

Déconvolution rapide d'images hyperspectrales de fluorescence *

Simon HENROT¹, Charles SOUSSEN¹, David BRIE¹

¹Centre de Recherche en Automatique de Nancy. UMR 7039, Nancy-Université, CNRS.

Faculté des Sciences, B.P. 70239, F-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

simon.henrot@cran.uhp-nancy.fr, charles.soussen@cran.uhp-nancy.fr,

david.brie@cran.uhp-nancy.fr

Résumé – La microscopie en fluorescence est une technique classique d'imagerie de spécimens biologiques et géologiques. L'analyse d'images à plusieurs longueurs d'ondes permet de caractériser les signatures spectrales des phénomènes. Cependant, lors de l'acquisition, les images subissent diverses dégradations pouvant nuire aux traitements quantitatifs postérieurs, nécessitant de restaurer l'objet original à partir du signal dégradé. Lorsque l'on doit traiter un grand nombre de pixels, les méthodes hyperspectrales existantes deviennent coûteuses en calcul tandis que les méthodes rapides s'appliquent à chaque longueur d'onde de manière indépendante. Nous proposons un nouvel algorithme efficace de déconvolution, permettant de traiter rapidement des images multispectrales ou hyperspectrales de grande taille.

Abstract – Fluorescence microscopy is a popular technique for multidimensional analysis of biological and geological specimens. Within this framework, hyperspectral imaging allows to provide additional information on the sample of interest. However, the acquisition process induces various degradations on the image which can prevent quantitative post-processing treatment algorithms from producing accurate results. Fluorescence imaging thus benefits from restoration techniques such as deconvolution. To the best of our knowledge, only a few works specifically focus on the problem of hyperspectral fluorescence image restoration. We present here a restoration method that is specifically designed to process large multidimensional hyperspectral images.

1 Introduction

La microscopie confocale de fluorescence est une technique classique d'imagerie permettant d'obtenir des représentations *bi-* ou *tridimensionnelles* de spécimens biologiques [1] et géologiques [2], l'utilisation de marqueurs génétiques offrant la possibilité d'observations *in vivo*. En acquérant les images à plusieurs longueurs d'onde, il est possible de caractériser spectralement les phénomènes mis en jeu. Cependant, lors du processus d'acquisition, les images subissent diverses dégradations [3, 4] se traduisant principalement par un flou lié au phénomène déterministe de diffraction ainsi qu'un bruit de mesure. Un traitement quantitatif des images obtenues (reconnaissance de formes, séparation de sources, *etc.*) impose ainsi une étape préalable de restauration.

Dans le champ isoplanétique de l'instrument, le système optique est linéaire et invariant et l'image observée \mathbf{i} est donnée par la convolution bruitée de l'objet \mathbf{o} par la réponse impulsionnelle \mathbf{h} du microscope (image d'un point source), abrégée PSF pour *Point-Spread Function*. Dans la suite, les images sont définies comme des distributions discrètes d'intensité lumineuse et le modèle de formation à chaque longueur d'onde λ est donné par :

$$\mathbf{i}_\lambda(\mathbf{s}) = \mathbf{h}_\lambda(\mathbf{s}) *_{\mathbf{s}} \mathbf{o}_\lambda(\mathbf{s}) + \mathbf{n}_\lambda(\mathbf{s}) \quad (1)$$

où $\mathbf{s} = (x, y)$ ou (x, y, z) désigne la variable spatiale 2D ou 3D, $*_{\mathbf{s}}$ l'opération de convolution spatiale (puisque les mesures à chaque longueur d'onde n'interfèrent pas entre elles) et \mathbf{n} est un terme de bruit additif indépendant et identiquement distribué (*i.i.d.*) selon une loi gaussienne, modélisant conjointement erreurs de modèle et bruit de mesure [3]. \mathbf{i} peut être vue comme une pile d'images ou *bandes* chacune associées à une longueur d'onde. Le problème de déconvolution consiste à estimer l'objet \mathbf{o} connaissant l'image \mathbf{i} et la PSF \mathbf{h} , cette dernière pouvant être modélisée physiquement ou mesurée expérimentalement [5].

