

# Accélération de la méthode de microscopie à illumination structurée à l'aide de l'acquisition comprimée

William MEINIEL<sup>1,2</sup>, Piernicola SPINICELLI<sup>1</sup>, Elsa D. ANGELINI<sup>2,3</sup>, Alexandra FRAGOLA<sup>4</sup>, Vincent LORIETTE<sup>4</sup>, François ORIEUX<sup>5</sup>, Eduardo SEPULVEDA<sup>6</sup>, Jean-Christophe OLIVO-MARIN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut Pasteur, Unité AIB, CNRS UMR 3691, Paris, France, <sup>2</sup>Télécom ParisTech, Université Paris-Saclay, France,

<sup>3</sup>ITMAT DSG, NIHR Imperial BRC, Imperial College London, UK, <sup>4</sup>ESPCI ParisTech, LPEM, CNRS UMR 8213, France,

<sup>5</sup>L2S, CNRS, Centrale Supélec, Université Paris-Saclay, France, <sup>6</sup>LPNHE, IN2P3, CNRS UMR 7585, UPMC, France.

william.meiniel@pasteur.fr, piernicola.spinicelli@pasteur.fr

**Résumé** – Dans cet article, nous proposons une méthode pour appliquer la théorie de l'Acquisition Comprimée (Compressed Sensing - CS) à une technique de super-résolution : la microscopie à illumination structurée (SIM). Nous commençons par définir le cadre d'application du CS en domaine direct, en exploitant la parcimonie dans le domaine de Fourier d'images en microscopie à fluorescence. Ensuite, nous proposons d'appliquer cette méthode à la reconstruction SIM à 4 images, ce qui permet de reconstruire des images en microscopie à fluorescence super-résolues, en n'utilisant que 25% des pixels de la caméra pour chaque acquisition.

**Abstract** – In this work, we introduce an original strategy to apply the Compressed Sensing (CS) framework to a super-resolution Structured Illumination Microscopy (SIM) technique. We first define a framework for direct domain CS, that exploits the sparsity of fluorescence microscopy images in the Fourier domain. We then propose an application of this method to a fast 4-images SIM technique, which allows to reconstruct super-resolved fluorescence microscopy images using only 25% of the camera pixels for each acquisition..

## 1 Introduction

Ces dernières années, la microscopie à fluorescence est devenue un outil indispensable pour les expériences en biologie. Plusieurs techniques ont été proposées pour surpasser la limite de diffraction de la lumière [1]. Parmi celles-ci, on peut noter les techniques de super-résolution en champ lointain telles que le STED, le PALM/STORM, et la microscopie à illumination structurée (SIM), introduite par Gustaffson en 2000 [2]. Le SIM est l'une des techniques de super-résolution les moins invasives, et est donc adaptée aux échantillons biologiques. Le principe est le suivant : l'échantillon biologique est illuminé par une série de réseaux sinusoïdaux de haute fréquence. Cette illumination permet d'injecter les informations hautes-fréquences de l'échantillon à l'intérieur de la limite de résolution, en exploitant l'effet Moiré, qui résulte de l'interférence entre la figure d'illumination et les détails dans l'échantillon.

Bien que le SIM ait déjà démontré sa capacité à reconstruire des images de fluorescence haute résolution, la difficulté de cette reconstruction l'empêche d'être utilisé à grande échelle en biologie. Les études dynamiques d'échantillons vivants sont limitées par le nombre d'acquisitions nécessaires à la reconstruction d'une image super-résolue (au moins 9 images). De plus, le développement de nouvelles caméras CMOS, et leur plus grande densité de pixels, entraîne la nécessité de traiter d'importantes quantités de données, ce qui pourrait devenir limitant pour la diffusion de cette nouvelle technique de super-résolution.

Dans cet article, nous proposons une méthode originale, ba-

sée sur la théorie de l'acquisition comprimée (CS), afin de compenser ces difficultés en réduisant, d'un facteur jusqu'à 4, le nombre de données acquises nécessaires à la reconstruction d'images SIM super-résolues, sans perte de résolution ni de rapport signal sur bruit.

