

Approche variationnelle pour la déconvolution rapide de données 3D en microscopie biphotonique *

Emilie CHOUZENOUX¹, Lisa LAMASSÉ^{3,4}, Sandrine ANTHOINE², Caroline CHAUX², Alexandre JAOUEN^{3,4}, Ivo VANZETTA³
Franck DEBARBIEUX^{3,4}

¹Université Paris-Est, LIGM, UMR CNRS 8049, 77454 Marne-la-Vallée, France

²Aix Marseille Université, CNRS, Centrale Marseille, I2M, UMR 7373, 13453 Marseille, France

³Aix Marseille Université, CNRS, INT UMR 7289, 13385, Marseille, France

⁴Aix Marseille Université, CERIMED, 13385, Marseille, France

emilie.chouzenoux@univ-mlv.fr, prenom.nom@univ-amu.fr

Résumé – Les technologies d’imagerie permettant d’obtenir des images à l’échelle cellulaire sont devenues incontournables pour mieux comprendre les processus biologiques. Nous nous intéressons ici à l’imagerie biphotonique et plus particulièrement, à la reconstruction des images acquises par un tel système dans un contexte in-vivo. Deux difficultés majeures sont : les gros volumes de données que représentent les acquisitions et la mauvaise connaissance de la réponse impulsionnelle de l’instrument. Nous proposons dans ce travail d’estimer cette dernière à l’aide d’un montage expérimental basé sur l’observation de micro-billes fluorescentes. Le problème inverse de restauration d’image est ensuite résolu dans un cadre non aveugle, en le formulant sous la forme d’un critère pénalisé minimisé à l’aide d’une méthode d’optimisation convexe efficace fondée sur la technique de Majoration-Minimisation. L’efficacité de l’approche proposée est démontrée sur données simulées et réelles.

Abstract – Better understanding of biological processes requires new, improved, high resolution imagery techniques. The present work concerns the restoration of data acquired with two-photon microscopy in biological tissue, in-vivo in particular. Two main challenges to tackle are: the large dimensionality of the acquired data and the incomplete knowledge of the impulse response of the system. We propose here an experimental setting to estimate it based on the observation of fluorescent micro-beads. The non-blind formulation of the related inverse problem of image restoration is then solved by minimizing a penalized criterion using an efficient convex optimization strategy based on the Majoration-Minimization approach. The effectiveness of the proposed approach is not only shown on simulated data but also on real data.

1 Introduction

Ce travail porte sur la restauration des données issues de la microscopie biphotonique [15, 10]. Cette modalité de microscopie par fluorescence, fondée sur le principe de l’absorption à deux photons, par opposition à la microscopie confocale conventionnelle où l’absorption se fait à un photon, possède de nombreux avantages par rapport à cette dernière, dont sa capacité à imager à de plus grandes profondeurs, à limiter la phototoxicité (ce qui permet d’effectuer des expériences *in vivo* sur des tissus biologiques [6]), ainsi qu’à réduire le bruit d’acquisition [7]. Le modèle de formation de l’image, ou problème direct, est

$$\mathbf{y} = \mathbf{H}\bar{\mathbf{x}} + \mathbf{b}, \quad (1)$$

où $\bar{\mathbf{x}} \in \mathbb{R}^N$, avec $N = N_1 \times N_2 \times N_3$, représente les données 3D originales (inconnues), $\mathbf{y} \in \mathbb{R}^N$ est l’image mesurée (dégradée), \mathbf{H} est un opérateur linéaire de convolution 3D modélisant le système d’acquisition (lié à la *Point Spread Function* (PSF) de l’instrument) et \mathbf{b} représente un bruit additif.

*Ce travail a été réalisé dans le cadre d’un projet jeune chercheur et a reçu le soutien financier du GdR 720 ISIS et de l’association GRETSI.

