



# Déconvolution aveugle en microscopie de fluorescence 3D

Ferréol Soulez, Éric Thiébaud, Yves Tourneur, Loïc Denis

## ► To cite this version:

Ferréol Soulez, Éric Thiébaud, Yves Tourneur, Loïc Denis. Déconvolution aveugle en microscopie de fluorescence 3D. GRETSI 2013, Sep 2013, brest, France. 2013. <hal-00914941>

**HAL Id: hal-00914941**

**<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00914941>**

Submitted on 10 Dec 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Déconvolution aveugle en microscopie de fluorescence 3D

Ferréol SOULEZ<sup>1</sup>, Eric THIEBAUT<sup>1</sup>, Yves TOURNEUR<sup>2</sup>, Loïc DENIS<sup>3</sup>,

<sup>1</sup>Centre de Recherche Astrophysique de Lyon CNRS-UMR 5574 – Université Lyon 1 – ENS Lyon

<sup>2</sup>Centre Commun de Quantimétrie – Université Lyon 1

<sup>3</sup>Laboratoire Hubert Curien – CNRS UMR 5516 – Université Jean Monnet \*

ferreol.soulez@univ-lyon1.fr, eric.thiebaut@univ-lyon1.fr

**Résumé** – Dans ce papier, nous proposons une méthode de déconvolution aveugle estimant la fonction de flou (PSF) et l’image nette en microscopie de fluorescence 3D. L’idée est d’utiliser un modèle paramétré par la fonction pupille pour la PSF en décomposant le module et la phase de la partie aberration sur la base de Zernike. Les résultats tant sur des simulations que sur des données expérimentales montrent la supériorité de notre méthode comparée à l’état de l’art.

**Abstract** – In this paper we propose a blind deconvolution algorithm for wide field fluorescence microscopy. The 3D PSF is modeled after a parametrized pupil function. The PSF parameters are estimated jointly with the object in a *maximum a posteriori* framework. Results on both synthetic and experimental data show the superiority of our method compared to state of the art.

## 1 Introduction

En réalisant des images de fluorescence à différentes profondeurs dans l’échantillon, il est possible d’avoir une représentation 3D des organelles marquées. Malheureusement, en plein champ, la résolution est assez grossière, en particulier en profondeur, et le volume 3D est couvert d’un “brouillard” généré par la lumière provenant de parties défocalisées. Pour améliorer la résolution, plusieurs solutions ont été proposées : modifier le dispositif optique (i) pour réduire la taille de sa fonction d’étalement de point (PSF) comme en microscopie confocale et multi-photon, (ii) ou pour localiser chacun des fluorophores (STORM, PALM). Comparés à l’épifluorescence, ces dispositifs sont très onéreux et relativement lents. Sans changer de dispositif, on peut améliorer la résolution en inversant (iii) numériquement le flou par des méthodes de déconvolution comme nous le proposons ici. Les méthodes de déconvolution [1, 2] nécessitent une bonne connaissance de la PSF qui provient soit de modèles théoriques peu flexibles soit de mesures in situ à l’aide de billes de calibration. Le montage optique est alors complexifié pour pouvoir placer précisément ces billes qui dans tous les cas ne fournissent qu’une mesure très bruitée de la PSF. C’est pourquoi poursuivant les travaux de Markham [3] et Hanser [4], nous proposons une méthode de déconvolution aveugle où la PSF est estimée uniquement d’après les données scientifiques. Cette démarche s’applique non seulement en plein champ mais aussi en microscopie confocale et biphoton.

## 2 Méthode

La méthode proposée est basée sur l’approche inverse pour déterminer la PSF et l’objet 3D net le plus probable d’après un modèle de la formation des données et des a priori. Cela consiste à estimer le couple objet  $\mathbf{x}$  et PSF  $\mathbf{h}$  minimisant une fonction de coût  $\mathcal{J}(\mathbf{x}, \mathbf{h})$  :

$$\{\mathbf{x}^+, \mathbf{h}^+\} = \arg \min_{\mathbf{x} \in \mathbb{X}, \mathbf{h} \in \mathbb{H}} \mathcal{J}(\mathbf{x}, \mathbf{h}), \quad (1)$$