## 2 Acquisition Comprimée en domaine direct

### 2.1 Acquisition comprimée

L'acquisition comprimée est une théorie mathématiques développée dans les travaux de Candès [3] et Donoho [4] en 2006. Cette théorie prouve qu'un signal parcimonieux peut être reconstruit à partir d'un faible nombre de données acquises aléatoirement. Dans le cadre de l'acquisition d'images, il s'agit de reconstruire l'image réelle  $x \in \mathbb{R}^N$  à partir de l'observation donnée  $y = \Phi x \in \mathbb{R}^M$  (avec  $M \ll N$ ), où  $\Phi \in \mathbb{R}^{M \times N}$  représente l'opérateur de mesure. L'image  $x$  a une représentation parcimonieuse par rapport à un dictionnaire connu  $\Psi \in \mathbb{R}^{N \times L}$ . Cela signifie qu'il existe une image  $s \in \mathbb{R}^L$  avec seulement  $S$  pixels non-nuls ( $S \ll N$ ), telle que  $x = \Psi s$ . La théorie du CS montre que, sous certaines conditions [3], il est possible de reconstruire un estimateur  $\hat{x}_{CS}$  de l'image réelle  $x$  à partir de l'observation  $y$  en résolvant le problème d'optimisation :

$$\hat{x}_{CS} = \arg \min_{x \in \mathbb{R}^N} \|\Psi^\dagger x\|_1 \text{ tel que } \Phi x = y \quad (1)$$

où  $\Psi^\dagger$  est le pseudo-inverse de l'opérateur  $\Psi$ .

## 2.2 Parcimonie dans le domaine de Fourier

La notion de parcimonie est centrale dans la théorie du CS, mais les images naturelles ou biologiques sont rarement parcimonieuses. D'autre part, dans le contexte de la microscopie, toutes les images ont une propriété commune : elles sont le résultat d'une convolution entre l'échantillon illuminé et la fonction d'étalement du point (PSF) du microscope. Cela entraîne une baisse de résolution, ce que l'on peut modéliser par un filtre passe-bas dans le domaine de Fourier. On peut modéliser ce phénomène en donnant la valeur zéro à la plupart des coefficients de Fourier de l'image, ce qui correspond à la rendre parcimonieuse, avec un degré de parcimonie directement proportionnel au support spatial de la PSF du système.

La plupart des applications du CS considèrent un échantillonnage aléatoire dans le domaine de Fourier pour reconstruire une image qui est parcimonieuse (ou plus vraisemblablement compressible) dans le domaine direct (à une éventuelle transformée près). Nous proposons ici de suivre l'approche opposée, en considérant des images parcimonieuses dans le domaine de Fourier, que l'on reconstruit à partir d'un échantillonnage dans le domaine direct.

Nos résultats montrent qu'il est possible de reconstruire une image SIM  $x$  à partir d'un nombre limité de pixels  $y$ , avec une erreur de reconstruction contrôlée (voir [5]).

On définit les opérateurs  $\Phi$  et  $\Psi$  comme suit : d'abord, l'opérateur de mesure  $\Phi \in \{0, 1\}^{M \times N}$  est une matrice de sélection dans le domaine direct, où  $M$  est le nombre de pixels sélectionnées parmi les  $N$  pixels de la caméra. Le taux d'échantillonnage est défini par  $\tau = \frac{M}{N} \in [0, 1]$ . La transformation parcimonieuse est alors simplement la transformée de Fourier usuelle  $\mathcal{F}$ .

Le problème d'optimisation CS (1) s'écrit :

$$\hat{x}_{CS} = \arg \min_{x \in \mathbb{R}^N} \|\mathcal{F}(x)\|_1 \text{ tel que } \Phi x = y \quad (2)$$

que nous résolvons en utilisant l'algorithme NESTA [6].

## 3 Microscopie à Illumination Structurée rapide

Le principe du SIM est d'illuminer un échantillon biologique donné avec une série de grilles, d'observer les interférences en résultant à travers un microscope, et d'enfin reconstruire une image super-résolue à partir de ces observations. Dans le contexte du SIM linéaire, les grilles d'illumination sont des modulations sinusoïdales, que l'on peut écrire, pour chaque pixel  $(p, q)$  :

$$I(p, q) = I_0 (1 + \alpha \cos(2\pi(k_p p + k_q q + \varphi)))$$

où  $I_0$  est l'intensité moyenne de l'illumination,  $\alpha$  est l'amplitude de la modulation,  $(k_p, k_q)$  contiennent son orientation et sa fréquence, et  $\varphi$  sa phase.

