

Approche bayésienne non paramétrique pour l'imagerie de super-résolution PALM

Raphael BACHER¹, Florent CHATELAIN¹, Laurent GUYON²

¹Université Grenoble-Alpes, Gipsa-Lab/DIS
Grenoble Campus BP46, F-38402 SAINT MARTIN D'HERES CEDEX, France

²Université Grenoble-Alpes, CEA iRTSV Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale
Grenoble F-38054, France

raphael.bacher@gipsa-lab.fr, florent.chatelain@gipsa-lab.fr
laurent.guyon@cea.fr

Résumé – La microscopie super-résolution optique est une technique récente qui permet d'améliorer la résolution des images pour passer de quelques centaines à quelques dizaines de nanomètres, et ce sur échantillon biologique vivant. Nous proposons ici d'améliorer l'analyse des piles d'images générées par cette technique d'imagerie avec une approche bayésienne non paramétrique, pour des piles d'images bruitées.

Abstract – Optical super-resolution microscopy is a recent imaging technique. This allows improving the image resolution from a few hundreds to a few tens of nanometers, thus beyond the diffraction limit, for live-cell imaging. This work aims to improve the processing of noisy image stacks delivered by this technique based on a nonparametric Bayesian method.

1 Introduction

La microscopie de super-résolution PALM (Photo Activated Localization Microscopy), est une technique d'imagerie de fluorescence biologique récente et prometteuse. Développée par Betzig *et al.* [1, 2], qui a reçu le prix Nobel de Chimie 2014 pour ce travail, elle permet de dépasser les limites dont souffrent les méthodes de microscopie optique conventionnelles. Du fait de la diffraction optique, l'image d'un objet ponctuel est en effet une tâche, qui correspond à la fonction d'étalement du point (FEP) du dispositif optique. Deux objets plus proches que la largeur à mi-hauteur de la FEP ne pourront alors pas être séparés, ce qui limite en pratique le pouvoir de résolution d'un microscope optique, c'est-à-dire sa capacité à séparer deux sources ponctuelles, à des détails de l'ordre de 200nm. L'imagerie PALM consiste à remplacer les fluorophores usuels (un fluorophore est une molécule qui ré-émet une lumière décalée vers le rouge après excitation lumineuse) par des protéines fluorescentes photo-activables, que l'on peut activer de façon stochastique avec un laser de longueur d'onde différente à celle d'excitation de la fluorescence.

On peut ainsi n'imager à chaque acquisition qu'une faible proportion des fluorophores qui seront ensuite détruits (photo-blanchis) au bout de plusieurs cycles d'excitation/émission de fluorescence. Séparée des autres avec une grande probabilité, la position de chaque molécule fluorescente ac-

tive est alors localisée bien plus précisément que la largeur à mi-hauteur de la tâche de diffraction. En recommençant l'opération un grand nombre de fois (en pratique de l'ordre de plusieurs milliers d'acquisitions), on obtient une pile d'images qui permet de reconstruire l'image super-résolue. Cette technique permet d'obtenir en pratique des résolutions de l'ordre de la dizaine de nanomètres qui ne peuvent pas être atteintes en microscopie optique classique. Elle s'avère également simple à mettre en œuvre, peu coûteuse et permet l'observation *in vivo* des cellules contrairement à la microscopie électronique.

La technique de microscopie PALM étant récente, les algorithmes permettant cette détection sont en plein essor. Parmi les plus connus, on peut citer QuickPALM [4], DAOSTORM [5], RapidSTORM [7]. La plupart des méthodes en cours de développement cherchent avant tout à améliorer la rapidité des traitements (parfois jusqu'à atteindre le traitement en temps réel par rapport à l'acquisition). L'objectif de ce travail est au contraire de s'orienter vers une technique permettant le meilleur gain de résolution. La détection des fluorophores pose le problème de la détection et l'estimation dans un champ de données massif (plusieurs milliers d'images) et bruité de sources ponctuelles dont le nombre, les positions, les intensités ainsi que les instants et durées d'activation sont a priori inconnus... Dans ce contexte, des approches par processus « objets » comme celles proposées pour la détection de galaxies dans des cubes de données hyperspectrales [6] semblent par-

ticulièrement pertinentes. Un fluorophore peut, en effet, être assimilé à un objet ponctuel, plus des marques qui reflètent ses propriétés lumineuses (instant d’activation, durée de la fluorescence, intensité). Dans ce cas, la configuration des fluorophores correspond à la réalisation d’un processus ponctuel marqué. L’originalité de la méthode consiste à se placer dans un cadre bayésien non paramétrique. Cette approche permet de tenir compte des diverses connaissances a priori. Ces dernières sont relatives au système optique (fonction d’étalement du point du microscope), aux spécificités de l’imagerie PALM (émission d’un même fluorophore sur des images contiguës), ainsi que de s’adapter efficacement à la variabilité de l’espace de représentation (nombre de fluorophores inconnus).

