

Super-résolution sans-grille pour l'imagerie de fluctuation

Bastien LAVILLE¹, Laure BLANC-FÉRAUD¹, Gilles AUBERT²

¹Université Côte d'Azur, CNRS, Inria, I3S, projet Morpheme, France.

²Université Côte d'Azur, CNRS, LJAD, France.

bastien.laville@inria.fr, laure.blanc_feraud@i3s.unice.fr,
gilles.aubert@univ-cotedazur.fr

Résumé – La microscopie de fluorescence super-résolue est une technique d'imagerie permettant de s'affranchir du flou produit par la diffraction de la lumière, ce qui permet la reconstruction de détails fins des structures biologiques. Cependant, les méthodes classiques par molécule unique sont limitées par les longs temps d'acquisition, avec notamment une détérioration de l'échantillon qui rend difficile le suivi des cellules vivantes. Une nouvelle voie prometteuse est ouverte par l'exploitation des fluctuations de luminosité des fluorophores, permettant l'imagerie des cellules vivantes avec une bonne résolution spatio-temporelle à l'aide de microscopes courants et de colorants fluorescents conventionnels. Plusieurs algorithmes ont été développés dans la littérature à ce titre ; ces techniques sont formulées dans un cadre discret c'est-à-dire que l'image super-résolue repose sur une grille plus fine que les images acquises. À l'inverse, l'optimisation sans-grille n'utilise pas de grille fine et consiste plutôt en une optimisation de mesures de Dirac en nombre, amplitudes et positions. Dans cet article, nous proposons une formulation sans-grille exploitant l'hypothèse d'indépendance des fluctuations.

Abstract – Super-resolution fluorescence microscopy overcomes blurring arising from light diffraction, allowing the reconstruction of fine scale details in biological structures. Standard methods come at the expense of long acquisition time and/or harmful effects on the biological sample, which makes the problem quite challenging for the imaging of body cells. A promising new avenue lies in the exploitation of molecules fluctuations, allowing live-cell imaging with good spatio-temporal resolution through common microscopes and conventional fluorescent dyes. Several numerical algorithms have been developed in the literature and used for fluctuant time series. These techniques are developed within the discrete setting, namely the super-resolved image is defined on a finer grid than the observed images. On the contrary, off-the-grid optimisation does not rely on a fine grid and is rather an optimisation of Dirac measures in number, amplitudes and positions. In this work, we present a gridless problem accounting for the independence of fluctuations.

1 Introduction

Dans le cadre de la super-résolution en microscopie de fluorescence, on souhaite reconstruire des détails à partir d'acquisitions bruitées et limitées en résolution pour pouvoir mieux étudier les structures biologiques imagées : les corps observés sont généralement plus petits que la limite de Rayleigh à 200 nm, longueur à laquelle le phénomène de diffraction de la lumière entre en jeu. Cette diffraction provoque un flou de l'image, qui peut être modélisé comme une convolution de l'image par la *fonction d'étalement du point* (PSF) du microscope. Nous voudrions ainsi effectuer une *déconvolution*, c'est-à-dire éliminer le flou de la diffraction et obtenir une image super-résolue.

Afin d'améliorer la résolution spatiale par rapport aux techniques de microscopie standard, limitées par la diffraction, on dispose de plusieurs techniques de microscopie à fluorescence telles que STED [1], SIM [2] et SMLM [3]. Ces techniques nécessitent un matériel d'acquisition particulier, par exemple des fluorophores spécifiques et peuvent être nocives pour l'échantillon.