Dans l'implémentation SIM standard [2],  $K = 9$  observations sont faites pour reconstruire une seule image SIM. Dans

[7], une approche alternative au SIM standard a été proposée, basée sur une formulation Bayésienne du problème inverse, et qui ne requiert que  $K = 4$  acquisitions pour générer une image super-résolue. Dans la suite, nous appellerons cette technique le *SIM4i*.

## 3.1 Reconstruction SIM

Mathématiquement, l'acquisition de chaque image brute  $g_k \in \mathbb{R}^N$ ,  $k = [1, 2, \dots, K]$  peut être modélisée de la manière suivante :

$$g_k = H I_k f + n_k \quad (3)$$

où  $f \in \mathbb{R}^N$  est l'image haute-résolution à reconstruire,  $H$  représente la PSF du microscope,  $I_k$  est la grille d'illumination de l'observation  $k$ , et  $n_k$  est le terme de bruit l'affectant. La figure d'illumination ne change pas l'effet passe-bas de la PSF, mais la fréquence de la modulation doit rester dans le support spectral de la PSF.

Ensuite, si l'on regroupe les  $K$  images brutes en un vecteur  $g = [g_1, \dots, g_K]$ , le modèle global peut être écrit :

$$g = \tilde{H} I R f + n \quad (4)$$

où  $\tilde{H}$  et  $I$  sont des matrices diagonales par blocs contenant respectivement  $H$  et  $I_k$  dans chaque bloc,  $R$  est une matrice de réplication, et  $n$  est le terme de bruit global.

La technique *SIM4i* résout un problème inverse qui s'écrit [7] :

$$\hat{f}_{SIM} = \arg \min_{f \in \mathbb{R}^N} \|g - \tilde{H} I R f\|_2^2 + \lambda \|Df\|_2^2 \quad (5)$$

où  $\lambda$  est un hyper-paramètre déterminé par inférence Bayésienne, et  $Df$  est la Hessienne de l'image  $f$ .

## 3.2 CS-SIM

Ici, nous proposons de n'acquérir qu'un sous-ensemble de  $M$  pixels à chaque observation, choisis aléatoirement. En utilisant les notations définies ci-dessus, le modèle d'acquisition (3) devient :

$$g_k = \Phi (H I_k f + n_k)$$

Maintenant, on résout le problème d'optimisation (2), afin de reconstruire un estimateur  $\hat{g}_{k,CS}$  à partir de l'observation  $g_k$ . Enfin, en regroupant les  $K$  estimateurs  $\hat{g}_{k,CS}$  dans un vecteur  $\hat{g}_{CS}$ , on peut appliquer le problème inverse *SIM4i* (5), et on décrit la reconstruction CS-SIM :

$$\hat{f}_{CS-SIM} = \arg \min_{f \in \mathbb{R}^N} \|\hat{g}_{CS} - \tilde{H} I R f\|_2^2 + \lambda \|Df\|_2^2 \quad (6)$$

## 4 Résultats expérimentaux

### 4.1 Jeu de données

Nous avons testé l'algorithme CS-SIM sur deux images. La première est une image de test synthétique, conçue pour évaluer les méthodes de super-résolution [8]. On n'affiche sur les

figures Fig 1-2 qu’une partie de l’image originale (taille de l’image =  $400 \times 400$  pixels, taille du pixel = 25nm) pour plus de clarté. La seconde est une image de cellules Hela obtenue en microscopie à fluorescence (taille de image =  $400 \times 400$  pixels, taille du pixel = 100nm), acquise dans notre unité, à l’Institut Pasteur. Les deux images servent de vérité terrain haute résolution (HR), que l’on dégrade pour simuler des observations en champ plein, avec une PSF modélisée par une tache d’Airy, dont le disque central a un diamètre de 10 pixels.

