

Restauration aveugle d'image 3D de microscopie de fluorescence avec prise en compte des aberrations sphériques et contrainte de phase

Saima BEN HADJ¹, Laure BLANC-FÉRAUD¹, Gilbert ENGLER²

¹Groupe de recherche Morphème - I3S/INRIA/CNRS/IBV/UNS
2000, route des Lucioles, 06903 Sophia Antipolis Cedex, France

²Unité IBSV, INRA, 06903 Sophia Antipolis, France.

Saima.Ben_Hadj@inria.fr, Laure.Blanc_Feraud@inria.fr, gilbert.engler@sophia.inra.fr

Résumé – Les images tridimensionnelles de microscopie de fluorescence confocale présentent un flou variant en profondeur, dû aux changements d'indice de réfraction dans les chemins optiques, conduisant à des aberrations sphériques du système optique. Notre but est de proposer une méthode de restauration des images de microscopie 3D qui prend en compte ces dégradations variables en profondeur. La difficulté est que ces aberrations dépendent de paramètres liés au spécimen biologique imagé. La fonction de flou (ou PSF pour *Point Spread Function* en anglais) variable spatialement doit donc être estimée spécifiquement pour chaque observation. Nous utilisons une méthode d'estimation conjointe du spécimen biologique (image restaurée) et de la PSF 3D dont la variation en profondeur est modélisée par une combinaison convexe d'un ensemble de PSF invariables spatialement. Nous ajoutons une contrainte de phase sur la PSF, contrainte qui nous est donnée par la géométrie du système optique qui est connue. Nous définissons un algorithme d'estimation par minimisation de critère dans lequel nous intégrons un algorithme de Gerchberg-Saxton pour l'estimation de phase sous contrainte. Ainsi sont imposées lors de l'estimation par optimisation des contraintes spatiales et fréquentielles. Nous montrons des résultats d'estimation de PSF variantes en profondeur et de restauration d'image.

Abstract – The three-dimensional images of fluorescence confocal microscopy show a depth varying blur, due to changes of refractive index in the optical paths, resulting in spherical aberrations of the optical system. Our goal is to provide a method for restoring images of 3D microscopy which takes into account such a depth varying blur. The difficulty is that these aberrations depend on parameters related to the imaged biological specimen. The space-variant blur function (or PSF Point Spread Function) must be estimated specifically for each observation. We use a joint estimation method of the biological specimen (restored image) and the 3D PSF whose variation in depth is modeled by a convex combination of a set of space-invariant PSF. In this work, we add a phase constraint on the PSF. This constraint is given by the geometry of the optical system which is known. We define an estimation algorithm by minimizing a constrained criterion in which we add a Gerchberg Saxton algorithm for the phase estimation. Hence, spatial and frequency constraints are both included in the estimation algorithm. We show results of this blind restoration algorithm with space variant PSF.

1 Introduction

La microscopie de fluorescence confocale permet d'imager des échantillons biologiques 3D vivants, à une résolution de quelques centaines de nanomètres. La qualité de ces images et la résolution sont limitées par la physique d'acquisition. Ces images ont principalement deux types de distorsion : un flou et un bruit. Le flou provient de la diffraction liée à l'optique, ainsi que des changements d'indice de réfraction dans les chemins optiques, conduisant à des aberrations sphériques du système optique produisant un flou variable en profondeur. Le bruit est un bruit de Poisson dû au processus de comptage de photons au niveau du détecteur. La question de la connaissance de la fonction de flou ou PSF pour *Point Spread Function* en anglais est cruciale pour la restauration de ces images. Il existe des modèles mathématiques de la physique d'acquisition définissant cette PSF 3D pour la microscopie confocale de fluorescence, comme par exemple le modèle [5] que nous utilisons pour les simulations. La difficulté est que ce modèle dépend

de paramètres physiques qui sont parfois inconnus, en particulier les paramètres liés au spécimen biologique comme ses indices de réfraction. De plus l'estimation précise des PSF en chaque point de l'image 3D est un problème hautement sous-déterminé. En effet si l'image d'origine contient n voxels alors le nombre d'inconnues est $n^2 + n$, car il y a n PSF chacune de dimension n , plus l'image à restaurer de dimension n .

Dans des travaux antérieurs, nous avons approché la PSF 3D par une PSF variant uniquement en fonction de la profondeur, et modélisée par une combinaison convexe d'un ensemble de PSF spatialement invariables. La PSF résultante est variable continument en profondeur. Une méthode d'estimation conjointe du spécimen biologique (image restaurée) et de la PSF 3D ainsi modélisée a été proposée dans [1] et est résumée au paragraphe 2.