Au cours de la dernière décennie, plusieurs méthodes ont été proposées pour surmonter ces inconvénients : l'indépendance statistique des fluctuations temporelles d'amplitude des fluoro-

phores fixés sur les corps étudiés semble à ce titre être une nouvelle voie prometteuse. La méthode SOFI (*Super-Resolution Optical Fluctuation Imaging*) [4] exploite par exemple la pile des acquisitions temporelles en calculant sa statistique d'ordre élevé (n) qui contracte la PSF d'un facteur \sqrt{n} . Cette approche est également moins contraignante dans la mesure où elle peut être réalisée avec un système de microscope classique et des colorants fluorescents conventionnels. Malgré une amélioration de la résolution temporelle, sa résolution spatiale reste limitée, c'est également le cas pour la méthode *Super-Resolution Radial Fluctuations* (SRRF) [5] où les symétries radiales locales issues de la PSF sont calculées pour chaque image.

Ces techniques sont écrites dans une formulation matricielle, ce qui signifie que l'optimisation est effectuée sur une image super-résolue, c'est-à-dire définie sur une grille plus fine que les images observées. *A contrario*, cet article se propose de définir une méthode utilisant l'optimisation variationnelle sans-grille, qui repose sur une fonctionnelle convexe sur l'espace des mesures de Radon : [6, 7]. Elle permet une reconstruction parcimonieuse avec une grande précision à la fois sur la variance des amplitudes et les positions des molécules fluorescentes, ainsi que des résultats théoriques sur la reconstruction

des pics en régime de bruit [8].

Dans cet article, nous proposons la définition d'un problème variationnel sans-grille ($\mathcal{Q}_\lambda(\mathbf{y})$) défini sur l'espace des mesures qui exploite l'indépendance des fluctuations; nous présentons ensuite la super-résolution réalisée par notre méthode sur des données simulées et expérimentales. Adaptée à l'imagerie des cellules vivantes, aux microscopes courants et aux colorants conventionnels, cette méthode produit des résultats convaincants avec un seul paramètre à régler, et sans recourir à un ensemble de données d'apprentissage.

2 Formulation

Les quantités temporelles, opérateurs et mesures de Radon seront écrits en gras. La mesure de Radon $a\delta_x$ modélise un fluorophore et est appelé *le pic* d'amplitude/luminosité a à la position x .

2.1 Modèle sans-grille classique pour une image observée

Soit \mathcal{X} un compact de \mathbb{R}^2 , définissant l'espace de la position des pics (support de l'image). Les pics sont modélisés par des mesures de Diracs δ : on appelle $\mathbf{m}_{a_0, x_0} \stackrel{\text{def.}}{=} \sum_{i=1}^N a_{0,i} \delta_{x_{0,i}}$ la mesure source d'amplitude $a_0 \in \mathbb{R}_+^N$ et de positions $x_0 \in \mathcal{X}^N$. Le problème est de reconstruire cette mesure à partir de $y \in \mathcal{H}$ avec \mathcal{H} un espace de Hilbert (par exemple \mathbb{R}^P pour $P \in \mathbb{N}$ pixels), défini par $y \stackrel{\text{def.}}{=} \Phi \mathbf{m}_{a_0, x_0} + w$ où $w \in \mathcal{H}$ est un bruit blanc gaussien et $\Phi : \mathcal{M}(\mathcal{X}) \rightarrow \mathcal{H}$ est la PSF définie pour les mesures de Radon $\mathcal{M}(\mathcal{X})$ [8] :

$$\Phi \mathbf{m} = \int_{\mathcal{X}} \varphi(x) d\mathbf{m}(x). \quad (1)$$

où $\varphi : \mathcal{X} \rightarrow \mathcal{H}$, par exemple le noyau de l'approximation gaussienne :

$$\varphi(x) \stackrel{\text{def.}}{=} \left(s \mapsto h(s-x) \stackrel{\text{def.}}{=} \frac{1}{(\sigma\sqrt{2\pi})^2} e^{-(s-x)^2/\sigma^2} \right) \in \mathbb{R}^P$$