Ce papier est organisé de la manière suivante. Le modèle bayésien de processus ponctuel marqué est présenté dans la partie 2, les grandes lignes de l’algorithme d’échantillonnage y étant également esquissées. Les résultats obtenus sur des données réalistes sont présentés dans la partie 3.

2 Modèle Bayésien non paramétrique

On modélise les observations comme un mélange linéaire de sources, chaque source correspondant à la réponse d’un fluorophore u . Un fluorophore est un objet ponctuel caractérisé par sa position $x \in \mathcal{X} \subset \mathbb{R}^2$ dans la scène imagée, plus des marques correspondant respectivement à l’instant d’activation $t \in \mathbb{N}^*$, la durée $d > 0$, et l’intensité d’émission $w > 0$. L’ensemble des fluorophores $\mathbf{u} = \{u_1, u_2, \dots\}$ peut donc être modélisé comme la réalisation d’un processus ponctuel marqué sur $\mathcal{X} \times \mathcal{M}$, où $\mathcal{M} = \{(t, d, w)\}$ désigne l’espace des marques [3]. Les configurations \mathbf{u} sont donc définies sur l’espace, de dimension infinie, des configurations dénombrables d’objets. On note $n(\mathbf{u})$ le nombre d’objets dans la configuration \mathbf{u} .

2.1 Modèle d’observation

On note K le nombre d’images acquises, M le nombre de pixels de chaque image, et \mathbf{Y} la matrice $M \times K$ des observations dont chaque colonne \mathbf{y}_k , pour $1 \leq k \leq K$, correspond à la k ème image vectorisée. On suppose que durant son émission, l’intensité d’un fluorophore est constante au cours du temps, ce qui est en conforme avec les hypothèses physiques du modèle de fluorescence.

Pour une configuration donnée de fluorophores \mathbf{u} , on modélise les observations \mathbf{Y} comme un mélange linéaire de sources, chaque source correspondant à la réponse spatiale et temporelle d’un fluorophore :

$$\mathbf{Y} = \mathbf{H}\Delta_{\mathbf{w}}\mathbf{R} + U\mathbf{m} + \mathbf{N}, \quad (1)$$

où \mathbf{H} est une matrice $M \times n(\mathbf{u})$ dont la i ème colonne \mathbf{h}_i correspond à la réponse spatiale (ℓ_2 normalisée) du fluorophore u_i (la FEP centrée sur la position x_i du fluorophore

u_i), $\Delta_{\mathbf{w}}$ est une matrice diagonale $n(\mathbf{u}) \times n(\mathbf{u})$ dont le i ème terme diagonal est l’intensité w_i du fluorophore u_i , \mathbf{R} est une matrice $n(\mathbf{u}) \times K$ dont la i ème ligne \mathbf{r}_i correspond au profil temporel d’émission (profil constant sur la durée d’émission et ℓ_1 normalisé) du fluorophore u_i , U est la matrice $M \times K$ unité, m est un scalaire qui correspond à la moyenne de la fluorescence parasite du fond, et \mathbf{N} est la matrice $M \times K$ de bruit supposé gaussien centré, blanc de variance σ^2 , qui reflète les fluctuations du fond et le bruit d’acquisition.

La vraisemblance des observations s’écrit donc

$$p(\mathbf{Y}|\mathbf{u}, m, \sigma^2) = \left(\frac{1}{2\pi\sigma^2}\right)^{MK/2} e^{-\frac{\text{tr}(\mathbf{Y}-U\mathbf{m}-\mathbf{Z})^T(\mathbf{Y}-U\mathbf{m}-\mathbf{Z})}{2\sigma^2}},$$

où $\mathbf{Z} = \mathbf{H}\Delta_{\mathbf{w}}\mathbf{R}$ désigne la contribution spatio-temporelle des fluorophores \mathbf{u} .

2.2 A priori sur la configuration \mathbf{u}

La configuration \mathbf{u} est modélisée *a priori* par un processus de Poisson sur $\mathcal{X} \times \mathcal{M}$. Les marques sont supposées *a priori* indépendantes.

