

Acquisition pilotée par la donnée pour accélérer la microscopie point-à-point de type Brillouin

Léo BRECHET¹ Nizar BOUHLEL² Matthieu LOUMAIGNE¹ Li ZHANG³ Fabrizio GALA³ Claudia TESTI³
Emanuele PONTECORVO³ Giancarlo RUOCCO³ David ROUSSEAU¹

¹Université d'Angers, France

²Institut Agro Rennes-Angers, France

³Center for Life Nano Science, Istituto Italiano di Tecnologia, Rome, Italy

⁴CrestOptics S.p.A., Via Di Torre Rossa, 66, 00165 Roma, Italy

Résumé – Nous proposons un protocole de « smart scan », c'est-à-dire une acquisition pilotée par la donnée, pour accélérer l'acquisition de la microscopie Brillouin. Il est basé sur un système d'imagerie bimodale. Dans une première passe, nous utilisons une première modalité d'imagerie plein champ (fluorescence ici) corrélée avec l'information Brillouin qui fournit rapidement une vue globale de la scène. Une segmentation de la région d'intérêt de cette scène est réalisée. Les pixels de la région d'intérêt sont ensuite acquis avec une sonde locale de type Brillouin via un algorithme en ligne qui ajuste de façon auto-adaptative le temps passé sur ces pixels. Nous mettons ici à profit des travaux récents sur l'usage des pixels dits essentiels identifiés dans l'espace des phaseurs spectraux de Fourier.

Abstract – We propose a smart scanning protocol to speed up the acquisition of Brillouin microscopy. It is based on a bimodal imaging system. During a first pass, we use a full-field imaging modality (fluorescence or phase contrast) correlated with Brillouin information to rapidly provide a global view of the scene. A segmentation of the region of interest of this scene is performed. The pixels of this region of interest are then acquired with a local Brillouin probe via an online algorithm that auto-adaptively set the time spent on each of them. We take advantage of recent work on the use of so-called essential pixels identified in the space of Fourier spectral phasors.

1 Introduction

La microscopie Brillouin est une technique d'imagerie spectrale permettant d'accéder aux propriétés mécaniques des matériaux biologiques de manière non invasive [6]. En exploitant la diffusion inélastique de la lumière par les phonons acoustiques, elle offre une cartographie micrométrique des modules élastiques, ouvrant ainsi la voie à de nombreuses applications en biomédecine, notamment dans l'étude des tissus, des cellules et de la biomécanique intracellulaire.

Toutefois, malgré ses avantages en termes de résolution et d'absence de marquage, la microscopie Brillouin souffre d'une limitation majeure : son temps d'acquisition. En raison de la faible intensité du signal Brillouin et de la nécessité d'un balayage spatial point par point, l'imagerie complète d'un échantillon peut s'avérer chronophage et nécessiter des ordres de grandeurs, typiquement de l'ordre de quelques minutes pour une cellule, non compatibles avec un fonctionnement *in vivo*. Cette contrainte entrave son adoption pour des applications nécessitant une dynamique rapide, telles que l'observation en temps réel des processus biologiques.

Dans cette communication, nous proposons une façon d'accélérer l'acquisition de la microscopie Brillouin en la couplant à une imagerie rapide de plein champ et en s'appuyant sur nos travaux récents en acquisition pilotée par la donnée (ou smart scan) pour la microscopie à sonde locale (raster scan en point par point) [4, 5, 1]. Nous étendons ainsi les travaux [1] qui nécessitaient deux passes, et étaient limités à des simulations et une imagerie unimodale.