Dans ce travail, nous proposons de rajouter une contrainte supplémentaire sur la phase des PSF. En effet, le modèle de PSF issu de la physique en microscopie confocale est défini à partir d'une fonction complexe [3, 5], la PSF 3D finale en étant

le module puissance 4. Nous prenons en compte la structure du modèle dans Fourier et une contrainte de support donnée par l'ouverture du système optique qui est connue. Nous proposons d'utiliser l'algorithme d'estimations alternées sur l'image et les PSF présenté dans [1], et d'y ajouter une étape d'estimation de la phase par un algorithme de Gerchberg-Saxton (GS) [7, 4] permettant l'introduction de la contrainte de support sur la phase. Nous développons le modèle et l'algorithme d'estimation utilisé et présentons des résultats sur des simulations montrant l'intérêt de la prise en compte de cette contrainte supplémentaire.

2 Critère MAPJ

Soient f et g deux fonctions à variables dans $\mathcal{I} \subset \mathbb{N}^3$, désignant respectivement l'image originale et l'image dégradée, \mathcal{I} étant le support des images discrètes. Le modèle d'observation est donnée par la statistique de Poisson suivante :

$$g(x, y, z) \sim \mathcal{P} \left(\tilde{H}(f)(x, y, z) + b_g \right) \quad (1)$$

où $b_g > 0$ est une constante modélisant le bruit de fond, provenant de l'auto-fluorescence du spécimen ou de la diffusion de la lumière. Cette constante peut être estimée en amont sur l'image observée à partir d'une région ne contenant pas le spécimen biologique. L'opérateur de flou \tilde{H} variable en profondeur peut être modélisé par l'équation suivante [1] :

$$\tilde{H}(f) = \sum_{1 \leq i \leq M} h^i * (\psi^i \cdot f) \quad (2)$$

où $h^i, i = 1, \dots, M$ est un ensemble de PSF spatialement invariants prises à différentes profondeurs fixées a priori, et $\psi^i : \mathcal{I} \rightarrow [0, 1], 1 \leq i \leq M$ est un ensemble de fonctions de pondération telles que $\sum_{1 \leq i \leq M} \psi^i(x, y, z) = 1$. Le choix

des fonctions de pondération est discuté dans [3] où les auteurs ont montré que des fonctions linéaires suffisent pour obtenir une bonne restauration. Nous considérons alors des fonctions $\psi^i(x, y, z)$ qui varient linéairement suivant l'axe (OZ) et constantes suivant les axes (OX) et (OY). En fixant ces fonctions, le problème de la restauration aveugle en flou variable revient à estimer les PSF h^i et l'image f . Ceci est obtenu par minimisation du critère suivant [1] :

$$\begin{aligned} J(f, h^1, \dots, h^M) = & \sum_{(x,y,z) \in \mathcal{I}} [\tilde{H}(f)(x, y, z) \\ & - g(x, y, z) \log (\tilde{H}(f)(x, y, z) + b_g)] \\ & + \alpha \|\nabla f\|_1 + \sum_{1 \leq i \leq M} \beta^i \|\nabla h^i\|_2^2 \end{aligned} \quad (3)$$

Les deux premiers termes d'attache aux données sont liés à la statistique poissonnienne. Le troisième terme, définit la variation totale sur l'image et permet de reconstruire une image avec des contours nets. Le dernier terme permet d'obtenir des PSF

régulières et favorise des PSF plates et étalées, ce qui permet de capter dans les PSF tout le flou des images observées. α et $\beta^i, i = 1, \dots, M$ sont des paramètres de régularisation. Ainsi les deux termes de régularisation tendent à modéliser tout le flou dans \tilde{H} et non dans l'image f . Nous définissons respectivement l'ensemble des images et l'ensemble des PSF admissibles par :

$$\begin{aligned} C_f &= \{f; f \geq 0; \|f\|_1 = \|g - b_g\|_1\}, \\ C_h &= \{h; h \geq 0; \|h\|_1 = 1; \text{supp}(h) \subset B\}. \end{aligned} \quad (4)$$

La contrainte d'égalité sur f traduit la préservation de flux lors de l'acquisition, la contrainte d'égalité sur les h^i traduit la normalisation des PSF. On peut montrer que si les PSF h^i sont normalisée alors la PSF variable \tilde{H} définie en (2) l'est aussi et que ceci est équivalent à la conservation de flux sur la variable f . Bien que redondants, nous imposons ces deux ensembles de contraintes car l'optimisation se fait alternativement sur chacune des variables f et h^i pour $i = 1, \dots, M$. L'algorithme d'estimation jointe de l'image et des PSF, proposé dans [1] consiste à minimiser le critère (3) alternativement en f , et en $h^i, i = 1, \dots, M$, en itérant les étapes suivantes :