$$\mathcal{J}(\mathbf{x}, \mathbf{h}) = \mathcal{J}_{\text{data}}(\mathbf{x}, \mathbf{h}) + \mu \mathcal{J}_{\text{prior}}(\mathbf{x}), \quad (2)$$

où  $\mathcal{J}_{\text{data}}(\mathbf{x}, \mathbf{h})$  est un terme d’attache aux données,  $\mathcal{J}_{\text{prior}}(\mathbf{x})$  un terme d’a priori sur l’objet et  $\mu$  un hyper-paramètre. Dans notre cas, cette fonction de régularisation  $\mathcal{J}_{\text{prior}}(\mathbf{x})$  est une classique variation totale 3D[5]. Pour un bruit gaussien non-stationnaire, le terme d’attache aux données  $\mathcal{J}_{\text{data}}(\mathbf{x}, \mathbf{h})$  s’écrit :

$$\mathcal{J}_{\text{data}}(\mathbf{x}, \mathbf{h}) = \sum_{\ell} w_{\ell} [(\mathbf{h} * \mathbf{x})_{\ell} - y_{\ell}]^2, \quad (3)$$

où  $w_{\ell}$  est l’inverse de la variance du bruit au pixel  $\ell$ . Cette formulation permet de prendre en compte rigoureusement les données manquantes (pixels saturés) et les bords en fixant  $w_{\ell} = 0$  pour tout pixel  $\ell$  non mesuré. De plus, hormis lorsque le bruit du détecteur est très faible, cela permet aussi d’approcher le cas du bruit de Poisson + gaussien : [6] :

$$w_{\ell} \stackrel{\text{def}}{=} \begin{cases} (\gamma \max(y_{\ell}, 0) + \sigma_{\ell}^2)^{-1} & \text{si } y_{\ell} \text{ est mesuré,} \\ 0 & \text{sinon,} \end{cases} \quad (4)$$

où  $y_{\ell}$  est la mesure en  $\ell$ ,  $\gamma$  est le taux de quantification et  $\sigma_{\ell}^2$  la variance des autres bruits gaussiens (e.g. bruit de lecture) au pixel  $\ell$ .

\* Ce travail a été financé par le projet ANR MiTiV (ANR DEFI 09-EMER-008-01).

## 2.1 Paramétrisation de la PSF

L'a priori sur la PSF est uniquement introduit par sa paramétrisation. Cette PSF 3D est décrite par le module carré de la transformée de Fourier de la transmission complexe dans le plan pupille arrière du microscope. Cette transmission est nulle hormis sur une calotte sphérique de rayon  $n_i/\lambda$  limitée par l'angle d'ouverture où  $n_i$  est l'indice de réfraction du milieu d'immersion et  $\lambda$  la longueur d'onde d'émission du fluorophore. On peut donc décrire cette PSF par une fonction pupille  $p(\kappa_x, \kappa_y)$  définie sur le disque  $\sqrt{\kappa_x^2 + \kappa_y^2} \leq \text{NA}/\lambda$  [7] :

$$h(x, y, z) = \left| \iint p(\kappa_x, \kappa_y) \exp(2i\pi z d(\kappa_x, \kappa_y)) \dots \exp(2i\pi(\kappa_x x + \kappa_y y)) d\kappa_x d\kappa_y \right|^2, \quad (5)$$

où  $d(\kappa_x, \kappa_y)$  est une fonction de défocus qui s'écrit :

$$d(\kappa_x, \kappa_y) = \sqrt{k_i^2 - (\kappa_x - \delta_x)^2 - (\kappa_y - \delta_y)^2}. \quad (6)$$

Cette fonction est une calotte sphérique centrée en  $(\delta_x, \delta_y)$  et de rayon  $k_i = n_i/\lambda$ . Elle ne dépend donc que de trois paramètres regroupés dans un vecteur de défocus  $\omega = \{k_i, \delta_x, \delta_y\}$ . De plus, comme proposé par Hanser [4], nous décomposons le module  $\rho(\kappa_x, \kappa_y)$  et la phase  $\phi(\kappa_x, \kappa_y)$  de cette fonction pupille sur une base de polynômes de Zernike  $Z_n$  adaptée à son support circulaire :

$$\rho(\kappa_x, \kappa_y) = \sum_n \beta_n Z_n(\kappa_x, \kappa_y), \quad (7)$$

$$\phi(\kappa_x, \kappa_y) = \sum_n \alpha_n Z_n(\kappa_x, \kappa_y). \quad (8)$$

Un piston de phase étant sans effet, nous fixons  $\alpha_0 = 0$ . De même, pour garder une PSF centrée, les paramètres de tip-tilt sont annulés ( $\alpha_1 = \alpha_2 = 0$ ). Les modes  $Z_n$  étant orthogonaux, la normalisation de la PSF ( $\sum h = 1$ ) est imposée par la contrainte :  $\|\beta\|_2 = 1$ .