Notre objectif est de résoudre le problème inverse associé, qui consiste donc à restaurer l’image volumique $\bar{\mathbf{x}}$ à partir d’une version dégradée \mathbf{y} de celle-ci.

La méconnaissance de \mathbf{H} et la grande dimension du volume de données à traiter constituent deux verrous importants de ce problème. La PSF du microscope biphotonique varie suivant l’axe Z (le flou augmente avec la profondeur) [7]. Dans ce travail, nous considérons un volume à restaurer d’épaisseur faible devant ces variations, et supposons de ce fait l’opérateur de convolution 3D \mathbf{H} spatialement invariant. Pour le déterminer, nous adoptons une approche purement expérimentale, basée sur l’observation de micro-billes. Plus simple à mettre en place que des stratégies de restauration aveugle, cette approche, déjà utilisée en microscopie par fluorescence classique [5], nous a permis d’obtenir des mesures de PSF satisfaisantes. Nous proposons de traiter le problème inverse non aveugle résultant via la formulation d’un critère pénalisé, dont la minimisation est réalisée grâce à une approche de Majoration-Minimisation.

La suite de l’article est organisée comme suit : la section 2 présente la formulation du critère ainsi que l’algorithme utilisé pour le minimiser, en supposant \mathbf{H} connu. Après avoir

décrit la stratégie d'obtention de la PSF expérimentale, nous démontrons dans la section 3 l'efficacité de la méthode proposée, à l'aide de résultats de restauration de données synthétiques et réelles. La section 4 conclut ce travail.

2 Méthode proposée

2.1 Critère pénalisé

Une approche classique de résolution consiste à définir une estimée de $\bar{\mathbf{x}}$ comme le minimiseur d'un critère composite $F(\mathbf{x})$ somme d'un terme d'attache aux données lié au modèle d'observation et d'un terme de régularisation renforçant certaines propriétés de l'objet recherché. Nous considérerons ici le critère de moindres carrés pénalisé

$$(\forall \mathbf{x} \in \mathbb{R}^N) \quad F(\mathbf{x}) = \frac{1}{2} \|\mathbf{H}\mathbf{x} - \mathbf{y}\|^2 + R(\mathbf{x}). \quad (2)$$

Une pénalisation hybride $R = R_1 + R_2 + R_3$ est considérée. Tout d'abord, afin de contraindre l'intensité des pixels restaurés dans un certain intervalle $[x_{\min}, x_{\max}]$, nous définissons

$$(\forall \mathbf{x} \in \mathbb{R}^N) \quad R_1(\mathbf{x}) = \eta \sum_{n=1}^N d_{[x_{\min}, x_{\max}]}^2(x_n), \quad (3)$$

où $\eta > 0$ et d_C est la distance au convexe C . La fonction R_1 est une approximation lisse de la fonction indicatrice $\iota_{[x_{\min}, x_{\max}]}^N$ (celle-ci est retrouvée quand η tend vers l'infini), et joue un rôle similaire à une pénalisation quadratique exacte [2, Chap.4].

En microscopie biphotonique, l'axe Z, correspondant à la profondeur d'acquisition, est souvent moins finement résolu que le plan XY. Par conséquent, deux termes distincts ont été considérés pour renforcer la régularité spatiale de l'objet estimé :

$$(\forall \mathbf{x} \in \mathbb{R}^N) \quad R_2(\mathbf{x}) = \lambda \sum_{n=1}^N \sqrt{([\mathbf{V}^X \mathbf{x}]_n)^2 + ([\mathbf{V}^Y \mathbf{x}]_n)^2 + \delta^2},$$

$$R_3(\mathbf{x}) = \kappa \sum_{n=1}^N ([\mathbf{V}^Z \mathbf{x}]_n)^2, \quad (4)$$

avec $(\lambda, \delta, \kappa) \in (0, +\infty)^3$, et $\mathbf{V}^X \in \mathbb{R}^{N \times N}$, $\mathbf{V}^Y \in \mathbb{R}^{N \times N}$, $\mathbf{V}^Z \in \mathbb{R}^{N \times N}$ des opérateurs linéaires calculant les gradients discrets de l'objet suivant les axes X, Y et Z. La fonction R_2 s'apparente à une version lissée de la variation totale [14] (cette dernière est obtenue pour $\delta = 0$).