De nombreuses méthodes ont été développées pour la restauration d'images de fluorescence [6, 7]. Cependant, peu d'entre elles sont adaptées aux images multispectrales - acquisition de l'image à quelques bandes spécifiques - et hyperspectrales - nombreuses bandes contiguës. Il est souhaitable que la restauration d'une image à une bande donnée λ prenne en compte les bandes adjacentes ($\lambda + \delta\lambda$) [8]. Cette information supplémentaire implique des temps de calcul plus longs ce qui peut poser problème dans le cas d'un nombre important de pixels à traiter. Dans cet article, nous proposons une méthode de déconvolution prenant en compte l'aspect hyperspectral en se restreignant à de faibles temps de calcul.

*Ce travail a bénéficié du soutien de l'Agence Nationale de la Recherche ANR-09-BLAN-0336-04.

La finalité de notre algorithme est l'analyse d'images de bactéries génétiquement modifiées, acquises sur un microscope confocal. Les données hyperspectrales caractérisent la réaction de ces biocapteurs à divers stimuli environnementaux, comme la présence de métaux toxiques dans le sol [9]. Ici, la PSF varie fortement avec la longueur d'onde λ (puisque'elle caractérise un phénomène de diffraction [10]) et l'objet $\mathbf{o}_\lambda(\mathbf{s})$ est constitué des spectres de fluorescence émis par les biocapteurs présents à chaque position spatiale. Physiquement, la solution attendue $\mathbf{o}_\lambda(\mathbf{s})$ est régulière (lisse) spatialement et spectralement.

2 Déconvolution hyperspectrale

Dans toute la suite, on considère des signaux 3D : à λ fixé, $\mathbf{i}_\lambda(\mathbf{s})$, $\mathbf{o}_\lambda(\mathbf{s})$ et $\mathbf{h}_\lambda(\mathbf{s})$ sont des matrices de taille $N_x \times N_y$ et $\mathbf{s} = (x, y)$ (les résultats admettent une extension immédiate au cas 4D). Sans perte de généralité, les bandes discrètes seront représentées par une notation entière : $\lambda = 1, 2, \text{etc.}$

2.1 Formulation du problème

Le problème de déconvolution est typiquement mal-posé [11] et il est nécessaire de régulariser la solution. Notre approche est basée sur la méthode classique de Tikhonov et favorise des signatures spectrales et des images spatialement régulières. Le problème de restauration consiste à minimiser la fonction de coût suivante dans $\mathbb{R}^{N_x N_y N_\lambda}$:

$$j(\mathbf{o}) = \sum_{\lambda=1}^{N_\lambda} \left(\|\mathbf{i}_\lambda(\mathbf{s}) - \mathbf{h}_\lambda(\mathbf{s}) *_{\mathbf{s}} \mathbf{o}_\lambda(\mathbf{s})\|^2 + \mu_s \|\mathbf{d}_x *_{\mathbf{s}} \mathbf{o}_\lambda(\mathbf{s})\|^2 + \mu_s \|\mathbf{d}_y *_{\mathbf{s}} \mathbf{o}_\lambda(\mathbf{s})\|^2 \right) + \mu_\lambda \sum_{\lambda=1}^{N_\lambda-1} \|\mathbf{o}_{\lambda+1}(\mathbf{s}) - \mathbf{o}_\lambda(\mathbf{s})\|^2 \quad (2)$$

où $\|\cdot\|$ désigne la norme de Frobenius, *i.e.* $\|\cdot\|^2$ est la somme des carrés des éléments des tenseurs et \mathbf{d}_x et \mathbf{d}_y sont les filtres dérivateurs 1D donnés par $[-1, 1]$ dans les directions respectives x et y . Les paramètres de régularisation μ_s et μ_λ contrôlent le degré de lissage spatial et spectral de la solution.

2.2 Domaine de Fourier

L'opération spatiale de convolution correspond au produit terme à terme (dénnoté \times) dans le domaine de Fourier. À l'aide du Théorème de Parseval, le critère (2) se réécrit

$$\mathcal{J}(\mathbf{O}) = \sum_{\lambda=1}^{N_\lambda} \left(\|\mathbf{I}_\lambda(\mathbf{f}) - \mathbf{H}_\lambda(\mathbf{f}) \times \mathbf{O}_\lambda(\mathbf{f})\|^2 + \mu_s \|\mathbf{D}_s(\mathbf{f}) \times \mathbf{O}_\lambda(\mathbf{f})\|^2 \right) + \mu_\lambda \sum_{\lambda=1}^{N_\lambda-1} \|\mathbf{O}_{\lambda+1}(\mathbf{f}) - \mathbf{O}_\lambda(\mathbf{f})\|^2 \quad (3)$$

