

COMPUTATIONAL PROCESSING FOR MULTIPHOTON MICROSCOPY

Lefort Claire^{1*}, Emilie Chouzenoux^{2,3}, Jean-Christophe Pesquet³

¹ CNRS, UMR 7252, Institut de Recherche XLIM,
Université de Limoges, France

² Centre de vision numérique, CentraleSupélec; INRIA, Saclay,
Université Paris Saclay, France

³ Laboratoire d'informatique Gaspard Monge, UMR CNRS 8049,
Université Paris-Est Marne-la-Vallée, France

Abstract: Multiphoton microscopy (MPM) is a tool highly involved in biological imaging. Its physical principle is associated to a reduced resolution compared to more standard systems: a micrometer in radial direction and few micrometers in axial direction. Here, we propose a computational approach in order to restore multiphoton images. The pipeline processing strategy is gathered into our algorithm FIGARO where microbeads are imaged and estimated. The strategy is based on a variational approach in order to generate a multivariate gaussian fitting procedure presenting a high level of robustness to noise and blur, indispensable in MPM.

Keywords: Multiphoton microscopy, computational processing, image restoration for life sciences imaging.

1. INTRODUCTION

La génération d'images requiert l'utilisation d'un instrument dans la plupart des situations : un télescope pour l'imagerie spatiale, un appareil photo pour la photographie, un microscope pour la microscopie. Cet intermédiaire introduit nécessairement des perturbations dans l'image qui peut se traduire par l'apparition de flou ou de bruit par exemple. La microscopie multiphotonique (MMP) est particulièrement affectée par ce problème [1-3]. En effet, elle nécessite l'utilisation d'un objectif de microscope, d'un système de scan 3D, d'un laser infrarouge qui doit passer à travers un milieu potentiellement diffusant et absorbant. Ces facteurs qui dépendent de la méthode affectent la qualité de l'image et la résolution. En microscopie, ce paramètre se caractérise par l'évaluation de la fonction d'étalement du point, aussi appelée PSF venant de l'anglais « Point-Spread Function ». Il s'agit ici d'imaginer un objet qui est de taille plus petite que la taille minimum que peut observer l'instrument. Ainsi, l'observation de ce « Dirac » se traduit par un point élargi. En microscopie optique, quelle que soit la solution choisie, l'effet de la PSF existe dans les 3 dimensions de l'image X, Y et Z. Cela est particulièrement vrai en MMP. En effet, l'utilisation d'un spectre d'excitation dans le proche infrarouge correspond à une limite de diffraction plus grande que par l'utilisation de méthodes plus standards telles que la microscopie de fluorescence plein champ ou bien confocale.

Dans la littérature, plusieurs solutions existent pour améliorer la résolution et réduire l'effet de la PSF. Ils sont basés sur des systèmes optiques sophistiqués consistant par exemple en la modulation du faisceau d'excitation. Ces méthodes de super résolution optique permettent d'atteindre des résolutions à l'échelle de plusieurs dizaines de nanomètres. Ces montages expérimentaux relèvent de l'optique particulièrement sophistiquée qui sont aussi très complexes et très chers. Les systèmes actuellement existant dans le monde sont donc peu accessibles à une utilisation commerciale pour des utilisateurs spécialistes des sciences de la vie. Dans ce contexte, une méthode

* Corresponding author, claire.lefort@xlim.fr

numérique pour la restauration computationnelle des images multiphotoniques et l'optimisation de la résolution est donc ici bien adaptée.