2.2 Algorithme 3MG

Nous proposons d'utiliser une stratégie de Majoration-Minimisation (MM) pour minimiser le critère convexe différentiable F défini par (2)-(4). Il s'agit de remplacer le problème de minimisation initial par une séquence de sous-problèmes plus simples, ici quadratiques. Soit $\mathbf{x}' \in \mathbb{R}^N$. On définit une *fonction quadratique majorante* de F en \mathbf{x}' par

$$(\forall \mathbf{x} \in \mathbb{R}^N) \quad Q(\mathbf{x}, \mathbf{x}') \geq F(\mathbf{x}) \text{ et } Q(\mathbf{x}', \mathbf{x}') = F(\mathbf{x}'). \quad (5)$$

D'après [1], la propriété (5) est vérifiée si l'on définit,

$$(\forall \mathbf{x} \in \mathbb{R}^N) \quad Q(\mathbf{x}, \mathbf{x}') = F(\mathbf{x}') + \nabla F(\mathbf{x}')^\top (\mathbf{x} - \mathbf{x}') + \frac{1}{2} (\mathbf{x} - \mathbf{x}')^\top \mathbf{A}(\mathbf{x}') (\mathbf{x} - \mathbf{x}'),$$

de matrice Hessienne

$$(\forall \mathbf{x} \in \mathbb{R}^N) \quad \mathbf{A}(\mathbf{x}) = \mathbf{H}^\top \mathbf{H} + \lambda \mathbf{V}^{X\top} \mathbf{B}(\mathbf{x}) \mathbf{V}^X + \lambda \mathbf{V}^{Y\top} \mathbf{B}(\mathbf{x}) \mathbf{V}^Y + 2\kappa \mathbf{V}^{Z\top} \mathbf{V}^Z + 2\eta \mathbf{I},$$

où \mathbf{I} est la matrice identité de \mathbb{R}^N et, pour tout $\mathbf{x} \in \mathbb{R}^N$,

$$\mathbf{B}(\mathbf{x}) = \text{Diag} \left\{ \left[(\mathbf{V}^X \mathbf{x})^2 + (\mathbf{V}^Y \mathbf{x})^2 + \delta^2 \right]^{-1/2} \right\}.$$

Dans sa forme standard, l'algorithme MM s'écrit

$$(\forall k \in \mathbb{N}) \quad \mathbf{x}_{k+1} \in \underset{\mathbf{x} \in \mathbb{R}^N}{\text{argmin}} Q(\mathbf{x}, \mathbf{x}_k). \quad (6)$$

Notons que (6) s'identifie avec une approche semi-quadratique, fréquemment utilisée dans le domaine de la restauration d'images [12]. Cependant, à chaque itération $k \in \mathbb{N}$, la minimisation de $Q(\cdot, \mathbf{x}_k)$ requiert l'inversion de la matrice $\mathbf{A}(\mathbf{x}_k) \in \mathbb{R}^{N \times N}$, ce qui peut s'avérer extrêmement coûteux en pratique, surtout dans le cas de la restauration de données volumiques. Pour pallier ce problème, des stratégies de résolution approchée [11], ou de sous-espace [3] ont été proposées. Nous retenons l'approche 3MG (MM à mémoire de gradient) de [3] qui consiste à limiter l'espace de minimisation de la fonction majorante à un sous-espace de faible dimension, engendré par un petit nombre de vecteurs. En pratique, cela conduit à l'algorithme suivant :