où les majuscules désignent les *Transformées de Fourier Discrètes* (TFD) 2D des images correspondantes dans le domaine spatial, et $\mathbf{f} = (f_x, f_y)$ représente les fréquences spatiales discrétisées sur une grille de $N_x \times N_y$. Dans l'équation (3), l'opérateur \mathbf{D}_s est défini par $|\mathbf{D}_s(\mathbf{f})|^2 = |D(f_x)|^2 + |D(f_y)|^2$ où D est la TFD-1D du filtre $[-1, 1]$.

2.3 Minimisation sans contraintes

Afin d'obtenir une solution $\mathbf{o}_\lambda(\mathbf{s})$ à valeurs réelles, il est nécessaire d'imposer que \mathbf{O}_λ soit à symétrie hermitienne : $\forall \lambda, \forall \mathbf{f}, \mathbf{O}_\lambda^*(-\mathbf{f}) = \mathbf{O}_\lambda(\mathbf{f})$ où la notation \cdot^* désigne le complexe conjugué. Ainsi, le problème revient à minimiser sans contraintes le critère

$$\mathcal{J}^+(\mathbf{O}^+) = 2 \sum_{\mathbf{f}|f_x \geq 0} \left\{ \sum_{\lambda=1}^{N_\lambda} |\mathbf{I}_\lambda(\mathbf{f}) - \mathbf{H}_\lambda(\mathbf{f}) \mathbf{O}_\lambda(\mathbf{f})|^2 + \mu_s \times |\mathbf{D}_s(\mathbf{f}) \mathbf{O}_\lambda(\mathbf{f})|^2 + \mu_\lambda \sum_{\lambda=1}^{N_\lambda-1} |\mathbf{O}_{\lambda+1}(\mathbf{f}) - \mathbf{O}_\lambda(\mathbf{f})|^2 \right\} \quad (4)$$

où \mathbf{O}^+ rassemble les valeurs de $\mathbf{O}_\lambda(\mathbf{f})$ telles que $f_x \geq 0$. La solution complète est obtenue à partir du minimum de (4) en utilisant la propriété de symétrie hermitienne.

2.4 Minimisation séparable

La fonction de coût (4) est séparable en \mathbf{f} donc le problème de minimisation se ramène à $N_x/2 \times N_y \times N_\lambda$ problèmes indépendants, chacun correspondant à une certaine fréquence spatiale \mathbf{f} . À \mathbf{f} fixé, \mathbf{v}_o et \mathbf{v}_i désignent les spectres

$$\mathbf{v}_o = \{\mathbf{O}_\lambda(\mathbf{f}), \lambda = 1, \dots, N_\lambda\} \quad (5)$$

$$\mathbf{v}_i = \{\mathbf{I}_\lambda(\mathbf{f}), \lambda = 1, \dots, N_\lambda\} \quad (6)$$

et $\Delta_{\mathbf{H}}$ la matrice diagonale

$$\Delta_{\mathbf{H}} = \text{diag}\{\mathbf{H}_\lambda(\mathbf{f}), \lambda = 1, \dots, N_\lambda\}. \quad (7)$$

La minimisation de \mathcal{J}^+ par rapport à \mathbf{v}_o est un problème quadratique à N_λ inconnues et peut s'écrire sous forme matricielle :

$$\min_{\mathbf{v}_o} \|\mathbf{v}_i - \Delta_{\mathbf{H}} \mathbf{v}_o\|^2 + \mu_s |\mathbf{D}_s(\mathbf{f})|^2 \|\mathbf{v}_o\|^2 + \mu_\lambda \|\mathbf{D}_\lambda \mathbf{v}_o\|^2 \quad (8)$$

où \mathbf{D}_λ est la matrice de différence de taille $(N_\lambda - 1) \times N_\lambda$, représentée ci-dessous par $N_\lambda = 4$:

$$\mathbf{D}_\lambda = \begin{pmatrix} -1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 1 \end{pmatrix}. \quad (9)$$