Ce modèle relativement simple offre une paramétrisation flexible décrivant la grande variété de PSF possibles et ne nécessite la connaissance que de la longueur d'onde  $\lambda$  et l'ouverture numérique NA. De plus, avec une telle formulation, la PSF est nécessairement (i) centrée, (ii) normalisée et (iii) ne peut pas être réduite en un produit convolution, ce qui d'éviter les dégénérescences classiques de la déconvolution aveugle (position, échelle et décomposition).

## 2.2 Algorithme

La solution de ce problème de déconvolution aveugle est donnée par les paramètres  $\{x^+, \alpha^+, \beta^+, \omega^+\}$  minimisant la fonction de coût  $\mathcal{J}(x, \mathbf{h}(\alpha, \beta, \omega^+))$ . Cette fonction étant très non-linéaire et les paramètres ayant des significations physique très différentes, ce problème est non convexe et très mal conditionné. Pour cette raison, nous proposons de le résoudre via des minimisations alternées [8] qui convergent vers un optimum local. Toutefois, à PSF fixée, l'estimation de l'objet est un

problème convexe, nous proposons donc de commencer la minimisation alternée par cette étape en utilisant la PSF théorique de diffraction sans aberration comme PSF initiale  $\mathbf{h}^{(0)}$  (i.e.  $\alpha^{(0)} = 0, \beta_0 = 1, \beta_{n \neq 0} = \mathbf{0}$  et  $\omega^{(0)} = \{n_i/\lambda, 0, 0\}$  avec  $n_i$  l'indice de réfraction nominal du milieu d'immersion). Notre algorithme s'écrit :

1.  $t = 0$ , définir  $\mathbf{h}^{(0)}$  la PSF de diffraction théorique.
2.  $t = t + 1$ , estimation de l'objet non-négatif optimal  $x^{(t)}$  d'après la PSF  $\mathbf{h}^{(t-1)}$  :  

$$x^{(t)} \approx \arg \min_{x \geq 0} \left( \mathcal{J}_{\text{data}}(x, \mathbf{h}^{(t-1)}) + \mu \mathcal{J}_{\text{prior}}(x) \right),$$
3. Estimation des paramètres de défocus :  

$$\omega^{(t)} = \arg \min_{\omega} \mathcal{J}_{\text{data}}(x^{(t)}, \mathbf{h}(\alpha^{(t-1)}, \beta^{(t-1)}, \omega))$$
4. Estimation des paramètres de phase :  

$$\alpha^{(t)} = \arg \min_{\alpha} \mathcal{J}_{\text{data}}(x^{(t)}, \mathbf{h}(\alpha, \beta^{(t-1)}, \omega^{(t)}))$$
5. Estimation des paramètres de module :  

$$\beta^{(t)} = \arg \min_{\sum \beta^2 = 1} \mathcal{J}_{\text{data}}(x^{(t)}, \mathbf{h}(\alpha^{(t)}, \beta, \omega^{(t)}))$$
6. Retour à l'étape 2 jusqu'à convergence.

A chaque étape, la minimisation du critère est effectuée par l'algorithme d'optimisation continue VMLMB [9] qui permet de prendre en compte des contraintes comme la positivité ou la normalisation. Comme il s'agit d'une méthode d'optimisation continue, nous nous contentons d'une minimisation locale à partir de l'estimation précédente.