On note p_0 la probabilité d’activation à chaque acquisition. Cette probabilité est liée à la puissance du laser d’activation. L’instant d’activation t_i du fluorophore u_i est alors distribué selon une loi géométrique de paramètre p_0 , i.e. $p(t_i|p_0) = (1-p_0)^{t_i-1}p_0$ pour $t_i \in \mathbb{N}^*$.

L’intensité w_i d’activation du fluorophore u_i est modélisée par une loi exponentielle $p(w_i|\lambda) = \lambda \exp(-\lambda w_i)$ sur \mathbb{R}^+ . Notons que la normalisation ℓ_1 des profils temporels d’intensité \mathbf{r}_i garantit la contrainte physique selon laquelle les flux totaux d’intensité de chaque fluorophore sont identiquement distribués.

Enfin, la durée de fluorescence d_i du fluorophore u_i est modélisée par une loi exponentielle afin de pénaliser les trop grandes durées : $p(d_i|\mu) = \mu \exp(-\mu d_i)$ sur \mathbb{R}^+ .

Dans un contexte bayésien hiérarchique, les hyperparamètres p_0 , λ et μ sont finalement eux-mêmes supposés aléatoires, et modélisés selon des lois conjuguées suffisamment vagues pour assurer la robustesse de la méthode en l’absence d’information. La probabilité p_0 est modélisée selon une loi uniforme, et λ et μ sont modélisés selon une loi Gamma $\mathcal{G}(1, \chi)$ où le paramètre d’échelle χ est choisi suffisamment grand (par exemple, $\chi = 10^3$).

La configuration \mathbf{x} des positions des fluorophores est finalement modélisée par un processus de Poisson homogène d’intensité β sur \mathcal{X} . Dans un contexte bayésien hiérarchique, on obtient alors après marginalisation du paramètre β , voir [6], la densité suivante par rapport à la mesure du processus de Poisson homogène d’intensité unitaire :

$$p(\mathbf{x}) = q^{n(\mathbf{u})} n(\mathbf{u})!,$$

où $q = b/(1+b)$ où b est une constante suffisamment grande, typiquement $b = 10^3$. En marginalisant les hyperparamètres, on obtient finalement l’expression suivante de

la densité *a priori* d'une configuration définie par rapport à la mesure du Processus de Poisson unitaire sur $\mathcal{X} \times \mathcal{M}$:

$$p(\mathbf{u}) = B\left(n(\mathbf{u}) + 1, \sum_{i=1}^{n(\mathbf{u})} t_i - n(\mathbf{u}) + 1\right) \frac{n(\mathbf{u})!}{[\text{tr}(\Delta_{\mathbf{w}}) + \frac{1}{\lambda}]^{n(\mathbf{u})+1}} \\ \times \frac{n(\mathbf{u})!}{[\sum_{i=0}^{n(\mathbf{u})} d_i + \frac{1}{\lambda}]^{n(\mathbf{u})+1}} q^{n(\mathbf{u})} n(\mathbf{u})!,$$

où $B(\cdot, \cdot)$ et $\Gamma(\cdot)$ sont les fonctions Beta et Gamma.

2.3 Loi a posteriori

Un a priori non-informatif impropre est choisi pour le couple de paramètres (m, σ^2) qui modélisent la fluorescence du fond :

$$p(m, \sigma^2) = \frac{1}{\sigma^2} \mathbb{1}_{(0, +\infty)^2}(m, \sigma^2).$$

La loi *a posteriori* s'écrit finalement

$$p(m, \sigma^2, \mathbf{u} | \mathbf{Y}) \propto p(\mathbf{Y} | \mathbf{u}, m, \sigma^2) p(m, \sigma^2) p(\mathbf{u}). \quad (2)$$

2.4 Echantillonneur à saut réversible

L'estimateur du maximum a posteriori de la configuration est maintenant obtenu en maximisant la loi *a posteriori*. Afin d'explorer le champs de données massif observé, cette optimisation est conduite de manière stochastique (algorithmes d'échantillonnage par méthodes de Monte-Carlo par Chaînes de Markov) afin de se concentrer sur les configurations les plus probables.