2 Dispositif expérimental

Nous commençons par présenter succinctement le dispositif expérimental mis en place pour réaliser l'acquisition rapide d'image Brillouin par une approche bimodale. Dans une première étape, une imagerie rapide, dite de plein champ, permet l'acquisition de l'échantillon visé. Dans notre cas, nous utilisons une imagerie de fluorescence. Les objets d'intérêt sont segmentés par rapport au fond via la simple inférence d'un algorithme de fondation pour la segmentation de cellule (typiquement « Cellpose » [7] sans ou avec un ajustement fin sur les données cibles). Le microscope Brillouin va ensuite acquérir un tenseur hyperspectral $I(x, y, \lambda)$, où λ correspond aux longueurs d'ondes de diffusion Brillouin. Celui-ci repose sur une illumination par un laser à 780 nm, et un analyseur VIPA (Virtually Imaged Phased Array) caractérisé par une FSR de 15 GHz. Seuls les pixels situés dans les cellules sont acquis ce qui constitue d'ores et déjà une première voie d'accélération par rapport à un scan systématique classique qui ferait l'acquisition de l'ensemble de l'échantillon (y compris dans le fond qui ne contient aucune information utile). Une seconde voie d'accélération est obtenue en utilisant une adaptation du temps d'exposition de la sonde Brillouin, comme nous le détaillons dans l'algorithme innovant de la prochaine section.

3 Smart scan proposé

Dans l'étape d'initialisation, les spectres de Brillouin $I(x, y, \lambda)$ des trois premiers pixels situés dans les régions d'intérêt de l'échantillon sont acquis à un rapport signal-sur-bruit (RSB) élevé. Ils sont utilisés pour initialiser le calcul d'une enveloppe convexe dans le plan des phaseurs de Fourier [2] ($G_r(x, y); Q_r(x, y)$) avec

$$I(x, y, \lambda) = \frac{1}{L} \sum_{r=1}^L (G_r(x, y) + jQ_r(x, y)) \times \exp\left(j \frac{2\pi}{L} (\lambda - 1)(r - 1)\right) \quad (1)$$

où $G_r(x, y)$ et $Q_r(x, y)$ sont les composantes à valeur réelle du r -ième phaseur, et j le nombre imaginaire. On appelle phaseur un point dans l'espace $G_r(x, y)$ et $Q_r(x, y)$ pour un r fixé. Ensuite, le smart scan opère selon deux modes distincts comme illustré dans la Figure 1.

- Mode 1 : i.e. étape initiale : chaque pixel est d'abord acquis à faible rapport signal sur bruit (par rapport à la deuxième passe). Sa position dans le plan des phaseurs est calculée. Si ce phaseur est situé à l'intérieur de l'enveloppe convexe qui a été définie à l'étape d'initialisation, la mesure spectrale associée est conservée et le processus d'acquisition se répète sur le pixel suivant. Dans le cas contraire, si le phaseur est situé en dehors de l'enveloppe convexe, elle est considérée comme porteuse d'une nouvelle information spectrale, et le processus passe en mode 2.
- Mode 2 : la mesure à faible RSB est remplacée par une acquisition à RSB élevé. Enfin, l'enveloppe convexe est à nouveau calculée et mise à jour avec ce nouveau phaseur, et le processus d'acquisition se répète sur le pixel suivant en mode 1.

Une fois que tous les pixels ont été acquis à RSB élevé ou faible, les spectres des pixels pris à RSB faible sont reconstruits sur la base des spectres essentiels, c'est-à-dire les spectres correspondant aux sommets de l'enveloppe convexe dans le plan du phaseur à l'étape finale. Le cube hyperspectral Brillouin en sortie de l'algorithme $I_{\text{output}}(x, y, \lambda)$ s'écrit

$$I_{\text{output}}(x, y, \lambda) = \begin{cases} I_{\text{high}}(x, y, \lambda) & \text{si mode 1} \\ S_{\text{high}}^T c_{\text{low}}(x, y) & \text{si mode 2} \end{cases} \quad (2)$$

où S_{high} représente les spectres essentiels acquis à RSB élevé, i.e. placés sur l'enveloppe convexe finale dans l'espace des phaseurs et

$$c_{\text{low}}(x, y) = (S_{\text{low}} S_{\text{low}}^T)^{-1} S_{\text{low}} I_{\text{low}}(x, y, \lambda) \quad (3)$$

un vecteur qui contient les K concentrations associées aux spectres essentiels pour le pixel localisé à (x, y) avec $(S_{\text{low}} S_{\text{low}}^T)$ qui est supposée être une matrice de rang complet. Le cube hyperspectral de sortie produit est composé de pixels avec des spectres mesurés et des spectres reconstruits comme indiqué dans l'équation (2). L'hypothèse qui sous-tend le protocole de la Figure 1 est que l'échantillon est composé spectralement d'un mélange linéaire des K composantes formées par les pixels essentiels situés sur l'enveloppe convexe de l'espace des phaseurs.