## 3 Résultats

### 3.1 Simulations

Nous avons évalué notre méthode en traitant les données simulées par Kenig *et al.* [10]<sup>1</sup> qui ont été utilisés pour comparer les méthodes AIDA[11], KPCA[10] et RD+KFTV[12] qui sont l'état de l'art actuellement. Si elle permet des comparaisons, cette simulation comporte toutefois beaucoup de défauts (flou circulant, PSF sans aberration, objets constants par morceaux) et ne représente pas un cas réaliste de flou en microscopie. La vérité, les données et résultats de ces méthodes sont affichés Fig. 1 conjointement avec les résultats de la déconvolution à PSF connue (colonne (f)) et de la déconvolution aveugle proposée (colonne (g)). En plus des coupes latérales et longitudinales, il est indiqué l'erreur quadratique moyenne (EQM) de ces méthodes. Sur cette figure, on peut constater visuellement que notre méthode provoque moins d'artefacts et que la résolution (axiale particulièrement) est bien supérieure. Ceci est confirmé quantitativement : l'erreur quadratique moyenne est largement améliorée (10.55) d'un facteur deux comparé à l'état de l'art. Les contre-performances des méthodes KPCA et RD+KFTV s'expliquent par l'utilisation dans la partie déconvolution de leur algorithme de la méthode de Richardson-Lucy

1. Les auteurs remercient Tal Kenig pour nous avoir autorisé à traiter ses données

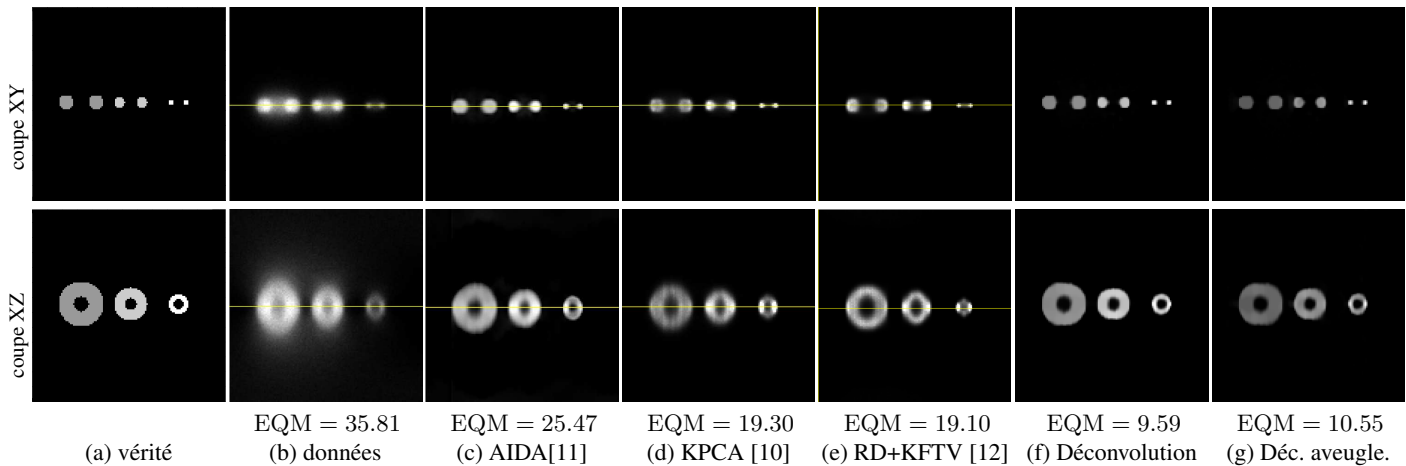


FIGURE 1 – Résultats de différentes méthodes de déconvolution aveugle d’un cube 3D simulé représentant 3 tores. 1<sup>re</sup> ligne : coupes latérales  $(x, y)$ , 2<sup>e</sup> ligne : coupes longitudinales  $(x, z)$ , 3<sup>e</sup> ligne erreur quadratique moyenne, 4<sup>e</sup> ligne méthode utilisée. Les images des colonnes de (b) à (e) sont extraite de Kenig *et al.* [10] et Keuperet *et al.* [12]

avec débruitage des résidus [13, 14] qui n’est pas compétitive avec l’état de l’art en déconvolution.