Le choix stratégique que nous avons fait pour cela peut se résumer dans les étapes suivantes. La première étape consiste à modéliser et fitter de façon optimale le profil de la PSF à partir de données expérimentales. En effet, la caractérisation parfaite de la PSF du système mis en jeu est essentielle de façon à visualiser parfaitement l'évolution du faisceau qui passe à travers l'instrument. Cela ouvre la possibilité d'une seconde étape consistant à enlever la contribution de l'instrument contenu dans l'image et enfin d'en retirer exclusivement la partie de l'image qui vient de l'échantillon. Dans la littérature, les modèles gaussiens sont considérés comme de bonnes approximations pour la modélisation de la PSF en microscopie optique [4-6]. Mais les méthodes actuelles de fitt Gaussien sont insatisfaisantes parce qu'elles sont limitées à une ou deux dimensions. De plus, elles nécessitent un bruit de fond égal à zéro ; or, la présence de bruit qui corrompt les données n'est quasiment jamais prise en compte. Nous proposons ainsi une approche mathématique ayant pour but le fitt Gaussien d'images de microbilles fluorescentes par une méthode de MMP. Notre stratégie mathématique est basée sur une approche variationnelle pour la modélisation de la PSF à partir d'un fitt Gaussien multivariable permettant le traitement direct de jeux de données tridimensionnelles présentant un fort niveau de bruit de fond, sans passer par une combinaison d'analyses 1D ou 2D. Cette méthode est donc un compromis entre précision et simplicité. Tout d'abord le problème de fitt des données est formulé. Une méthode alternative proximale d'optimisation est introduite, et donne l'algorithme appelé « FIGARO » pour Fitting Gaussian with Proximal Optimization. Le modèle gaussien de la PSF est ensuite utilisé pour chacune des microbilles afin de restaurer l'image 3D d'un volume dégradé. Nous illustrons ainsi la validité et la robustesse de cette méthode.

2. PRESENTATION DES STRATEGIES EXPERIMENTALE ET COMPUTATIONNELLE

2.1. Montage expérimental de microscopie multiphotonique

Le système multiphotonique mise en jeu dans ces expériences est standard et similaire à ceux employés dans les plates-formes de microscopie optique en sciences de la vie. Il s'agit ici du modèle BX61WI d'Olympus avec un microscope à immersion 25× via une ouverture numérique égale à 1,05 spécialement conçu pour la MMP. La source d'excitation est un laser titane saphir (Ti : Sa) délivrant des impulsions de 150 fs à 800 nm. Un module de scan, constitué de deux miroirs économétriques permet d'obtenir une image 2D. Couplé un mouvement vertical de l'objectif, des images 3D sont alors générées par une succession d'images 2D. Il s'agit ainsi de générer une succession de matrices 2D. Chacune des images 2D à une dimension de 2048× 2048 pixels. L'échantillon imagé est constitué de microbilles de latex sphériques recouvertes d'un fluorophore qui met de la fluorescence à 515 nm. Elle est détectée par un photomultiplicateur couplé avec un filtre optique sur une bande centrée sur 517 nm avec une largeur de spectre de 45 nm.

2.2. Éléments théoriques de la stratégie computationnelle

La stratégie computationnelle consiste à fitter par une forme Gaussienne l'intensité du signal détecté dans les images brutes des microbilles générées avec un niveau de bruit et de flou inhérent à la méthode. Ainsi, la représentation de l'intensité du signal contenu dans les données brutes est appelée y_n , n compris entre 1 et N et N correspondant au nombre total de points. L'expression de y_n est présentée à l'équation 1.

$$y_n = a + bp_n + w_n \quad (1)$$

Le terme « a » correspond au bruit de fond de l'image, « b » est un paramètre d'échelle, « w » représente le bruit d'acquisition. Le paramètre « p » correspond donc à une version débruitée des données brutes y_n . Ainsi, nous réalisons le fitt du paramètre « p » considéré comme proche de la fonction correspondant à la densité de probabilité appelée « g », comme présenté à l'équation 2, avec la matrice de covariance inverse C. Les coordonnées des points sont repérées par le paramètre x_n .

$$g(x_n, \mu, C) = \sqrt{\frac{|C|}{(2\pi)^3}} e^{\left(-\frac{1}{2}(x_n - \mu)^T C (x_n - \mu)\right)} \quad (2)$$

Ainsi, le point-clé de ces stratégies résulte dans le fitt des paramètres a, b, p, μ et C. Cette formulation correspond à un problème de minimisation non convexe utilisant un schéma proximal alternatif.

3. ILLUSTRATION DU PIPELINE POUR LA RESTAURATION D'IMAGES

Tout d'abord, nous enregistrons les images brutes tridimensionnelles dont nous réduisons le bruit. Ensuite, une étape de binarisation permet de rechercher automatiquement les emplacements où se trouvent les microbilles. La sélection des N plus grandes régions définit la position des volumes d'intérêt à l'intérieur desquels se trouve une microbille unique. Les coordonnées de ces volumes x_n sont alors obtenues. Elles sont ensuite découpées à l'intérieur de l'image brute. On se retrouve donc avec N images tridimensionnelles contenant N images de microbilles uniques. À l'intérieur de chacun de ces volumes d'intérêt, l'opération de *fitt* Gaussien est effectuée par l'application de l'algorithme FIGARO. Enfin, la reconstruction de l'image des microbilles est réalisée en considérant l'expression de $g(x_n, \mu, C)$. La figure 1 résume chacune des étapes clés de la restauration computationnelle des images de microbilles.