$$(\forall k \in \mathbb{N}) \quad \mathbf{x}_{k+1} = \mathbf{x}_k + \mathbf{D}_k \mathbf{u}_k, \quad (7)$$

où les vecteurs colonne de \mathbf{D}_k engendrent le sous-espace de mémoire de gradient :

$$\mathbf{D}_k = \begin{cases} -\nabla F(\mathbf{x}_0) & \text{si } k = 0 \\ [-\nabla F(\mathbf{x}_k) \mid \mathbf{x}_k - \mathbf{x}_{k-1}] & \text{si } k > 0 \end{cases} \quad (8)$$

et \mathbf{u}_k est un minimiseur de la fonction quadratique $\mathbf{u} \mapsto Q(\mathbf{x}_k + \mathbf{D}_k \mathbf{u}, \mathbf{x}_k)$, donné par

$$\mathbf{u}_k = -(\mathbf{D}_k^\top \mathbf{A}(\mathbf{x}_k) \mathbf{D}_k)^\dagger \mathbf{D}_k^\top \nabla F(\mathbf{x}_k), \quad (9)$$

où \dagger est l'opérateur de pseudo-inverse. La convergence de la suite $(\mathbf{x}_k)_{k \in \mathbb{N}}$ résultant de l'alternance des étapes (7) à (9) vers un minimiseur de F est établie dans [4]. En pratique, les itérations sont stoppées dès que le critère d'arrêt $\|\nabla F(\mathbf{x}_k)\| \leq \epsilon$ est vérifié, avec, typiquement, $\epsilon = 10^{-2}$. Notons que l'algorithme 3MG s'est distingué sur divers exemples pratiques par son faible coût calculatoire, et ses très bonnes performances en terme de vitesse de convergence [4, 8].

3 Résultats de simulation

Nous présentons ici les résultats de restauration obtenus par l'algorithme 3MG appliqué à des données synthétiques et réelles. Les simulations sont effectuées sur un Intel(R) Xeon(R) CPU E5-2630v2 @ 2.6GHz avec Matlab R2013a. Les axes des figures sont gradués en microns. La stratégie d'obtention de la PSF expérimentale utilisée pour toutes les expériences est décrite ci-dessous.

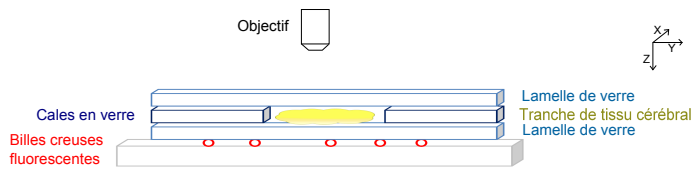


FIGURE 1 – Montage utilisé pour obtenir la PSF expérimentale.

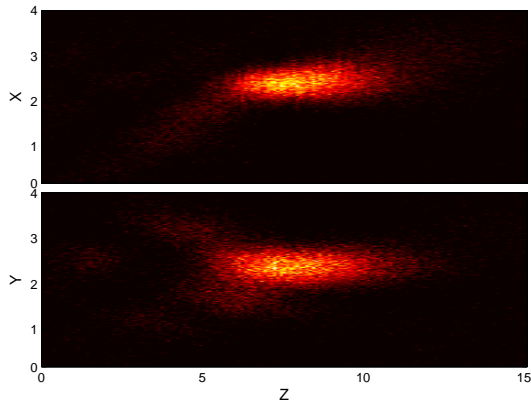


FIGURE 2 – Coupes centrales de la PSF expérimentale, issue de l'observation au microscope biphotonique de micro-billes fluorescentes de diamètre 0.5 microns placées sous une tranche de tissu cérébral d'épaisseur 100 microns.