Nous avons simulé une acquisition CS-SIM sur chacune des deux images. Comme dans [7], quatre grilles de modulation ont été utilisées, d’angles  $[0, 0, \frac{\pi}{3}, \frac{2\pi}{3}]$ , de phases  $\varphi = [0, \frac{2\pi}{3}, 0, 0]$ , et de fréquences adaptées à la taille du support de la PSF. Le terme de bruit est supposé comme étant un bruit blanc Gaussien de variance  $\sigma^2 = 1$ . Enfin, l’opérateur de mesure  $\Phi$  est une sélection aléatoire uniforme de  $\tau = 25\%$  ou  $\tau = 50\%$  du nombre total de pixels de la caméra pour chaque observation.

## 4.2 Résultats qualitatifs

Les deux images décrites dans la section 4.1 sont utilisées pour évaluer la qualité des reconstructions CS et CS-SIM. On affiche sur les Figures 1-2 des résultats obtenus pour la reconstruction CS ainsi que pour la technique CS-SIM, avec  $\tau = 25\%$  (ce qui correspond à notre objectif pour le SIM rapide) et  $\tau = 50\%$ .

### 4.2.1 Reconstructions CS

Dans Fig.1, nous affichons les images HR et leur observation en champ large, ainsi que leur transformée de Fourier. Cette visualisation confirme la validité de la parcimonie dans le domaine de Fourier, puisque la majorité des coefficients haute fréquence (en dehors du disque central) représentent uniquement du bruit.

Enfin, les deux dernière lignes présentent les résultats de la reconstruction CS de l’image en champ large, pour  $\tau = 25\%$ , qui est le taux d’échantillonnage visé, et  $\tau = 50\%$ , qui présente une amélioration visuelle par rapport au cas  $\tau = 25\%$ .

Lorsque l’on compare les transformées de Fourier des reconstructions CS avec celles des images en champ large originales, on remarque des artefacts de reconstruction au niveau de l’axe vertical central. Ceux-ci sont négligeables sur les images dans le domaine direct, car ils se confondent avec la zone de bruit haute fréquence.

### 4.2.2 CS-SIM

Après avoir appliqué la reconstruction CS sur chacune des  $K = 4$  observations structurées, on affiche sur les Fig.2-3 les résultats de reconstruction CS-SIM pour les deux images test, avec  $\tau = 25\%$  et  $\tau = 50\%$ . On observe clairement l’effet de super-résolution apporté par le SIM, notamment via l’extension du support de la Transformée de Fourier des images reconstruites. La taille du support est la même pour  $\tau = 25\%$  et pour  $\tau = 50\%$ , ce qui permet d’obtenir un gain de résolution d’un facteur 2 dans les deux cas.

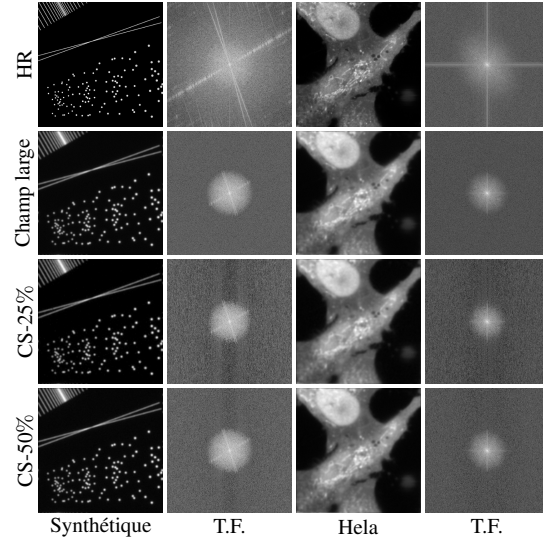


FIGURE 1 – Images haute résolution (HR), observations en champ large et reconstructions CS (avec  $\tau = 25\%$  or  $50\%$ ) des images Synthétique et Hela sous-échantillonnées, ainsi que leurs Transformées de Fourier (F.T.), affichées en vue logarithmique.

Sur la figure 3 sont affichés des zooms sur des parties détaillées des reconstructions, ce qui permet de valider la qualité de la reconstruction à l’échelle du pixel. On peut voir que la résolution est largement améliorée pour  $\tau = 25\%$ , et presque optimale (par rapport à la méthode *SIM4i*) pour  $\tau = 50\%$ . Nous affichons aussi le profil d’intensité le long d’un segment dans chaque image, pour illustrer l’amélioration de contraste, à mi-chemin entre l’image en champ large et l’image HR.