1. Estimation de l'objet par SGP [2] :

$$f^{(k+1)} = \arg \min_{f \in C_f} J \left(f, \hat{h}^{1(k)}, \dots, \hat{h}^{M(k)} \right) \quad (5)$$

2. Estimation des PSF par SGP [2] :
pour chaque $i = 1, \dots, M$,

$$\hat{h}^{i(k+1)} = \arg \min_{h^i \in C_h} J \left(\hat{f}^{(k+1)}, \hat{h}^{1(k)}, h^i, \dots, \hat{h}^{M(k)} \right) \quad (6)$$

Chacune des optimisations partielles est un problème d'optimisation convexe sous contraintes convexes. Notons que l'optimisation globale est un problème de minimisation non convexe. Nous utilisons l'algorithme SGP pour *Scaled Gradient Projection method* proposé dans [2] pour les optimisations partielles en chaque variable. L'algorithme SGP est un algorithme de type gradient projeté, le critère est supposé différentiable, aussi nous utilisons une approximation régulière de la Variation Totale. L'algorithme SGP utilise une matrice d'échelle de telle sorte que cette matrice et le pas de gradient sont optimisés conjointement pour obtenir un algorithme rapide de type quasi-Newton à chaque étape. Dans [8], l'auteur étudie la convergence globale de l'algorithme lorsque les minimisations par rapport à chaque variable sont partielles. Nous avons noté un bon comportement numérique de l'algorithme sur données simulées et réelles [1]. Les résultats dépendent de l'initialisation, les PSF h^i sont initialisées par le modèle théorique de Stokseth [3, 5] en supposant que l'indice de réfraction du spécimen biologique est celui de son milieu (l'eau en général).

3 Estimation avec prise en compte de contrainte de phase sur la PSF

Le problème d'estimation aveugle étant sous-déterminé, il est important d'injecter le plus d'information possible sur les variables. Les PSF proviennent de la modélisation de l'optique en microscopie confocale [3, 5]. Dans cette modélisation, la PSF s'écrit [3]

$$h^i(x, y, z) = |h_A^i(x, y, z)|^4$$

où h_A^i est une fonction complexe $h_A^i(x, y, z) \in \mathbb{C}$. De plus, nous avons

$$h_A^i(x, y, z) = TF_{2D}^{-1}(P^i(k_x, k_y, z))$$

où $P^i(k_x, k_y, z) \in \mathbb{C}$ est la fonction pupille 2D pour chaque coupe en Z , et k_x, k_y sont les coordonnées fréquentielles 2D.

Cette fonction peut être décomposée en deux termes :

$$P^i(k_x, k_y, z) = P_a^i(k_x, k_y) P_d(k_x, k_y, z). \quad (7)$$

Le terme $P_d(k_x, k_y, z)$ modélise la défocalisation de l'optique et est connu (donné par des paramètres physiques du système). Le terme $P_a^i(k_x, k_y) \in \mathbb{C}$ lié au spécimen biologique, décrit les aberrations que subit le front d'onde en traversant des milieux d'indices de réfraction différents. Ce terme est inconnu car il dépend de l'indice de réfraction échantillonné dans le volume du spécimen. Le support C de ce terme est un disque de rayon donné par l'ouverture numérique (NA) du microscope :

$$C = \{(k_x, k_y) \in \mathbb{N}^2; \sqrt{k_x^2 + k_y^2} < \frac{2\pi}{\lambda} NA\} \quad (8)$$

Cette modélisation permet d'imposer des contraintes supplémentaires sur les PSF (forme et support).

Pour prendre en compte ces contraintes de phase, nous ajoutons à l'algorithme précédent une étape d'estimation de la fonction complexe h_A^i à partir de l'amplitude \hat{h}^i estimée en (2). Plus particulièrement on estime le terme P_a^i , les autres termes étant fixés par le système d'acquisition. Pour estimer le terme P_a^i à partir des \hat{h}^i (fonctions réelles), nous utilisons l'algorithme de Gerchberg-Saxton (GS) qui a été précédemment appliqué avec succès dans [4] en microscopie de fluorescence à champ large. L'estimation est obtenue en alternant des contraintes dans les domaines spatial (module de h_A^i donné par \hat{h}^i) et fréquentiel (structure de h_A^i donnée et support de P_a^i donné par C). L'algorithme global d'estimation est alors le suivant, k étant le compteur d'itération :

1. Estimation de l'objet par l'algorithme SGP [2] (équation (5))
2. Estimation des PSF : pour chaque $i = 1, \dots, M$, itérer les étapes suivantes :
 - (a) Estimation de la PSF en intensité par l'algorithme SGP [2] (équation (2))
 - (b) Estimation du terme d'aberration $P_a^i(k_x, k_y)$ à partir de la PSF \hat{h}^i par l'algorithme GS [4].