3.1 Détermination de la PSF expérimentale

Nous cherchons à obtenir une PSF expérimentale à profondeur 100 microns du microscope biphotonique LSM 780 (Zeiss), disponible au CERIMED, lorsque le contexte d'acquisition est le suivant : (i) le faisceau d'excitation est produit par un laser infrarouge cohérent pulsé à la longueur d'onde 840 nm, (ii) la fluorescence est acquise sur 5 détecteurs en cascade analysant chacun une bande spectrale distincte du spectre visible, (iii) seul le détecteur sensible dans la bande 555-605 nm est considéré dans notre étude. Nous mettons en place le montage illustré en figure 1. La tranche de tissu cérébral, d'une épaisseur de 100 microns, a été découpée au vibratome à partir d'un cerveau prélevé sur une souris. Cette dernière nous permet de simuler un milieu proche des conditions *in vivo*. Plusieurs acquisitions (typiquement 5 sur différents champs) de différentes billes fluorescentes creuses T7284 (produites par Molecular Probes Life technologies) de 0.5 microns de diamètre (assimilables à des distributions de Dirac 3D), placées sous cette tranche de cerveau, sont effectuées avec une résolution très fine ($0.02 \times 0.02 \times 0.10$ microns). Nous réalisons ensuite une moyenne des images obtenues, de façon à limiter le bruit et à prendre en compte les éventuelles inhomogénéités structurales du tissu cérébral. La figure 2 illustre la PSF résultante, de taille $191 \times 191 \times 151$ pixels. Nous pouvons remarquer le fort étalement de la PSF suivant l'axe Z, caractéristique de la microscopie par fluorescence [13] ainsi que son asymétrie liée aux aberrations optiques. Dans la suite de cette section, H sera un opérateur de convolution 3D, dont le noyau est une version interpolée par splines cubiques de cette PSF expérimentale, s'adaptant à la résolution des données à restaurer.

3.2 Restauration d'une image synthétique

Nous commençons avec la restauration de données synthétiques. L'objet original est l'image CT_aneurysm, issue du site <http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/25987-showvol-isosurface-render/>, de taille $155 \times 154 \times 154$ pixels, retenue pour la présence de structures filaires dans celle-ci. Afin de générer y , nous avons appliqué à l'image originale la PSF expérimentale, en supposant une résolution de $0.08 \times 0.08 \times 0.1$ microns. Un bruit additif Gaussien centré a , de plus, été ajouté, afin d'avoir un rapport signal sur bruit (RSB) de 20 dB. Les paramètres de régularisation sont réglés manuellement afin de minimiser l'erreur entre les images originale \bar{x} et restaurée \hat{x} . Sur cet exemple, l'amélioration, en terme de RSB ($RSB(x, \hat{x}) = 10 \log_{10}(E[x^2]/E[(x - \hat{x})^2])$ où E représente l'opérateur de moyenne spatiale), entre y et \hat{x} est de 3.61 dB. La figure 3 illustre deux coupes, l'une suivant Z et l'autre suivant X, des images originale, dégradée, et restaurée. 360 itérations de l'algorithme sont nécessaires pour satisfaire le critère d'arrêt, ce qui correspond à un temps de reconstruction d'environ 8 minutes. La qualité visuelle des résultats, que nous avons confirmée sur d'autres jeux de données synthétiques, permet de valider la méthode proposée, dans le cas où l'opérateur H est connu de façon exacte.

3.3 Restauration de données réelles

Nous nous intéressons maintenant à la restauration d'images acquises par le microscope. Nous appliquons tout d'abord notre méthode à la restauration d'une image de bille creuse de diamètre 4 microns, de taille $186 \times 186 \times 351$ pixels, acquise par le montage décrit en figure 1, sous une résolution de $0.08 \times 0.08 \times 0.1$ microns. La figure 4 illustre deux coupes, suivant Z et X, de l'image observée et restaurée. Nous fixons les paramètres de régularisation afin d'obtenir une qualité visuelle satisfaisante de l'image restaurée. 25 minutes sont nécessaires pour la reconstruction. Nous pouvons noter une forte réduction du bruit de mesure. De plus, la forme sphérique et creuse de la bille est bien restaurée, en particulier dans le plan XY. La forte déformation sur l'axe Z liée à l'instrument est amoindrie mais reste néanmoins visible.

