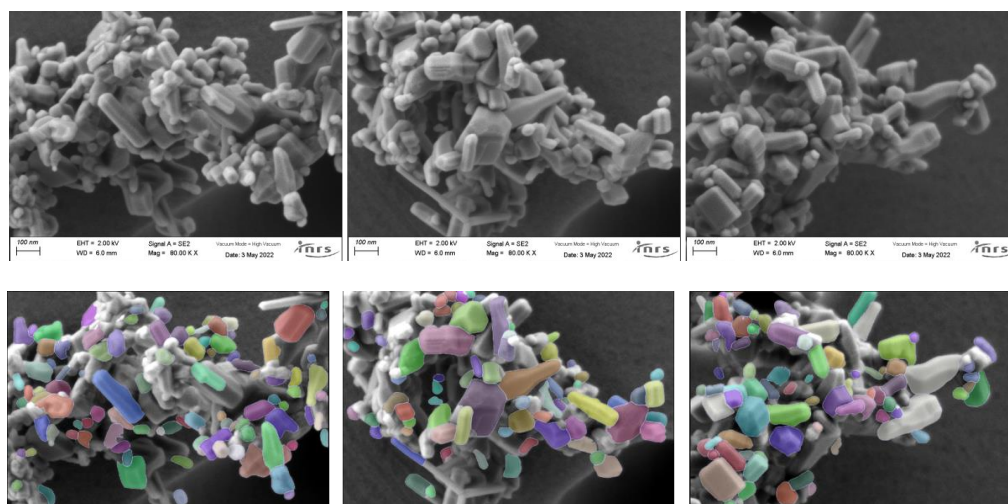


Figure 2. Images MEB de l'échantillon de ZnO (en haut). Résultats obtenus avec Cellpose (en bas), les masques colorés correspondent aux particules détectées automatiquement avec le logiciel.

Le logiciel Cellpose (Stringer *et al.*, 2021) a alors été testé. Ce logiciel est doté d'un mécanisme d'apprentissage permettant d'entraîner l'algorithme sur des images similaires à celles que à analyser. La particularité de cet outil est que de nombreux modèles sont déjà disponibles, entraînés avec un nombre d'images important (608 images au total). Cellpose a été appliqué sur les images de ZnO et a permis d'obtenir des résultats très prometteurs et illustrés en Figure 2. Pour cette application, l'acquisition de dix images de l'échantillon de ZnO au MEB a été réalisée : deux images ont été utilisées pour entraîner l'algorithme avant de l'appliquer aux huit autres.

De la même manière, ce logiciel à partir de 12 images d'entraînement, a permis de créer un modèle pour analyser des images MET d'échantillons déposés sur des grilles dont les pores de la couche carbone sont visibles et généralement difficilement analysables par des outils sans apprentissage comme l'illustre l'exemple donné dans l'image de gauche en Figure 3 où les pores sont ici détectés par le plugin ParticleSizer. L'application de Cellpose sur la même image est montrée au centre de la Figure 3, les agrégats ne sont pas correctement détectés. Après apprentissage, tous les agrégats peuvent être détectés (Figure 3 à droite).

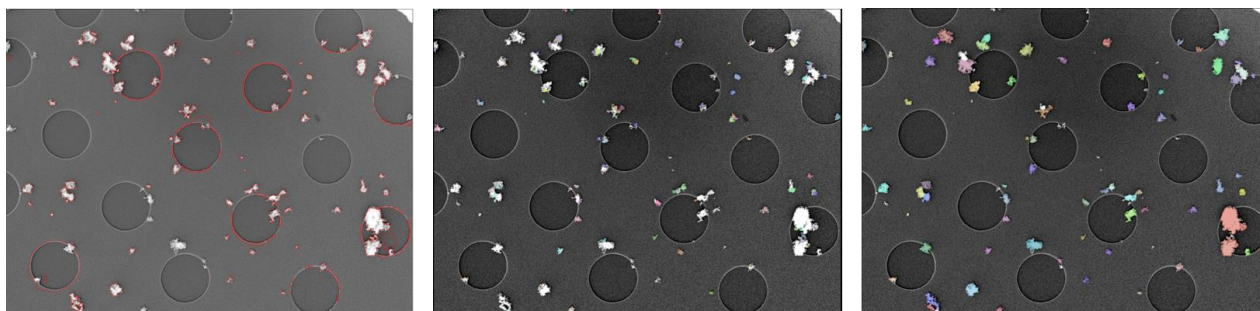


Figure 3. A gauche : résultats obtenus avec un algorithme n'utilisant pas d'apprentissage (ParticleSizer sous ImageJ), au centre : Cellpose avant apprentissage, à droite : Cellpose après apprentissage.