Les deux parties zoomées ont été choisies pour illustrer la capacité de notre méthode à séparer des structures adjacentes telles que deux points à fort contraste, ou trois formes allongées de faible contraste. Les images HR présentent des structures séparées, tandis que les images en champ large les confondent et perdent la structure de l’image. On voit que la méthode originale *SIM4i* et les reconstructions CS-SIM sont capables de distinguer les objets séparés, avec une meilleure estimation de l’intensité dans les zones de faible contraste.

## 4.3 Résultats quantitatifs

Afin d’évaluer de manière quantitative la qualité des images reconstruites, nous utilisons trois mesures : l’erreur moyenne quadratique (MSE), l’indice de similarité structurelle (SSIM) [9], et l’analyse de spectre dans Fourier normalisée (FSA) [10]. La FSA calcule l’énergie moyenne le long de cercles concentriques dont le rayon est inversement proportionnel à la résolution (voir Fig 4). Les mesures MSE et SSIM utilisent une image de référence pour la comparaison, qui est supposée être l’image *idéale*. Ainsi, nous avons utilisé les images en champ large pour l’évaluation des reconstructions CS, et les images HR pour l’évaluation des reconstructions CS-SIM. Toutes les mesures sont effectuées par rapport au taux d’échantillonnage

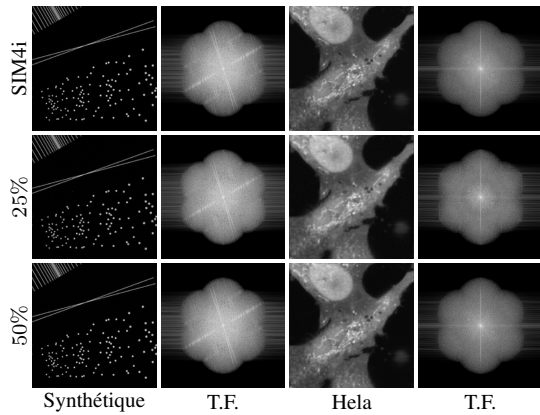


FIGURE 2 – Reconnstructions *SIM4i* et CS-SIM ( $\tau = 25\%$  et  $50\%$ ) des images Synthétique et HeLa, ainsi que leurs Transformées de Fourier (T.F.).

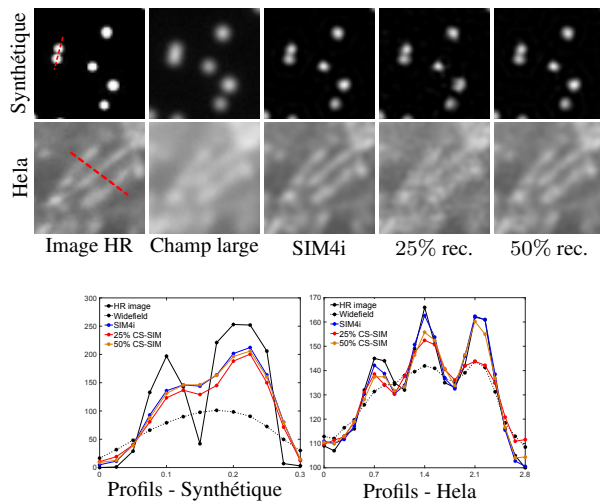


FIGURE 3 – Vue magnifiée (taille de la fenêtre =  $50 \times 50$  pixels) des reconstructions CS-SIM de Fig.2 sur des détails de structure dans les images Synthétique et HeLa. Sur la deuxième ligne sont tracés les profils d'intensité le long des segments en pointillés pour chaque image. L'axe des  $x$  est en  $\mu\text{m}$ .

$\tau$ , et sont reportées sur Fig.4

La mesure FSA normalisée montre que notre méthode CS-SIM reconstruit l'information dans le domaine de Fourier de la même manière que la méthode *SIM4i* originale, pour des valeurs de  $\tau$  aussi faibles que 25%.