Nous nous intéressons ensuite à la restauration d'une image de taille $512 \times 512 \times 40$ pixels, correspondant à l'observation au microscope biphotonique d'un morceau de cerveau de souris transgénique clarifié par la méthode `scale` [9]. Contrairement aux tests précédents, une résolution moindre, de $0.8 \times 0.8 \times 2.5$ microns a été utilisée, afin de s'approcher des conditions réelles d'acquisition *in vivo*. La figure 5 illustre deux coupes, suivant Z et Y, de l'image observée, et restaurée après un temps de reconstruction d'environ 10 minutes. A nouveau, nous pouvons observer que la méthode proposée permet de réduire le bruit d'acquisition, et d'améliorer la qualité de l'image, en particulier dans le plan XY, ce qui permet une meilleure visualisation des corps cellulaires.

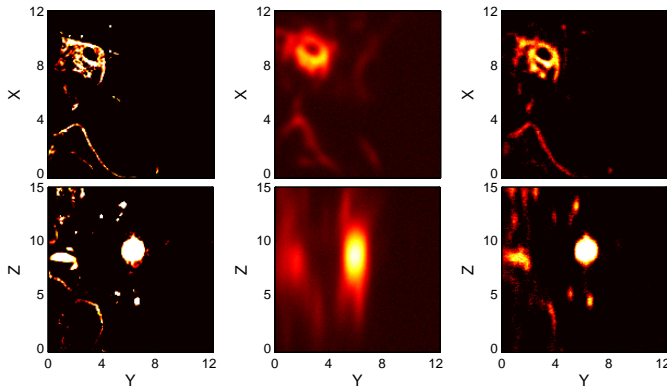


FIGURE 3 – Coupes originales (gauche), dégradées (centre) et restaurées (droite), à $Z = 13.6$ microns (haut) et $X = 5.36$ microns (bas), de l'image `CT_aneurysm`.

4 Conclusion

Ce travail aborde le problème de déconvolution en microscopie biphotonique. La méthode proposée repose sur une formulation variationnelle du problème et sur un algorithme de type MM. Des résultats prometteurs ont été obtenus sur données réelles et simulées. Nous travaillons actuellement à l'obtention de modèles PSF spatialement variantes, et prêtons attention à l'analyse de la nature du bruit.

Références

- [1] M. Allain, J. Idier, and Y. Goussard. On global and local convergence of half-quadratic algorithms. *IEEE Trans. Image Process.*, 15(5) :1130–1142, May 2006.
- [2] D. P. Bertsekas. *Constrained Optimization and Lagrange Multiplier Methods*. Athena Scientific, Belmont, MA, 1996.
- [3] E. Chouzenoux, J. Idier, and S. Moussaoui. A majorize-minimize strategy for subspace optimization applied to image restoration. *IEEE Trans. Image Process.*, 20(18) :1517–1528, Jun. 2011.
- [4] E. Chouzenoux, A. Jezierska, J.-C. Pesquet, and H. Talbot. A majorize-minimize subspace approach for ℓ_2 - ℓ_0 image regularization. *SIAM J. Imaging Science*, 6(1) :563–591, 2013.
- [5] R. W. Cole, T. Jinadasa, and C. M. Brown. Measuring and interpreting point spread functions to determine confocal microscope resolution and ensure quality control. *Nature Protocols*, 6 :1929–1941, 2011.
- [6] F. Debarbieux. Towards a dynamic anatomopathology of glioblastoma in mice thanks to in vivo biphotonic microscopy. *Ann. Pathol.*, 30(5S1) :53–55, Nov. 2010.
- [7] P. Dufour, S. Dufour, A. Castonguay, N. McCarthy, and Y. De Koninck. Microscopie à deux photons pour l'imagerie cellulaire fonctionnelle : avantages et enjeux. *Medicine/Sciences*, 22 :837–844, Oct. 2006.
- [8] A. Florescu, E. Chouzenoux, J.-C. Pesquet, P. Ciuciu, and S. Ciochina. A majorize-minimize memory gradient method for complex-valued inverse problem. *Signal Process.*, 103 :285–295, Oct. 2014. Special issue on Image Restoration and Enhancement : Recent Advances and Applications.