où σ est l'écart-type de la PSF h , suivi d'un sous-échantillonnage sur P pixels \mathcal{X}_i à savoir $\forall i \in \{1, \dots, P\} : [\varphi(x)]_i = \int_{\mathcal{X}_i} h(s-x) ds$. Pour reconstruire \mathbf{m}_{a_0, x_0} , nous utilisons la fonctionnelle convexe suivante [6, 9] appelé BLASSO¹ défini sur le Banach non réflexif de dimension infinie $\mathcal{M}(\mathcal{X})$:

$$\operatorname{argmin}_{\mathbf{m} \in \mathcal{M}(\mathcal{X})} \frac{1}{2} \|y - \Phi(\mathbf{m})\|_{\mathcal{H}}^2 + \lambda |\mathbf{m}|(\mathcal{X}) \quad (\mathcal{P}_\lambda(y))$$

avec le paramètre de régularisation $\lambda > 0$ qui contrôle la priorité donnée à la fidélité ou la parcimonie de la reconstruction. La quantité $|\mathbf{m}|(\mathcal{X})$ désigne la variation totale de la mesure \mathbf{m} , à ne pas confondre avec la variation totale en débruitage

d'images. C'est l'extension aux mesures de la norme ℓ_1 pour les vecteurs :

$$|\mathbf{m}|(\mathcal{X}) \stackrel{\text{def.}}{=} \sup \left(\int_{\mathcal{X}} f d\mathbf{m}, f \in \mathcal{C}(\mathcal{X}), \|f\|_{\infty, \mathcal{X}} \leq 1 \right).$$

2.2 Modèle sans-grille pour une pile d'images temporelles

L'approche sans-grille peut être étendue pour traiter le cas dynamique : soit $T > 0$ le temps d'acquisition. Supposons que nous ayons des images dans \mathbb{R}^P , acquises sur $[0, T]$: $\mathbf{y}_t \in \mathbb{R}^P$ est l'image acquise au temps $t \in [0, T]$ et \mathbf{y} est la pile de toutes les images acquises pour $\mathbf{y} \in L^2(0, T; \mathbb{R}^P)$ l'espace des applications temporelles (Böchner intégrable). Il s'agit ici de reconstruire la *mesure dynamique* $\boldsymbol{\mu} \in L^2(0, T; \mathcal{M}(\mathcal{X}))$, application (Böchner intégrable) temporelle à valeurs dans $\mathcal{M}(\mathcal{X})$, qui produit la pile \mathbf{y} pour $t \in [0, T]$ p.p. par $\mathbf{y}(t) = \Phi \boldsymbol{\mu}(t)$. Dans ce contexte, c'est une application s'écrivant :

$$t \mapsto \boldsymbol{\mu}(t) \stackrel{\text{def.}}{=} \sum_{i=1}^N a_i(t) \delta_{x_i}. \quad (2)$$

Il convient de noter que les positions de la mesure dynamique source $\boldsymbol{\mu}$ ne dépendent pas du temps, dans la mesure où l'échantillon (et donc les fluorophores) est supposé ne pas bouger au cours du temps d'acquisition d'une pile d'images (quelques secondes). Pour exploiter la pile \mathbf{y} et *a priori* sur l'indépendance statistique, nous souhaiterions utiliser une fonctionnelle sans-grille similaire à $(\mathcal{P}_\lambda(y))$.

2.3 Modèle sur la covariance

Les cumulants peuvent nous aider à trouver les positions x_i des molécules sources : soit $\bar{\mathbf{y}} \stackrel{\text{def.}}{=} \int_0^T \mathbf{y}_t dt$ la moyenne temporelle, soit $\mathbf{R}_y \in \mathbb{R}^{P^2}$ le cumulante d'ordre 2 (coïncide avec la définition de la covariance). Grâce à l'indépendance des fluctuations [4], pour $u, v \in \mathcal{X}$ p.p. :