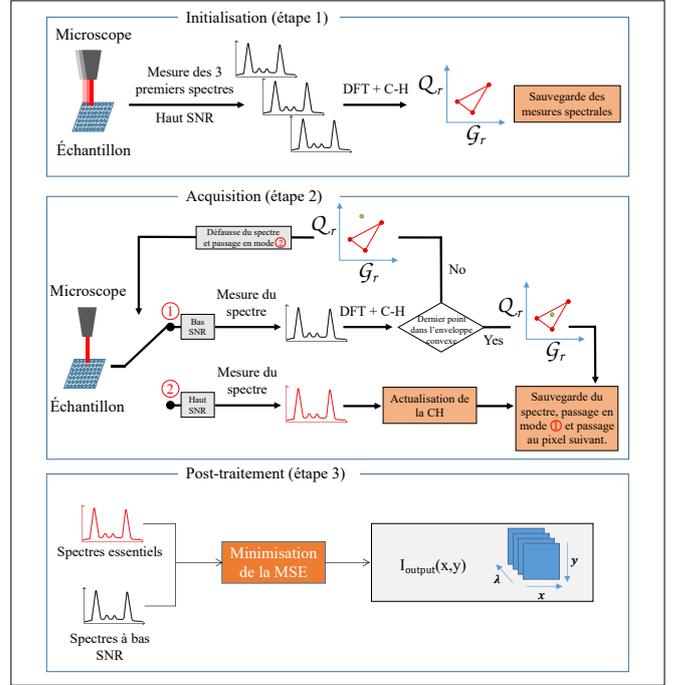


FIGURE 1 : Schéma de l'algorithme de smart scan proposé.

4 Métriques

Notre algorithme de smart scan dépend d'une métrique de rapport signal-sur-bruit (RSB) que nous prenons comme

$$\text{RSB} = 10 \log_{10} \left(\frac{I}{\sigma_N} \right), \quad (4)$$

où I est l'intensité du pic Brillouin et σ_N l'écart type du bruit gaussien observé dans une zone sans signal du spectre.

Pour évaluer la reconstruction de l'image hyperspectrale par le protocole décrit dans la section précédente, nous avons décidé de nous concentrer sur l'évaluation de la restitution du pic de Brillouin anti-Stokes du premier ordre (voir Figure 2).

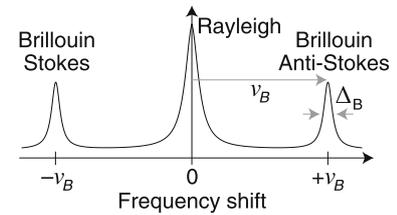


FIGURE 2 : Exemple schématique de spectre acquis en microscopie Brillouin en un point (x, y) . Seules les raies Brillouin portent l'information de propriétés mécaniques du tissu en (x, y) . Les deux raies Brillouin (stokes et anti-stokes) sont identiques à température ambiante et symétriques par rapport au pic Rayleigh. On se concentre sur un seul pic dans ce travail.

Sa caractérisation est en effet essentielle pour étudier la composition de l'échantillon puisqu'il porte la plupart de ses propriétés mécaniques. Ainsi, pour chaque pixel des régions d'intérêt de l'image hyperspectrale reconstruite, nous avons calculé l'erreur absolue moyenne (MAE) du décalage en fré-

quence et de la largeur à mi-hauteur :

$$\nu_{\text{err}} = \frac{1}{XY} \sum_{x=1}^X \sum_{y=1}^Y |\nu_B(x, y) - \nu_{\text{ref}}(x, y)|, \quad (5)$$

$$w_{\text{err}} = \frac{1}{XY} \sum_{x=1}^X \sum_{y=1}^Y |w_B(x, y) - w_{\text{ref}}(x, y)|, \quad (6)$$

où ν_{ref} et w_{ref} désignent respectivement le décalage en fréquence et la largeur à mi-hauteur du pic de Brillouin de la référence à fort RSB, tandis que ν_B et w_B correspondent aux mêmes grandeurs extraites du spectre évalué.