- (c) Calcul de la PSF h^i à partir du terme d'aberration :
$$\hat{h}^i(x, y, z) = |TF_{2D}^{-1}(P_d(k_x, k_y, z) P_a^i(k_x, k_y))|^4$$

L'algorithme GS [4], alternant des contraintes dans les domaines spatial et fréquentiel, se déroule comme suit :

Initialiser $h_A^{i(k+1)} = 0$

1. Remplacer le module de $h_A^{i(k+1)}$ par $\sqrt[4]{\hat{h}^{i(k+1)}}$
2. Calculer pour chaque coupe z le terme :

$$P_a^{i(k+1)}(k_x, k_y) = TF_{2D}\left(h_A^{i(k+1)}(x, y, z)\right) P_d^{-1}(k_x, k_y, z)$$

ensuite calculer $P_a^{i(k+1)}$ comme étant la moyenne de ces termes calculées pour les différentes z .

3. Projeter $P_a^{i(k+1)}$ sur l'ensemble des fonctions de support inclus dans

$$C = \{(k_x, k_y) \in \mathbb{N}^2; \sqrt{k_x^2 + k_y^2} < \frac{2\pi}{\lambda} NA\}$$

4. Calculer pour chaque coupe en z la PSF cohérente par l'équation suivante :

$$h_A^{i(k+1)}(x, y, z) = TF_{2D}^{-1}\left(P_d(k_x, k_y, z) \cdot P_a^{i(k)}(k_x, k_y)\right)$$

Les étapes 1 à 4 sont itérées jusqu'à stabilisation de la fonction \hat{h}^i . La convergence de l'algorithme proposée vers un minimum de J sous un ensemble de contraintes, dont les contraintes de phase, reste à définir. Les résultats numériques obtenus montrent néanmoins un bon comportement de l'algorithme et une amélioration des résultats d'estimation lorsque la contrainte de phase est appliquée.

4 Tests numériques

Nous avons généré numériquement une image 3D de coquille de bille dont une coupe (Y, Z) est présentée dans la figure 1 (b). Nous avons dégradé cette image par un flou variable en profondeur (pour chaque coupe en z , nous avons utilisé une nouvelle PSF calculée par le modèle de [3, 5]) et par un bruit poissonien (cf. figure 1 (a)). Nous avons ensuite restauré cette image par l'algorithme proposé en utilisant une combinaison de 3 PSF. Les paramètres de régularisation sont choisis par une procédure automatique. Nous utilisons une mesure de qualité sans référence proposée dans [9] pour des images 2D que nous avons étendue aux images 3D. La mesure de qualité sans référence Q est grande pour une image sans flou et sans bruit et diminue avec le flou, avec le bruit, et avec les deux conjointement. Ainsi, nous calculons pour un ensemble de valeurs prédéfinies des hyperparamètres, la solution de l'optimisation de (3). Pour chacune des images f résultat, nous calculons la mesure

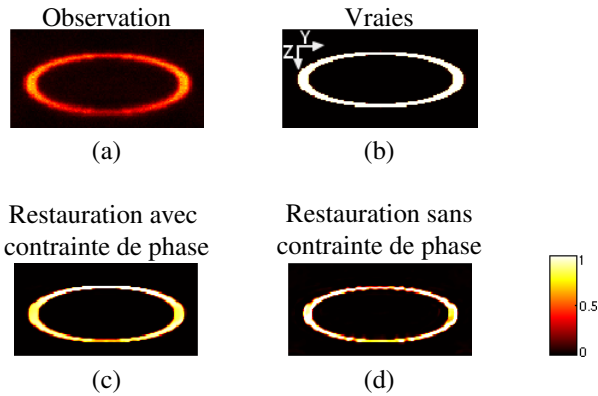


FIGURE 1 – Coupes (Y , Z) de l’observation (a), l’image originale (b), l’image (c) est la restauration avec l’algorithme proposé incluant la contrainte de phase, l’image (d) est estimée par l’algorithme [1] sans contrainte de phase.