Le problème (8) est finalement équivalent à la minimisation de la fonction

$$F(\mathbf{v}_o) = \mathbf{v}_o^* \mathbf{A} \mathbf{v}_o - 2\text{Re}(\mathbf{v}_i^* \Delta_{\mathbf{H}} \mathbf{v}_o) \quad (10)$$

où \mathbf{A} est la matrice réelle tridiagonale de taille $N_\lambda \times N_\lambda$ donnée par

$$\mathbf{A} = \Delta_{\mathbf{H}}^* \Delta_{\mathbf{H}} + \mu_s |\mathbf{D}_s(\mathbf{f})|^2 \mathbf{I}_{N_\lambda} + \mu_\lambda \mathbf{D}_\lambda^t \mathbf{D}_\lambda \quad (11)$$

et \mathbf{I}_{N_λ} est la matrice identité de taille $N_\lambda \times N_\lambda$. Pour tout \mathbf{f} , la solution \mathbf{v}_o est alors simplement donnée par l'expression

$$\mathbf{v}_o = \mathbf{A}^{-1} \Delta_{\mathbf{H}}^* \mathbf{v}_i. \quad (12)$$

2.5 Algorithme

1. Pour tout λ , calculer les TFD-2D de \mathbf{i}_λ et \mathbf{h}_λ par FFT-2D ;
2. Pour tout \mathbf{f} tel que $f_x \geq 0$, indiquer \mathbf{v}_i et $\Delta_{\mathbf{H}}$ à l'aide de (6) et (7) et calculer \mathbf{v}_o à l'aide de (12) (inversion d'un système tridiagonal de taille $N_\lambda \times N_\lambda$) ;
3. Pour tout \mathbf{f} tel que $f_x < 0$, calculer par symétrie $\mathbf{O}_\lambda(\mathbf{f}) = \mathbf{O}_\lambda^*(-\mathbf{f})$;
4. Pour tout λ , calculer la TFD-2D inverse de \mathbf{O}_λ par iFFT-2D.

3 Résultats expérimentaux

3.1 Formation des images

Les performances de l'algorithme ont été évaluées à l'aide de données synthétiques visant à reproduire une pile d'images hyperspectrales de biocapteurs bactériens dispersés dans une matrice minérale de type sol acquises par un microscope confocal. La simulation des données se fait à l'aide d'un modèle de mélange associant $P = 3$ spectres imitant l'allure de spectres de fluorescence (correspondant à différents fluorochromes) à un ensemble de bactéries modélisées par des disques générés aléatoirement. Les images obtenues sont proches d'images réelles de bactéries modifiées génétiquement de manière à produire des protéines fluorescentes lors d'une exposition à des stimuli environnementaux [8]. Le modèle physique de la PSF confocale est approximé par une gaussienne bidimensionnelle de variance dépendant des paramètres physiques du modèle [12]. Les images sont générées de manière à obtenir un rapport signal-à-bruit de 15 dB. Les performances ont également été testées avec succès dans le cas d'une pile d'images 3D mais les résultats ne sont pas représentés dans cet article pour des raisons graphiques.

3.2 Aspect quantitatif

Les performances de l'algorithme sont comparées à celles de la méthode consistant à restaurer indépendamment chaque bande, *i.e.* sans imposer de régularisation spectrale (dans la suite, cette dernière méthode sera abusivement désignée par "Tikhonov").

Une manière d'évaluer la qualité de restauration consiste à mesurer la distance entre l'objet original et l'image restaurée en calculant leur *Erreur Quadratique Moyenne* (EQM). Pour ce faire, l'ensemble des valeurs possibles des hyperparamètres est discrétisé sur une grille logarithmique et les signaux sont normalisés à l'unité. Dans chaque cas,

l'EQM retenue correspond à la valeur minimum obtenue sur la grille et les résultats sont présentés dans le tableau 1.

Signaux	EQM
(\mathbf{o}, \mathbf{i})	5.2047e+03
($\mathbf{o}, \hat{\mathbf{o}}$) (Tikhonov)	1.4137e+03
($\mathbf{o}, \hat{\mathbf{o}}$) (Algorithme)	1.0969e+03

TAB. 1: Erreur quadratique moyenne avant et après restauration.