5 Résultats

Nous avons testé notre algorithme auto-adaptatif (Figure 1) sur des cellules souches mésenchymateuses issues de l'étude [3] à différents niveaux de bruit. Les temps d'exposition moyen par pixels et globaux sont indiqués dans les Tableaux 1 et 2. Si le temps passé par pixel avec notre algorithme est supérieur au passage à bas RSB sur un scan complet (ne tirant pas parti de l'imagerie plein champ), il devient possiblement du même ordre de grandeur voir inférieur (suivant les RSB et les tailles de cellules) quand on réduit la zone à scanner (« 1 pass cell »). L'accélération produite par notre algorithme (« 1 pass cell ») par rapport au scan classique complet à fort RSB atteint un facteur entre 15 et 30 suivant les valeurs utilisées pour le niveau bas RSB. Cette accélération s'accompagne d'une distorsion sur l'estimation du décalage Brillouin limitée et 2 à 10 fois plus faible qu'avec un passage complet à bas RSB (Tableau 3). Une illustration est donnée spatialement, spectralement et dans l'espace des phaseurs pour une cellule dans les Fig. 3 à 5.

RSB	Temps d'exposition moyen d'un pixel (ms)		
	Bas RSB	1 pass	1 pass cell
4.3	3.13	4.73 ± 0.4	11.9 ± 3.0
6.8	6.27	7.7 ± 0.4	17.2 ± 6.0
8.9	12.53	14.1 ± 0.4	12.5 ± 1.0

TABLE 1 : Temps d'expositions moyen à l'échelle des pixels. Les moyennes et écarts types sont calculés sur 10 cellules comme celles des Figures 3 et 4.

RSB	Temps d'exposition global (s)			
	Classiques		1 pass	
	Haut RSB	Bas RSB	complet	cell
4.3	447.3	14.01	20.7 ± 1.4	15.74 ± 4.7
6.8		28.03	34.8 ± 1.5	21.4 ± 7.6
8.9		56.06	63.1 ± 1.7	34.31 ± 13.10

TABLE 2 : Temps d'expositions moyen à l'échelle de l'image. Les valeurs sont calculées en ramenant les temps moyens par pixel aux dimensions de la Fig. 3. L'image complète comprend 4473 pixels, alors que la cellule n'en comprend que 1224.

6 Conclusion

Nous avons introduit un nouvel algorithme piloté par la donnée qui ajuste en ligne le temps d'exposition d'un microscope

RSB	MAE des décalages Brillouin		
	bas RSB	1 pass	1 pass cell
4.3	0.21 ± 0.02	0.03615 ± 0.0092	0.026 ± 0.006
6.8	0.103 ± 0.012	0.0407 ± 0.0070	0.032 ± 0.004
8.9	0.051 ± 0.006	0.035 ± 0.005	0.030 ± 0.005

TABLE 3 : Erreurs de reconstruction sur le décalage Brillouin.

point à point de type Brillouin permettant une accélération significative au prix d'une distorsion limitée sur les spectres reconstruits via l'utilisation des phaseurs de Fourier.

7 Remerciements

Financé par l'Union européenne via le programme Horizon Europe Pathfinder dans le cadre de la convention de subvention n° 101098989.