$$\begin{aligned} \mathbf{R}_y(u, v) &\stackrel{\text{def.}}{=} \int_0^T (\mathbf{y}_t(u) - \bar{\mathbf{y}}(u)) (\mathbf{y}_t(v) - \bar{\mathbf{y}}(v)) dt \\ &= \sum_{1 \leq i, j}^N \left[\int_0^T a_i a_j - \int_0^T a_i \int_0^T a_j \right] \\ &\quad \times h(u - x_i) h(v - x_j) \\ &= \sum_{i=1}^N \left[\int_0^T a_i^2 - \left(\int_0^T a_i \right)^2 \right] h(u - x_i) h(v - x_i) \\ &= \sum_{i=1}^N \underbrace{M_i}_{\text{Variance de } a_i} h(u - x_i) h(v - x_i) \\ &= \int_{\mathcal{X}} h(u - s) h(v - s) d\mathbf{m}_{\mathbf{M}, \mathbf{x}}(s). \end{aligned}$$

On reconnaît l'action d'un opérateur sur une mesure stationnaire $\mathbf{m}_{\mathbf{M}, \mathbf{x}} \stackrel{\text{def.}}{=} \sum_{i=1}^N M_i \delta_{x_i}$. Ainsi, à partir d'une acquisition

1. pour Beurling-LASSO

spatio-temporelle \mathbf{y} , nous pouvons calculer sa covariance \mathbf{R}_y qui peut également être vue comme l'évaluation d'un opérateur sur une somme de mesures de Dirac.

Soit $\Lambda : \mathbf{m} \mapsto \mathbf{R}_y$ cet opérateur de covariance. Comme le noyau de Φ s'écrit $\varphi(x) = h(\cdot - x)$, nous pouvons définir de la même manière le noyau de Λ par $\phi(x) = h(\cdot - x)h(\cdot - x)$. Notre opérateur s'écrit alors pour $\mathbf{m} \in \mathcal{M}(\mathcal{X})$ et $u, v \in \mathcal{X}$ p.p. :

$$\Lambda(\mathbf{m})(u, v) \stackrel{\text{def.}}{=} \int_{\mathcal{X}} h(u - x)h(v - x) d\mathbf{m}(x). \quad (3)$$

Soit $\lambda > 0$ le paramètre de régularisation, la fonctionnelle proposée pour reconstruire à partir de la covariance s'écrit :

$$\operatorname{argmin}_{\mathbf{m} \in \mathcal{M}(\mathcal{X})} \frac{1}{2} \|\mathbf{R}_y - \Lambda(\mathbf{m})\|_{L^2(\mathcal{X}^2)}^2 + \lambda |\mathbf{m}|(\mathcal{X}). \quad (\mathcal{Q}_\lambda(\mathbf{y}))$$

Le problème $(\mathcal{Q}_\lambda(\mathbf{y}))$ est la limite de son équivalent discret Col_0 orme [10] pour la norme ℓ_1 sur une grille de plus en plus fine. La littérature [11] suggère que l'on peut reconstruire des pics proches d'au plus $\sigma/\sqrt{2}$ pour $(\mathcal{Q}_\lambda(\mathbf{y}))$; donc plus finement qu'avec le BLASSO sur la moyenne temporelle $\bar{\mathbf{y}}$ (au plus σ).

3 Résultats numériques

Le BLASSO $\mathcal{P}_\lambda(y)$ est un problème d'optimisation sur l'ensemble des mesures de Radon, un espace de Banach de dimension infinie. Bien que ce ne soit pas un espace de Hilbert, il existe plusieurs algorithmes [7, 12] tirant parti du formalisme sans-grille comme l'algorithme du gradient conditionnel également appelé Frank-Wolfe : appliqué au BLASSO ($\mathcal{P}_\lambda(y)$), il consiste en un ajout itératif de nouvelles masses de Dirac à la mesure reconstruite. L'algorithme a ainsi l'avantage de n'avoir besoin que du gradient de la fonction de coût, au contraire d'un algorithme proximal écrit en termes de distance euclidienne, qui n'a pas d'équivalent sur $\mathcal{M}(\mathcal{X})$.