La prise en compte de la régularisation spectrale permet de diminuer l'EQM de 79% par rapport à l'image dégradée et de 22.5% par rapport à la solution de Tikhonov, ce qui peut être attribué à l'introduction d'un degré de liberté supplémentaire correspondant à l'hyperparamètre μ_λ . Ce résultat doit être mis en perspective avec l'augmentation du coût de calcul introduit par la méthode, les performances étant évaluées en traitant une pile de $N_\lambda = 16$ images 2D possédant 10^6 pixels. La solution obtenue par notre algorithme nécessite un temps de calcul de 160 secondes pour une implémentation MATLAB sur un processeur Intel Core 2 Duo 2.4 Ghz avec une RAM de 4 Go. A titre de comparaison, le temps de restauration du même signal par la méthode de Tikhonov s'élève à 90 secondes sur la même architecture. Pour notre algorithme, le temps de calcul est dominé par la résolution du système (12) : une implémentation parallèle plus rapide (multi-processeurs) pourrait tirer profit de la séparabilité du critère et éviter les calculs redondants lors de l'inversion.

3.3 Aspect qualitatif

Les performances de l'algorithme peuvent également être évaluées de manière visuelle : voir figure 1. Il apparaît que la régularisation spectrale permet d'éliminer certains artéfacts associés à la solution de Tikhonov. L'intérêt véritable de la méthode semble cependant intervenir dans le cas d'un recouvrement spatial de plusieurs bactéries. La prise en compte de l'information présente dans les bandes adjacentes permet de différencier des structures spatiales proches ou se chevauchant et ainsi d'obtenir une meilleure résolution spatiale. Ceci peut s'interpréter comme un compromis entre régularisation spectrale et spatiale.

4 Conclusion

Nous proposons dans cet article un algorithme efficace de déconvolution d'images hyperspectrales de fluorescence. L'approche classique de Tikhonov est modifiée de manière à prendre en compte la corrélation existant entre les bandes adjacentes. La méthode est basée sur la solution explicite d'un critère dans le domaine de Fourier et pour-