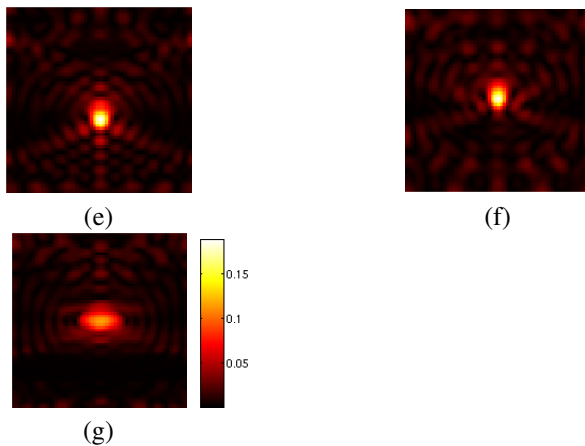


FIGURE 2 – Coupes (Y , Z) de l’une des 3 PSF : image (a) vraie PSF, l’image (b) est la PSF estimée avec l’algorithme proposé incluant la contrainte de phase, l’image (c) est estimée par l’algorithme [1] sans contrainte de phase.

de qualité Q . Les hyperparamètres sélectionnés sont ceux donnant la valeur de Q maximale. Les valeurs pour le test proposé ici sont : $\alpha = 10^{-3}$, $\beta^1 = 4 \cdot 10^4$, $\beta^2 = 5 \cdot 10^5$, $\beta^3 = 5 \cdot 10^5$. L’image restaurée par l’algorithme avec contrainte de phase est présentée en figure 1 (c) et en figure 1(d) nous présentons l’image restaurée lorsque les PSF sont estimées sans la contrainte de phase [1]. Les PSF correspondante vraies et estimées sont présentées figure 2. On peut constater que la prise en compte de la contrainte de phase améliore la forme de la PSF estimée par rapport à la vraie PSF.

5 Conclusion

Dans cet article nous avons étudiée l’influence d’une contrainte de phase sur le problème de restauration aveugle, contrainte donnée par la modelisation du système optique. L’introduction de cette contrainte est réalisée par un algorithme de Gerchberg-

Saxton imbriqué dans un algorithme de minimisation alternée de critère pour l’estimation jointe de la PSF et de l’objet. L’application de cet algorithme sur des donnée simulée a montré une bonne estimation. D’autres tests sont conduits sur des exemples simulés ainsi que des exemples de spécimens biologiques réels pour compléter ces résultats préliminaires. Une méthode optimisant directement les paramètres des PSF sur le modèle complexe est à l’étude, ce qui éviterait ces algorithmes d’optimisation imbriqués (par exemple la méthode développée dans [10] dans le cas de PSF stationnaire).

Références

- [1] S. Ben Hadj, L. Blanc-Féraud, G. Aubert, *Space Variant Blind Image Restoration*. Rapport de recherche INRIA 8073, Septembre, 2012.
- [2] S. Bonettini, R. Zanella, et L. Zanni. *A scaled gradient projection method for constrained image deblurring*. Inverse Problems, 2009, 25 : 015002.
- [3] A. Egner, et S.W. Hell. *Aberrations in confocal and multi-photon fluorescence microscopy induced by refractive index mismatch*. Handbook of Biological Confocal Microscopy, 2006, 404–413.
- [4] B.M. Hanser, M.G.L. Gustafsson, D.A. Agard et J.W. Sedat. *Phase retrieval for high-numerical-aperture optical systems*. Optics letters, 2003, 28(10) : 801–803.
- [5] P.A. Stokseth. *Properties of a defocused optical system*. JOSA, 1969, 59(10) : 1314–1321.
- [6] S. Yuan, et C. Preza. *3D fluorescence microscopy imaging accounting for depth-varying point-spread functions predicted by a strata interpolation method and a principal component analysis method*. SPIE, 2011, 19(23) : 23298-23314.
- [7] J.R. Fienup. *Phase retrieval algorithms : a comparison*. Applied Optics, 1982, 15(21) : 2758-2769.
- [8] S. Bonettini *Inexact block coordinate descent methods with application to non-negative matrix factorization* IMA journal of numerical analysis, 2011, 31(4) :1431-1452.
- [9] X. Zhu et P. Milanfar *Automatic parameter selection for denoting algorithms using a no reference measure of image content*. IEEE Transactions on Image Processing, 2010, 19(12) : 3116-3132.
- [10] F. Soulez, L. Denis, 3, Y. Tourneur, E. Thiébaud *Blind deconvolution of 3D data in wide field fluorescence microscopy*. IEEE International Symposium on Biomedical Imaging, Barcelone, Espagne, 2012.