Pour la MSE et la SSIM, la qualité de reconstruction CS s'améliore rapidement avec le taux d'échantillonnage. Même si l'erreur n'est jamais exactement nulle (à cause du bruit dans les images), on remarque que la reconstruction CS-SIM présente une forte amélioration dans cette direction. En effet, en terme de MSE, la reconstruction CS-SIM est déjà quasiment exacte pour un taux d'échantillonnage à 40%. La SSIM continue d'augmenter pour des valeurs de  $\tau$  plus élevées, ce qui correspond à l'élimination de légers artefacts autour des bords de petits objets dans les images.

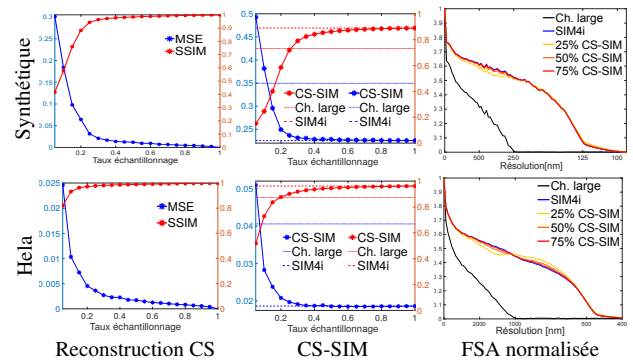


FIGURE 4 – Evaluation quantitative des reconstructions CS contre les images en champ large, et les reconstructions CS-SIM contre les images HR. Pour chaque méthode, on calcule la MSE (en bleu) et la SSIM (en rouge) en fonction du taux d'échantillonnage utilisé pour le CS. Sur la troisième colonne, on mesure la FSA normalisée pour plusieurs reconstructions.

## 5 Conclusion

Dans cet article, nous avons exploré une approche de la microscopie à illumination structurée basée sur l'acquisition comprimée, et proposé un nouvel environnement pour la microscopie en super-résolution rapide. En simulant des acquisitions SIM, nous avons montré que la méthode CS-SIM permet une reconstruction SIM de qualité égale, en utilisant et enregistrant seulement 25% des pixels de la caméra au cours de l'acquisition des images. Cela nous permet de nous rapprocher de nouvelles méthodes, telles que le SIM en temps réel. Dans un futur proche, nous allons appliquer cette méthode à des acquisitions vidéos, et lorsque des caméras à sélection aléatoire de pixels seront disponibles, nous implémenterons notre méthode sur un montage SIM réel.

## Références

- [1] L. Schermelleh, R. Heintzmann, and H. Leonhardt. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 190(2) : 165-175, 2010.
- [2] M.G.L. Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of Microscopy*, 198(2) :82-87, 2000.
- [3] E. Candès, J. Romberg, and T. Tao. Robust uncertainty principles : Exact signal reconstruction from highly incomplete frequency information. *IEEE Transactions on Information Theory*, 52(2) : 489-509, 2006.
- [4] D.L. Donoho. Compressed Sensing. *IEEE Transactions on Information Theory*, 52(4) : 1289-1306, 2006.
- [5] E. Candès. The restricted isometry property and its implications for compressed sensing. *Comptes Rendus Mathématiques*, 346(9-10) : 589-592, 2008.
- [6] S. Becker, J. Bobin, and E. Candès. NESTA : A Fast and Accurate First-Order Method for Sparse Recovery. *SIAM Journal on Imaging Sciences*, 4(1) : 1-39, 2011.
- [7] F. Orieux, E. Sepulveda, V. Lorient, B. Dubertret, and J-C. Olivo-Marin. Bayesian estimation for optimized structured illumination microscopy. *Transactions on Image Processing*, 21(2) : 601-614, 2012.
- [8] K. Wicker. Non-iterative determination of pattern phase in structured illumination microscopy using auto-correlation in Fourier space. *Optics Express*, 21(21) : 24692-24701, 2013.
- [9] Z. Wang, A.C. Bovik. Mean squared error : Love it or leave it ? A new look at Signal Fidelity Measures. *IEEE Signal Processing Magazine*, 26(1) : 98-117, 2009.
- [10] J. Demmerle, E. Wegel, L. Schermelleh, and I.M. Dobbie. Assessing resolution in super-resolution imaging. *Methods*, 88 : 3-10, 2015.