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les logiciels d'analyse d'images sans apprentissage se sont avérés adaptés à l'analyse de matériaux "simples" à savoir composés de particules sphériques, avec peu de recouvrement et sur un fond d'image homogène. Cependant ces outils peuvent s'avérer limités pour caractériser des aérosols plus complexes, par exemple dans le cadre d'un prélèvement dans l'atmosphère d'un lieu de travail.

Il semble indispensable de devoir recourir à des méthodes basées sur le principe de l'intelligence artificielle, capables d'apprendre à partir d'une série d'images pour être ensuite appliquées à des échantillons inconnus. Ces méthodes ont généralement pour limite de nécessiter un grand nombre d'images dans la phase d'apprentissage. Le logiciel utilisé ici, Cellpose, présente l'avantage de ne requérir que peu d'images pour fournir des résultats cohérents en termes de distribution en taille de particules constitutives d'agrégats.

L'une des perspectives de ce travail consistera à développer différents modèles d'analyse d'images sous Cellpose tenant compte de la diversité 1) des matériaux rencontrés dans les prélèvements effectués dans l'air des environnements industriels et 2) des supports de prélèvement pour les analyses en microscopie électronique.

5. REFERENCES ET REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le *JRC Nanomaterials Repository* d'avoir fourni l'échantillon certifié NM110 utilisé dans ce travail.

- Anderson P.M., Guo H., Sunderland P.B. (2017) *J. Aerosol Sci.* 114, 317-26.
- Bescond A., Yon J., Ouf F.X., Ferry D., Delhaye D., Gaffié D., et al. (2014) *Aerosol Sci. Technol.* 48, 8, 831-41.
- Binet S., Malard S., Reynier M. (2013) *Hygiène et sécurité du travail*, 232, 4
- Bourrous S., Ribeyre Q., Lintis L., Yon J., Bau S., Thomas D., et al. (2018) *J. Aerosol Sci.* 126, 122-32.
- Ding Y., Kuhlbusch T.A.J., Van Tongeren M., Jiménez A.S., Tuinman I., Chen R., et al. (2017) *J. Hazard Mater.* 322, 17-28.
- EN 17199-5 (2019). Exposition sur les lieux de travail - Mesurage du pouvoir de resuspension des matériaux en vrac contenant ou émettant des nano-objets et leurs agrégats et agglomérats (NOAA) ou autres particules en fraction alvéolaire - Partie 5 : méthode impliquant l'utilisation d'un agitateur vortex.
- Favre G., Feltin N., Bau S. (2020) *Hygiène et sécurité du travail*, 260, 8.
- Kuijpers E., Bekker C., Brouwer D., le Feber M., Fransman W. (2017) *J Occup Environ Hyg.* 7, 14, 5, 349-59.
- Mast J., De Temmerman P.J. (2015). NANoREG Deliverable D 2.10 : Protocol(s) for size-distribution analysis of primary NM particles in air, powders, and liquids, 71 p.
- Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. (2005) *Environ. Health Perspect.* 113, 7, 823-39.
- RECOMMANDATION DE LA COMMISSION du 10 juin 2022 relative à la définition des nanomatériaux (2022/C 229/01) [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022H0614\(01\)](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022H0614(01))
- Stringer C., Wang T., Michaelos M., Pachitariu M. (2021) *Nature Methods* 18, 100-106.
- Wagner, T. (2016) ParticleSizer 1.0.1. <https://zenodo.org/badge/latest/doi/10.5281/zenodo.18649/thorstenwagner/ij-particlesizer>
- Xiang, M., Morgeneyer, M., Aguerre-Chariol, O., Philippe, F., Bressot, C. (2021) *Aerosol Science and Technology*, 55(5), 526-538.
- Zafari S., Eerola T., Sampo J., Kalviainen H., Haario H. (2015) *IEEE Transactions on Image Processing*, p. 5942-52.