Une version améliorée de l'algorithme de Frank-Wolfe appelée *Sliding Frank-Wolfe* (SFW) [12] est utilisée pour optimiser plus efficacement la fonction de coût. À chaque étape $k \in \mathbb{N}$, l'algorithme peut se décomposer en trois opérations :

1. à partir du résidu, évaluer $x_*^{[k]}$ la position du nouveau pic estimé à cette étape;
2. optimiser l'amplitude des pics reconstruits par LASSO, c'est-à-dire tous les pics reconstruits aux étapes précédentes ainsi que le nouveau pic en $x_*^{[k]}$;
3. optimiser conjointement l'amplitude et la position des pics estimés.

Le lecteur pourra se référer à la revue [13] pour plus de détails sur les aspects numériques en sans-grille. L'algorithme peut alors être appliqué au problème $(\mathcal{Q}_\lambda(\mathbf{y}))$ en remplaçant l'acquisition stationnaire y par \mathbf{R}_y , et l'opérateur Φ par Λ .

Pour générer des images simulées, il convient d'incorporer du bruit pertinent dans le cadre du modèle d'acquisition, ainsi pour $t \in [0, T]$ p.p. : $\mathbf{y}_t \stackrel{\text{def.}}{=} \mathcal{P}(\Phi \mu + \mathbf{b}) + \mathbf{w}(t)$ où \mathcal{P} est un

bruit de Poisson multiplicatif (n'est pas pris en compte dans le modèle de reconstruction), \mathbf{w} est un bruit blanc gaussien et \mathbf{b} est le bruit de fond.

3.1 Données simulées

Un 1^{er} test pour notre méthode est produit sur des images de filaments tirés du jeu d'entraînement MT0 du SMLM Challenge 2016². Nous conservons le support des filaments et simulons les fluctuations par le logiciel SOFITool [14]. On génère une pile de $T = 1000$ images de 64×64 (100 images par seconde) simulées par SOFITool, impliquant 8700 molécules recouvrant les filaments. La FWHM de la PSF est à 229 nm, la densité d'émetteurs est égale à 10.7 émetteurs/pixel/image, et les paramètres de fluctuations dans SOFITool sont choisis à 20 ms pour la durée de vie « On », 40 ms pour la durée de vie « Off » et 20 s de durée de vie avant la décoloration des fluorophores [10]. La pile comprend en moyenne 1000 photons/image par émetteur et 100 photons/image par pixel pour simuler les molécules défocalisées (considérées dans la modélisation comme du bruit de fond). Le bruit gaussien est simulé à 20 db; pour résumer SNR ≈ 10 db. Les résultats sont présentés en figure 1.