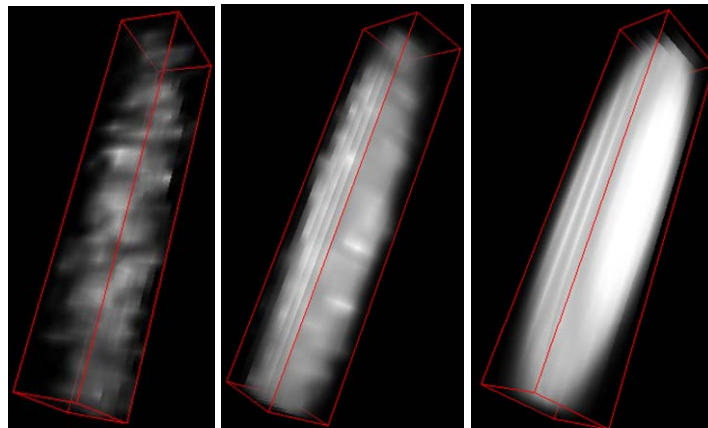


Fig 1. Gauche. Image tridimensionnelle d'une microbille sélectionnée. Centre. Image de la microbille après retranchements du bruit de l'image. Droite. Représentation tridimensionnelle de l'image de la microbille après reconstruction.

L'aspect ovoïdal des images présentées à la figure 1 résulte d'un phénomène attendu en microscopie optique. En effet, la résolution axiale est plus grande que la résolution planaire avec un facteur d'environ 2 entre ces deux directions.

3. CONCLUSION

Il s'agit ici d'apporter une solution aux problèmes inhérents à la qualité des images générées par la méthode de microscopie multiphotonique, limitée à cause de l'effet combiné d'une haute sensibilité au bruit et à une résolution détériorée. La solution computationnelle que nous avons choisie est basée sur un principe mathématique de *fitt* Gaussien de l'intensité générée par la fluorescence multiphotonique d'objets standardisés – ici des microbilles – dont la taille est très inférieure à la taille minimale des objets que peut imager le système. Par une approche variationnelle, nous réalisons un *fitt* multivariable Gaussien. La pertinence du résultat obtenu est illustrée par des images brutes dont nous avons tout d'abord retiré le bruit et reconstruit l'image de la microbille à partir du résultat du *fitt* Gaussien obtenu mathématiquement.

Ces travaux illustrent donc la pertinence de la stratégie computationnelle choisie pour reconstruire les images générées par microscopie multiphotonique. L'intérêt de ces travaux va aussi bien au-delà de la reconstruction seule. En effet, la connaissance de l'évolution de la fonction d'étalement du point dans les 3 dimensions, et notamment dans la profondeur, est une étape indispensable afin d'aller vers une stratégie de microscopie multiphotonique super-résolue numériquement. À partir de cette connaissance précise, il s'agira alors d'appliquer de nouveaux algorithmes aux images générées afin de retirer sélectivement la contribution de l'instrument qui introduit des dégradations alors quantifiées de l'image.

RÉFÉRENCES

- [1] Vo-Dinh T, Biomedical Photonics Handbook, Boca Raton, FL: CRC Press, 2003.
- [2] Pawel J, Handbook of Biological Confocal Microscopy, 3rd edn (Berlin: Springer) pp 1–985, 2006.
- [3] Lefort C, A review of biomedical multiphoton microscopy and its laser sources, Journal of Physics D : Applied Physics, 50, 423001, 2017.
- [5] M. Marim, B. Zhang, J. C. Olivo-Marin, and C. Zimmer, “Improving single particle localization with an empirically calibrated Gaussian kernel”, 5th IEEE Int. Symp. Biomed. Imag.: From Nano to Macro (ISBI 2008), Paris, France, 1003–1006 (2008)
- [6] X. Zhu, D. Zhang, “Efficient parallel Levenberg-Marquardt model fitting towards real-time automated parametric imaging microscopy”, PLOS ONE, 8, 1–9 (2013)
- [7] S. M. Anthony, S. Granick, “Image analysis with rapid and accurate two-dimensional Gaussian fitting”, Langmuir, 25, 8152–8160 (2009)