Références

- [1] Leo BRECHET, Valentin GILET, Matthieu LOUMAIGNE, Nizar BOUHLEL, Guillaume MABILLEAU et David ROUSSEAU : On the use of spatial and spectral redundancy to speed-up brillouin micro-imaging. *In 2024 32nd European Signal Processing Conference (EUSIPCO)*, pages 621–625. IEEE, 2024.
- [2] Kareem ELSAYAD : Spectral phasor analysis for Brillouin microspectroscopy. *Frontiers in Physics*, 7:62, 2019.
- [3] Alessandra FASCIANI, Sarah D'ANNUNZIO, Vittoria POLI, Luca FAGNOCCHI, Sven BEYES, Daniela MICHELATTI, Francesco CORAZZA, Laura ANTONELLI, Francesco GREGORETTI, Gennaro OLIVA *et al.* : MII4-associated condensates counterbalance polycomb-mediated nuclear mechanical stress in kabuki syndrome. *Nature genetics*, 52(12):1397–1411, 2020.
- [4] Valentin GILET, Guillaume MABILLEAU, Matthieu LOUMAIGNE, Laureen COIC, Raffaele VITALE, Thomas OBERLIN, José Henrique de MORAIS GOULART, Nicolas DOBIGEON, Cyril RUCKEBUSCH et David ROUSSEAU : Superpixels meet essential spectra for fast raman hyperspectral microimaging. *Optics Express*, 32(1):932–948, 2023.
- [5] Valentin GILET, Guillaume MABILLEAU, Matthieu LOUMAIGNE, Raffaele VITALE, Thomas OBERLIN, José Henrique de MORAIS GOULART, Nicolas DOBIGEON, Cyril RUCKEBUSCH et David ROUSSEAU : Dual-modality sem-raman smart scanning for fast hyperspectral raman micro-imaging—application to bones. *Biomedical Optics Express*, 16(3):935–948, 2025.
- [6] Irina KABAKOVA, Jitao ZHANG, Yuchen XIANG, Silvia CAPONI, Alberto BILENCA, Jochen GUCK et Giuliano SCARCELLI : Brillouin microscopy. *Nature Reviews Methods Primers*, 4(1):8, 2024.
- [7] Marius PACHITARIU et Carsen STRINGER : Cellpose 2.0 : how to train your own model. *Nature methods*, 19(12): 1634–1641, 2022.