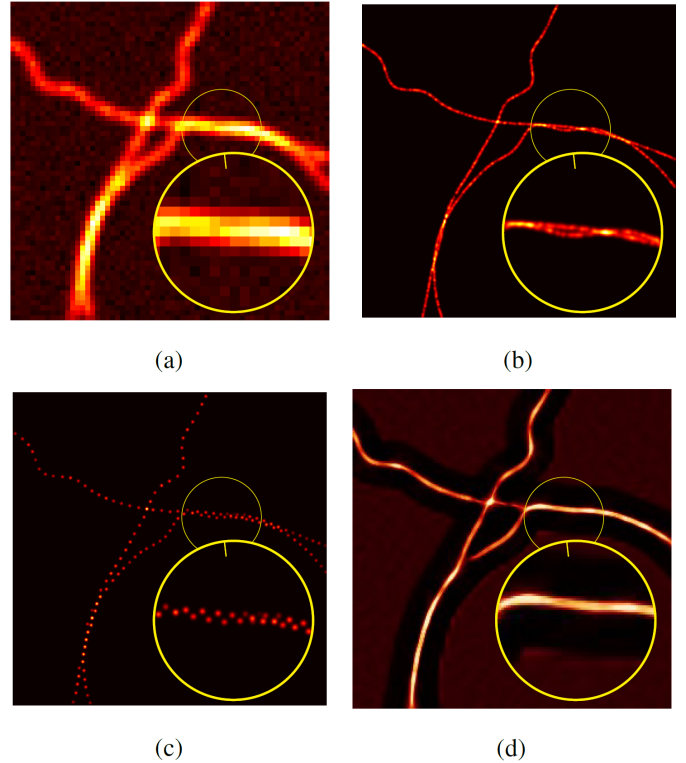


FIGURE 1 – Pile simulée : (a) 1^{er} extrait de la pile \mathbf{y} (b) vérité-terrain (c) reconstruction par $(\mathcal{Q}_\lambda(\mathbf{y}))$ (d) par SRRF [15].

Il convient de remarquer que contrairement à SRRF, notre méthode est capable de reconstruire des détails dans l'entre-

2. <https://srm.epfl.ch/Datasets>

croisement des filaments, et ce, malgré le niveau de bruit important. De plus, elle ne crée pas d'artéfacts, reproduit bien la structure de la vérité terrain et ne nécessite de choisir qu'un seul paramètre, à savoir le λ . Enfin, et à l'inverse des approches d'apprentissage profond, notre algorithme ne nécessite aucun jeu d'entraînement et peut être appliqué directement à n'importe quelle pile pour laquelle l'on connaît l'opérateur d'acquisition. La reconstruction sans-grille est pointillée, ce qui est dû à notre modèle des Diracs et des résultats théoriques et empiriques qui suggèrent que l'on ne puisse pas reconstruire de Diracs proches de moins que $\sigma/\sqrt{2}$ [8, 11]. L'algorithme réalise donc le compromis parcimonie/attache aux données, au détriment de la structure biologique à reconstruire.

3.2 Données expérimentales

Nous travaillons maintenant sur une pile d'images TIRF, composée de $T = 2500$ images floutées par une PSF de FWHM à 292 nm. Les résultats sont présentés en figure 2.

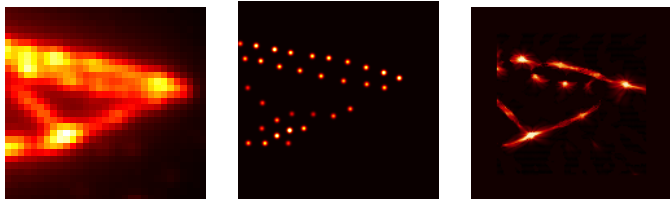


FIGURE 2 – Pile réelle : (à gauche) moyenne de la pile (au milieu) reconstruction par $(\mathcal{Q}_\lambda(y))$ (à droite) par SRRF [15].

La reconstruction semble « pointillée », notamment à cause de la FWHM plus grande, mais elle reconstruit correctement la structure des filaments. Il convient de noter qu'encore une fois les pics reconstruits sont éloignés d'environ $\sigma/\sqrt{2}$ pour $(\mathcal{Q}_\lambda(y))$; ici encore c'est une limite de notre modèle qui utilise les Diracs, il serait plus pertinent d'employer un modèle sur des courbes (sans équivalent sans-grille à ce jour).

4 Conclusion

Cet article s'est proposé de présenter une méthode de super-résolution exploitant l'approche variationnelle sans-grille et la microscopie de fluorescence stochastique, utilisable pour l'imagerie d'organismes vivants, et par des moyens conventionnels. Grâce à l'indépendance statistique des fluctuations d'amplitude et à la formulation sans-grille, la méthode peut localiser précisément les fluorophores en exploitant l'information dans la covariance : ainsi elle réussit à récupérer des détails fins, notamment sur l'entremêlement des filaments au sein des taches de flou. Dans de prochains travaux, nous essaierons de prendre en compte la structure des corps biologiques imagés afin de reconstruire des courbes plutôt qu'une approximation « en pointillés » des filaments.