L'algorithme MCMC à sauts réversibles utilisé pour échantillonner conjointement la configuration des objets et les paramètres selon la loi *a posteriori* (2) fait intervenir plusieurs types de mouvements, comme détaillé dans [6], qui sont aléatoirement sélectionnés dans la chaîne :

- les paramètres du fond (m, σ^2) sont simulés par un échantillonnage de Gibbs par bloc : simulation de la loi de Student $p(m | \mathbf{Y}, \mathbf{u})$ puis de la loi inverse-gamma $p(\sigma^2 | \mathbf{Y}, \mathbf{u}, m)$,
- l'intensité w_i du fluorophore u_i peut être simulée selon un échantillonnage de Gibbs partiellement effondré : simulation de la loi Gamma $p(\lambda | \mathbf{u})$ de l'hyperparamètre λ , puis simulation selon la loi gaussienne tronquée sur \mathbb{R}^+ : $p(w_i | \mathbf{u}, \mathbf{Y}, m, \sigma^2, \lambda)$,
- les durées d_i et positions x_i du fluorophore u_i sont simulées par échantillonnage de Metropolis-Hastings à marche aléatoire,
- enfin des naissances/morts de fluorophores, qui modifient la dimension du modèle, sont proposées selon des mouvements de Green à saut réversible.

3 Résultats

Le challenge de « Localisation Microscopique » ISBI¹ est un challenge international ouvert et permanent qui

cherche à comparer les logiciels et algorithmes traitant les données PALM/STORM. Des jeux de données synthétiques réalistes et des métriques ont été mis en place afin de permettre l'évaluation et la comparaison des méthodes.

La comparaison se fait sur l'échantillon "Tubulins II"² du challenge ISBI dont on connaît la vérité-terrain. Il s'agit d'une séquence de 2400 images 256×256 , contenant 100000 fluorophores, simulés en l'absence de dérive spatiale du processus d'acquisition, mais avec un bruit non-stationnaire.

3.1 Images super-résolues reconstruites

Les images basses résolutions et super-résolues avec notre méthode sont présentées sur les figures 1 et 2. L'image basse résolution est ici obtenue en calculant pour chaque pixel la variance de l'intensité de ce pixel sur toutes les images. La comparaison de ces images permet bien de constater visuellement le gain de résolution obtenue par rapport à l'image originale, mais également par rapport à l'image super-résolue délivrée par l'algorithme QuickPALM.



FIGURE 1 – Gauche : image basse résolution (variance du profil temporel de chaque pixel) affichée pour la taille originale des pixels (150nm), Droite : image super-résolue obtenue (10 millions d'itérations) affichée pour une taille de pixel de 15nm.

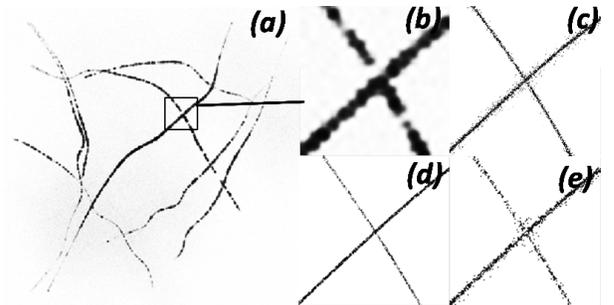


FIGURE 2 – (a) Image basse résolution (variance temporelle des pixels), (b) Détail de l'image basse résolution, (c) Détail de l'image super-résolue issue de notre algorithme, (d) Vérité terrain, (e) Détail de l'image issue de QuickPALM.

1. <http://bigwww.epfl.ch/smlm/>

2. <http://bigwww.epfl.ch/smlm/datasets/index.html?p=tubulins-II>

3.2 Comparaison à l'aide des métriques

La comparaison se fait toujours avec le jeu de données "Tubulins II". Pour une image donnée, un fluorophore de la vérité terrain est mis en correspondance avec le fluorophore proposé par l'algorithme dont il est plus proche, à condition que leur distance soit inférieure à une certaine tolérance³. Le fluorophore proposé est alors considéré comme un vrai positif, et l'on note par la suite $|A \cap B|$ le nombre total de vrais positifs. Différents critères classiques de performances sont reportés pour les logiciels de l'état de l'art QuickPALM, Table 1, RapidSTORM, Table 2, et notre algorithme, Table 3, en fonction de la tolérance considérée.

Pour QuickPALM, 38% des vrais objets ($37772 / 10^5$) sont détectés en utilisant un seuil de rapport signal sur bruit de 3 (seuil qui semble donner sur ce jeu de données les meilleurs résultats).

TABLE 1 – Performances de QuickPALM : 37772 objets détectés (pour un seuil de RSB à 3)

Tolérance (nm)	$ A \cap B $	Jaccard (%)	F-Score	Précision	Rappel	RMSE (nm)
10	7751	5.8	0.1	0.2	0.07	6.8
20	17409	14.4	0.25	0.46	0.17	12.0
50	27272	24.7	0.39	0.72	0.27	22.6
100	34370	33.2	0.49	0.90	0.34	38.8
150	36682	36.2	0.53	0.97	0.36	49.9
200	37455	37	0.54	0.99	0.37	57.4

Pour RapidSTORM, on fixe le seuil d'intensité minimale à 100, ce qui semble être ici le meilleur compromis pour l'utilisation du logiciel en mode simplifié. On détecte plus de 150000 fluorophores, dont énormément de faux positifs, ce qui explique que la précision soit beaucoup moins bonne que pour QuickPALM.