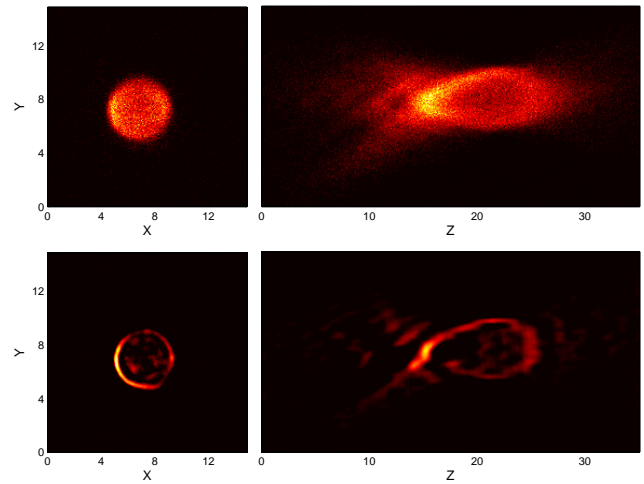


FIGURE 4 – Coupes observées au microscope biphotonique (haut) et restaurées (bas), à $Z = 22$ microns (gauche) et $X = 8$ microns (droite), d'une bille fluorescente de diamètre 4 microns.

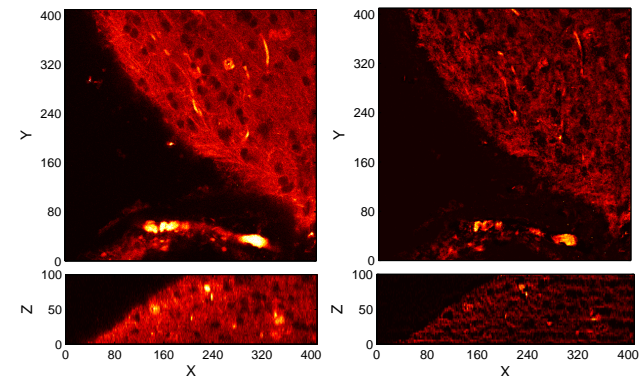


FIGURE 5 – Coupes observées au microscope biphotonique (gauche) et restaurées (droite), à $Z = 82.5$ microns (haut) et $Y = 369.6$ microns (bas), d'une tranche clarifiée de cerveau de souris.

- [9] H. Hama *et al.* Scale : a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nature Neuroscience*, 14 :1481–1488, Oct. 2011.
- [10] F. Helmchen and W. Denk. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat. Methods*, 2(12), 2005.
- [11] C. Labat and J. Idier. Convergence of truncated half-quadratic and Newton algorithms, with application to image restoration. Technical report, Jun. 2007. <http://www.irccyn-ecnantes.fr/~idier/pub/labat06c.pdf>.
- [12] M. Nikolova and M. K. Ng. Analysis of half-quadratic minimization methods for signal and image recovery. *SIAM J. Sci. Comput.*, 27 :937–966, 2005.
- [13] J. Pawley. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Language of science. Springer, 2006.
- [14] L. I. Rudin, S. Osher, and E. Fatemi. Nonlinear total variation based noise removal algorithms. *Phys. D*, 60 :259–268, 1992.
- [15] P. T. C. So, C. Y. Dong, B. R. Masters, and K. M. Berland. Two-photon excitation fluorescence microscopy. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2 :399–429, 2000.