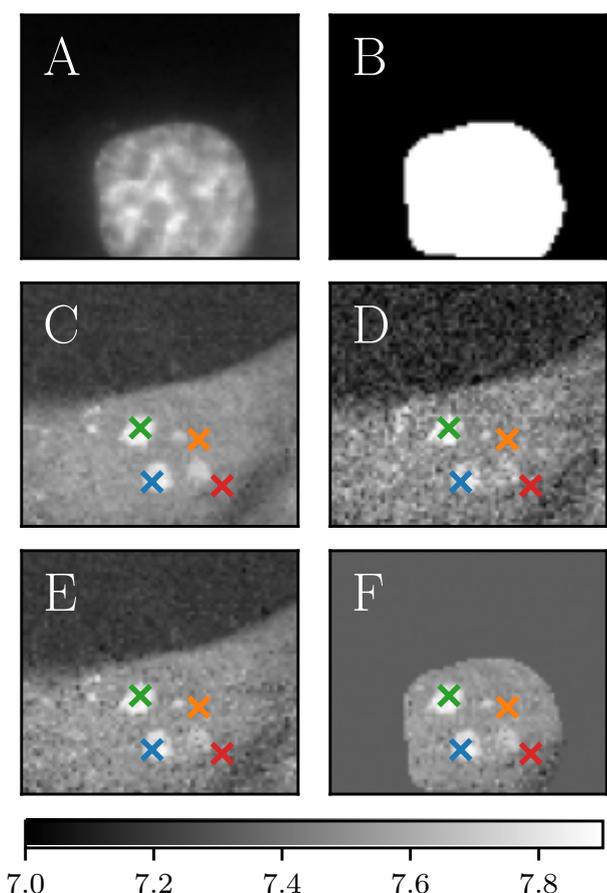


FIGURE 3 : (A) Image de fluorescence (rapide) utilisée pour réaliser après passage dans le réseau de neurones « Cellpose » un masque du cytoplasme de la cellule (B). En (C) l'image de décalage Brillouin à haut RSB (scan de durée 447,30 s, RSB=14.41), en (D) l'image de décalage Brillouin à faible RSB (31.31 s). En (E) notre protocole d'ajustement adaptatif du RSB à une passe de la Figure 2 s'il est appliqué sur l'ensemble de l'image (304.32 s, RSB=7.72). En (F) notre protocole utilisant l'imagerie bimodale (fluorescence-Brillouin) qui adapte son RSB uniquement dans la zone d'intérêt (104.73 s). L'échelle de décalage Brillouin est indiquée en GHz. Il est à noter que la Figure F n'est pas juste un masque de la Figure E puisque l'algorithme auto-adaptatif du RSB de la Figure 1 n'est pas appliqué exactement sur les mêmes données. C'est pourquoi les temps d'exposition moyen par pixel pour E et F sont différents dans le tableau 1. On observe cette différence dans l'espace des phaseurs de la Figure 5 où la diversité de matériau dans le cas de la passe complète apparaît sous la forme de deux gros cluster (en rouge) quand la passe dans la seule cellule ne fait apparaître qu'un unique cluster (en rouge également).

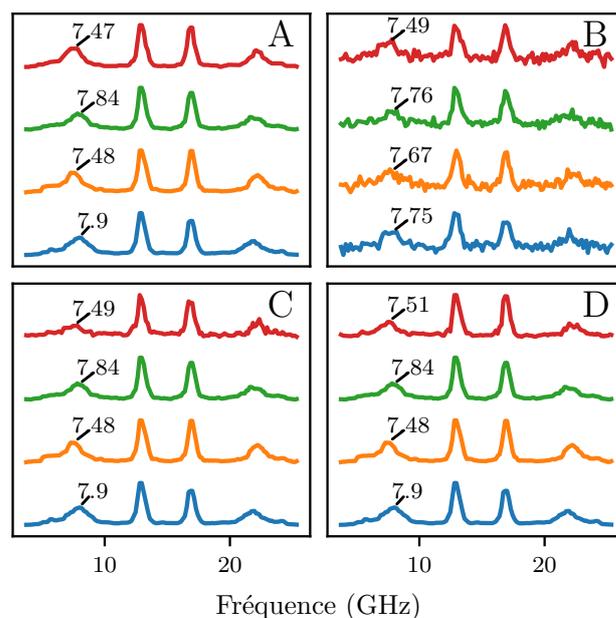


FIGURE 4 : Appréciation qualitative des spectres Brillouin sur la cellule de la Figure 3. En (A) l'image à haut rapport signal-bruit (RSB=14.41). En (B) l'image à bas RSB (RSB=7.72). En (C) notre méthode en ligne appliquée à toute l'image, et en (D) cette même méthode appliquée uniquement sur la cellule. Il est à noter que les quatre points correspondent à des pixels acquis à bas RSB et donc ont été reconstruits à partir des spectres essentiels situés sur l'enveloppe convexe dans l'espace des phaseurs selon l'Eq. (3).

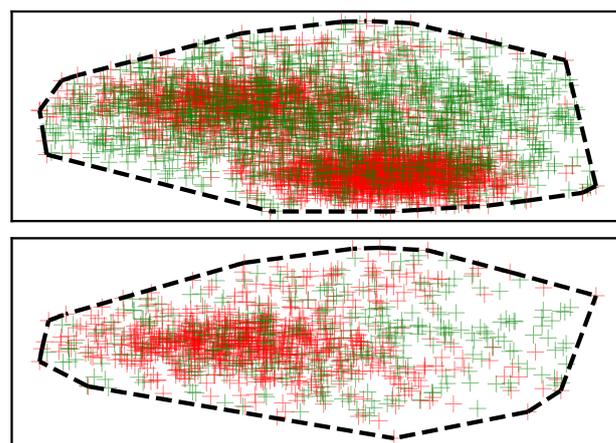


FIGURE 5 : Enveloppes convexes des phaseurs pour la troisième harmonique de Fourier dans le cadre du smart scan à 1 passe « complet » (haut) et le smart scan uniquement sur la cellule (bas). Les points rouges (resp. verts) correspondent aux points acquis à haut RSB (resp. bas RSB). En écartant le fond, on passe de 18 à 14 spectres principaux.