5 Remerciements

Les travaux de BL ont été financés par l'État Français au titre du fonds UCA DS4H Investissement d'Avenir, piloté par l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR) avec la référence ANR-17-EURE-0004. Les travaux de LBF ont bénéficiés d'une aide de l'État Français au titre du fonds 3IA Côte d'Azur Investissement d'Avenir, piloté par l'ANR avec la référence ANR-19-P3IA-0002.

Références

- [1] S. W. HELL et J. WICHMANN, « Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission : stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy », *Optics Letters*, vol. 19, p. 780, juin 1994.
- [2] M. G. L. GUSTAFSSON, « Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. SHORT COMMUNICATION », *Journal of Microscopy*, vol. 198, p. 82–87, mai 2000.
- [3] D. SAGE, H. KIRSHNER, T. PENG, N. STURMAN, J. MIN, S. MANLEY et M. UNSER, « Quantitative evaluation of software packages for single-molecule localization microscopy », *Nature Methods*, vol. 12, p. 717–724, juin 2015.
- [4] T. DERTINGER, M. HEILEMANN, R. VOGEL, M. SAUER et S. WEISS, « Superresolution optical fluctuation imaging with organic dyes », *Angewandte Chemie*, vol. 122, p. 9631–9633, octobre 2010.
- [5] N. GUSTAFSSON, S. CULLEY, G. ASHDOWN, D. M. OWEN, P. M. PEREIRA et R. HENRIQUES, « Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations », *Nature Communications*, vol. 7, août 2016.
- [6] K. BREDIES et H. K. PIKKARAINEN, « Inverse problems in spaces of measures », *ESAIM : Control, Optimisation and Calculus of Variations*, vol. 19, p. 190–218, mars 2012.
- [7] E. J. CANDÈS et C. FERNANDEZ-GRANDA, « Towards a mathematical theory of super-resolution », *Communications on Pure and Applied Mathematics*, vol. 67, p. 906–956, avril 2013.
- [8] V. DUVAL et G. PEYRÉ, « Exact support recovery for sparse spikes deconvolution », *Foundations of Computational Mathematics*, vol. 15, p. 1315–1355, octobre 2014.
- [9] J.-M. AZAIS, Y. D. CASTRO et F. GAMBOA, « Spike detection from inaccurate samplings », *Applied and Computational Harmonic Analysis*, vol. 38, p. 177–195, mars 2015.
- [10] V. STERGIOPOULOU, J. H. de MORAIS GOULART, S. SCHAUB, L. CALATRONI et L. BLANC-FÉRAUD, « ColOrme : Covariance-based 10 super-resolution microscopy with intensity estimation », *2021 IEEE 18th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)*, avril 2021.
- [11] T. BENDORY, S. DEKEL et A. FEUER, « Robust recovery of stream of pulses using convex optimization », *Journal of Mathematical Analysis and Applications*, vol. 442, p. 511–536, octobre 2016.
- [12] Q. DENOYELLE, V. DUVAL, G. PEYRÉ et E. SOUBIES, « The sliding Frank-Wolfe algorithm and its application to super-resolution microscopy », *Inverse Problems*, vol. 36, p. 014001, décembre 2019.
- [13] B. LAVILLE, L. BLANC-FÉRAUD et G. AUBERT, « Off-The-Grid Variational Sparse Spike Recovery : Methods and Algorithms », *Journal of Imaging*, vol. 7, p. 266, déc. 2021.
- [14] A. GIRSAULT, T. LUKES, A. SHARIPOV, S. GEISSBUEHLER, M. LEUTENEGGER, W. VANDENBERG, P. DEDECKER, J. HOFKENS et T. LASSER, « SOFI simulation tool : A software package for simulating and testing super-resolution optical fluctuation imaging », *PLOS ONE*, vol. 11, p. e0161602, septembre 2016.
- [15] S. CULLEY, K. L. TOSHEVA, P. M. PEREIRA et R. HENRIQUES, « SRRF : Universal live-cell super-resolution microscopy », *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 101, p. 74–79, août 2018.