### 3.2 Données expérimentales

Pour établir l’efficacité de notre méthode, nous avons traité les données déposées par Cazares *et al.* sur le site *cell image library*. Ce réseau de microtubules d’une cellule S2 de drosophile<sup>2</sup> est observé avec un microscope ZEISS Elyra simultanément en épifluorescence et en illumination structurée (SIM) bien plus résolue qui fournit une vérité terrain. Le cube de données plein champ est composé de  $(1024 \times 1024 \times 44)$  voxels de taille  $40 \times 40 \times 110$  nm. L’objectif à immersion à huile ( $n_i = 1.518$ ) a une ouverture numérique de  $NA = 1.4$ .

Après un réglage grossier de l’hyper-paramètre  $\mu = 10^{-7}$ , le résultat de la déconvolution aveugle est obtenu en un peu plus d’une heure. Une coupe latérale à  $z = 15$  et une coupe longitudinale à  $y = 512$  des données floues, du résultat de la déconvolution aveugle et de l’observation SIM sont affichées à la figure (2). Cette figure illustre bien le gain tant en terme de résolution qu’en terme de rapport signal à bruit fourni par notre méthode. Le voile dû à la lumière défocalisée est supprimé et la plupart des détails visibles dans la coupe SIM sont retrouvés, en particulier dans la coupe longitudinale. Pour quantifier le gain en résolution, nous présentons Fig. 3 une coupe d’un filament de microtubule qui n’est pas résolu (diamètre  $\approx 25$  nm). Latéralement, la largeur à mi-hauteur mesurée en épifluorescence est de 320 nm contre 130 nm après déconvolution (SIM : 66 nm), de même en profondeur les largeurs à mi-hauteur sont de 605 nm pour l’épifluorescence contre 420 nm après déconvolution (SIM : 316 nm). Le gain en résolution de notre déconvolution aveugle est donc important.

## 4 Conclusion

Nous avons montré dans ce papier une méthode de déconvolution aveugle pour l’épifluorescence. Elle utilise un modèle de PSF décrit par sa fonction pupille dont les parties imaginaires réelles sont décomposés sur une base de Zernike. Cette paramétrisation est très robuste vis-à-vis des dégénérescences classiques de la déconvolution aveugle (échelle, position et réduction). Elle ne nécessite que peu de connaissance du dispositif (ouverture numérique, longueur d’onde) et un seul hyper-paramètre. Les résultats montrent son efficacité et sa supériorité comparée à l’état de l’art.

L’extension à la microscopie confocale et bi-photon est directe. De plus, des améliorations de cette méthode sont à attendre de l’utilisation de modèles de PSF plus sophistiqués (*e.g.* modèle vectoriel avec integration sur le pixel) ou prenant en compte la variation dans le champ de la PSF, particulièrement avec la profondeur [15].

## Références

- [1] D.A. Agard, “Optical sectioning microscopy : cellular architecture in three dimensions,” *Annual review of biophysics and bioengineering*, vol. 13, no. 1, pp. 191–219, 1984.
- [2] J.B. Sibarita, “Deconvolution microscopy,” *Microscopy Techniques*, pp. 1288–1291, 2005.
- [3] Joanne Markham and José-Angel Conchello, “Parametric blind deconvolution : a robust method for the simultaneous estimation of image and blur,” *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 16, no. 10, pp. 2377–2391, Oct 1999.
- [4] BM Hanser, MGL Gustafsson, DA Agard, and JW Sedat, “Phase-retrieved pupil functions in wide-field fluorescence microscopy,” *Journal of microscopy*, vol. 216, no. 1, pp. 32–48, 2004.