TABLE 2 – Performances de RapidSTORM : 157763 objets détectés (seuil en niveau de gris de 100)

Tolérance (nm)	$ A \cap B $	Jaccard (%)	F-Score	Précision	Rappel	RMSE (nm)
10	15294	6.31	0.12	0.10	0.15	6.60
20	28827	12.59	0.22	0.18	0.29	11.04
50	36300	16.39	0.28	0.23	0.36	17.17
100	391440	17.91	0.30	0.25	0.39	26.57
150	40030	18.38	0.31	0.25	0.40	33.49
200	40138	18.44	0.31	0.25	0.40	37.00

Notre algorithme détecte en tout 65156 objets (10 millions d'itérations effectuées, soit 2 heures de calcul sur un serveur multicœurs). On constate que RapidSTORM positionne correctement plus d'objets à une tolérance de 10 nm mais au prix de très nombreuses fausses détections. Globalement notre algorithme arrive à mieux reconstruire le jeu de données (61% de fluorophores détectés contre 40% et 38% si on se base sur la tolérance maximale de 200 nm) tout en ne fournissant que très peu de faux positif (97% de précision contre 25% pour RapidSTORM). Ces résul-

tats illustrent les performances de la méthode proposée qui offre bien un gain de précision significatif par rapport à des logiciels de l'état de l'art.

TABLE 3 – Performances de notre algorithme : 65156 objets détectés, 10 millions d'itérations

Tolérance (nm)	$ A \cap B $	Jaccard (%)	F-Score	Précision	Rappel	RMSE (nm)
10	11609	7.66	0.14	0.18	0.12	6.89
20	32234	24.63	0.40	0.51	0.32	12.85
50	55678	51.82	0.68	0.88	0.56	22.48
100	60510	58.97	0.74	0.96	0.61	30.10
150	61367	60.31	0.75	0.97	0.61	35.30
200	61467	60.47	0.75	0.97	0.61	39.66

Conclusions et Perspectives

La méthode proposée s'avère performante par rapport aux logiciels existants déjà utilisés par les biologistes. Afin de gagner encore en précision, des termes de régularisation spatiale pourraient être introduits dans le modèle pour mieux s'adapter aux structures imagées. Enfin, l'information d'intensité pourrait être utilisée afin d'estimer la profondeur des fluorophores au sein de la cellule et de proposer une reconstruction 3D.

Remerciements

Les auteurs souhaitent remercier Olivier Michel pour son aide précieuse. Ces travaux ont été partiellement financés par un projet jeunes chercheurs 2013 du GDR-ISIS, ainsi que par le GDR 2588 "Microscopie Fonctionnelle du Vivant" et le labex Gal.

Références

- [1] E. Betzig. Proposed method for molecular optical imaging. *Opt. Lett.*, 20(3) :237–239, Feb 1995.
- [2] Eric Betzig, George H. Patterson, Rachid Sougrat, and al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5793) :1642–5, September 2006.
- [3] Xavier Descombes. *Applications de la géométrie stochastique à l'analyse d'images*. IC2 : Série Traitement du signal et de l'image. Hermes Science Publications, 2011.
- [4] Ricardo Henriques, Mickael Lelek, and EF Fornasiero. QuickPALM : 3D real-time photoactivation nanoscopy image processing in ImageJ. *Nature Methods*, 7(5), 2010.
- [5] Seamus J Holden, Stephan Uphoff, and Achillefs N Kapanidis. DAOSTORM : an algorithm for high-density super-resolution microscopy. *Nature Methods*, 8(4) :279–280, 2011.
- [6] C. Meillier, F. Chatelain, O. Michel, and H. Ayasso. Non-parametric bayesian extraction of object configurations in massive data. *Signal Processing, IEEE Transactions on*, 63(8) :1911–1924, April 2015.
- [7] Steve Wolter, Anna Loschberger, Thorge Holm, Sarah Aufmkolk, and al. rapidSTORM : accurate, fast open-source software for localization microscopy. *Nature Methods*, 9(11) :1040–1041, November 2012.

3. <http://bigwww.epfl.ch/smlm/methods/index.html>