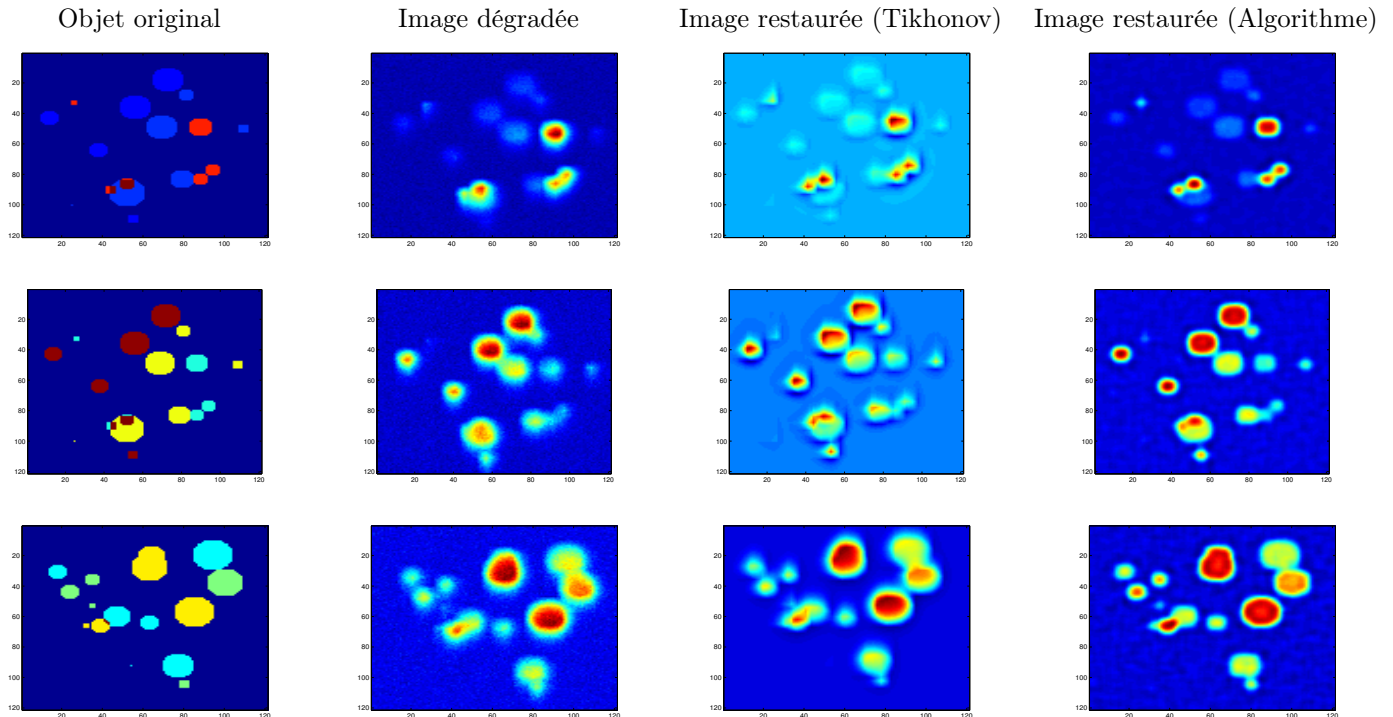


FIG. 1: Images synthétiques de biocapteurs bactériens acquises à une bande fixée. L'échelle de couleurs du bleu au rouge correspond à l'amplitude des pixels. Les deux premières lignes représentent la même scène hyperspectrale observée à deux bandes distinctes ; la troisième ligne correspond à une scène différente.

rait être implantée de manière efficace par parallélisation. Les résultats expérimentaux obtenus sur des données synthétiques sont prometteurs et montrent que la régularisation spectrale permet d'augmenter la résolution spatiale de manière à mieux distinguer des objets se chevauchant spatialement. Il est envisageable d'étendre la dépendance spectrale de la solution à un voisinage plus large à l'aide d'un opérateur de régularisation différent, ainsi que de préserver les contours de manière plus robuste à l'aide de termes de pénalisation convexes non quadratiques.

References

- [1] C. Vonesch, F. Aguet, J.-L. Vonesch, and M. Unser, "The colored revolution of bioimaging," *IEEE Sig. Proc. Mag.*, vol. 23, pp. 20–31, 2006.
- [2] C. Soussen, S. Miron, F. Caland, D. Brie, P. Billard, and C. Mustin, "Complexity reduction by convex cone detection for unmixing hyperspectral images of bacterial biosensors," in *Eur. Sig. Proc. Conference*, 2009.
- [3] G.M.P. van Kempen, *Image restoration in fluorescence microscopy*, Ph.D. dissertation, Technische Universiteit Delft, 1999.
- [4] J. W. Goodman, *Introduction to Fourier Optics*, Roberts & Company Publishers, 2004.
- [5] N. Dey, L. Blanc-Féraud, C. Zimmer, P. Roux, Z. Kam, J.-C. Olivo-Marin, and J. Zérubia, "3D microscopy deconvolution using Richardson-Lucy algorithm with total variation regularization," Rapport de recherche n° 5272, Institut National de Recherche en Informatique et en Automatique, 2004.
- [6] J.G. McNally, T. Karpova, J. Cooper, and J.A. Conchello, "Three-dimensional imaging by deconvolution microscopy," *Methods*, vol. 19, pp. 373–385, 1999.
- [7] P. Sarder and A. Nehorai, "Deconvolution methods for 3D fluorescence microscopy images," *IEEE Sig. Proc. Mag.*, vol. 23, pp. 32–45, 2006.
- [8] F. Soulez, E. Thiébaud, A. Gressard, R. Dauphin, and S. Bongard, "Heterogeneous multidimensional data deblurring," in *Eur. Sig. Proc. Conference*, 2008.
- [9] M-A. Dollard and P. Billard, "Whole-cell bacterial sensors for the monitoring of phosphate bioavailability," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 55, no. 1, pp. 221–229, Oct. 2003.
- [10] S.F. Gibson and F. Lanni, "Experimental test of an analytical model of aberration in oil-immersion objective lens used in three-dimensional light microscopy," *J. Opt. Soc. Amer. A.*, vol. 8, pp. 1601–1612, 1991.
- [11] G. Demoment and J. Idier, "Inverse problems, ill-posed problems," in *Bayesian Approach to Inverse Problems*, J. Idier, Ed., pp. 25–40. 2008.
- [12] B. Zhang, J. Zerubia, and J.-C. Olivo-Marin, "Gaussian approximations of fluorescence microscope point-spread function models," *Applied Optics*, vol. 46, pp. 1819–1829, 2007.