2. <http://www.cellimagelibrary.org/images/36797>

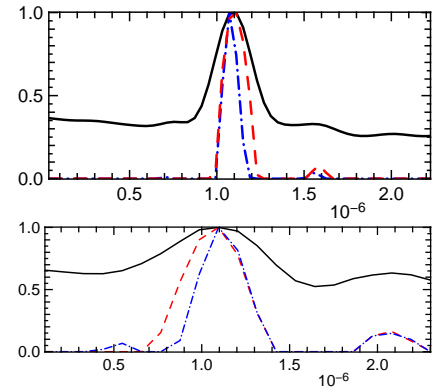
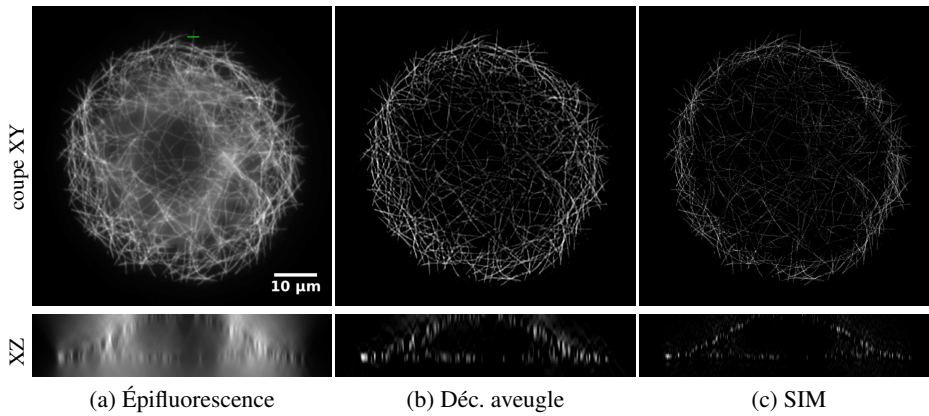


FIGURE 2 – Réseau de microtubules d’une cellule S2 de drosophile observé en épifluorescence (a), sa déconvolution aveugle (b) et la même cellule observée en illumination structurée SIM (c). 1<sup>re</sup> ligne : coupe latérales à  $z = 15$ , 2<sup>e</sup> ligne : coupes longitudinales ( $x, z$ ) à  $y = 512$ . Données déposées par Cazares *et al.* sur *cell image library* : <http://www.cellimagelibrary.org/images/36797>

FIGURE 3 – Coupes latérales (en haut) et longitudinales (en bas) normalisées du filament de microtubule indiqué en vert en haut de la figure (2.(a)) pour l’épifluorescence (en noir), la déconvolution aveugle (tirets rouges) et la SIM (tirets points bleus).

- [5] Rudin L.I., Osher S. and Fatemi E., “Nonlinear total variation based noise removal algorithms,” *Physica D : Nonlinear Phenomena*, vol. 60, no. 1-4, pp. 259–268, 1992.
- [6] L. Mugnier, T. Fusco, and J-M Conan, “Mistral : a myopic edge-preserving image restoration method, with application to astronomical adaptive-optics-corrected long-exposure images,” *JOSA A*, vol. 21, no. 10, pp. 1841–1854, 2004.
- [7] P.A. Stokseth, “Properties of a defocused optical system,” *JOSA*, vol. 59, no. 10, pp. 1314–1321, 1969.
- [8] J. Besag, “On the statistical analysis of dirty pictures,” *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, vol. 48, no. 3, pp. 259–302, 1986.
- [9] E. Thiébaud, “Optimization issues in blind deconvolution algorithms,” in *Astronomical Data Analysis II.*, Jean-Luc Starck, Ed., dec 2002, vol. 4847, pp. 174–183.
- [10] T. Kenig, Z. Kam, and A. Feuer, “Blind image deconvolution using machine learning for three-dimensional microscopy,” *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, pp. 2191–2204, 2010.
- [11] E.F.Y. Hom, F Marchis, T.K. Lee, S. Haase, D.A. Agard, and J.W. Sedat, “Aida : an adaptive image deconvolution algorithm with application to multi-frame and three-dimensional data,” *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 24, no. 6, pp. 1580–1600, 2007.
- [12] M. Keuper, T. Schmidt, M. Temerinac-Ott, J. Padeken, P. Heun, O. Ronneberger, and T. Brox, “Blind deconvolution of widefield fluorescence microscopic data by regularization of the optical transfer function (otf),” in *IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*, 2013.
- [13] J.L. Starck and F. Murtagh, “Image restoration with noise suppression using the wavelet transform,” *Astronomy and Astrophysics (ISSN 0004-6361)*, vol. 288, no. 1, 1994.
- [14] J. L. Starck, E. Pantin, and F. Murtagh, “Deconvolution in astronomy : A review,” *Publications of the Astronomical Society of the Pacific*, vol. 114, pp. 1051–1069, 2002.
- [15] L. Denis, E. Thiébaud, and F. Soulez, “Fast model of space-variant blurring and its application to deconvolution in astronomy,” in *18th IEEE Int. Conf. on Image Proc.*, Bruxelles, France, Sept. 2011, pp. 2873–2876.