



## RESTAURATION D'IMAGES APPLIQUEE A LA MICROSCOPIE A RAYONS X

Jean-Baptiste SIBARITA\*  
Jean-Marc CHASSERY\*  
Michel ROBERT-NICOUD\*\*

\*Lab. INFODIS/TIMC et GDR TDSI-CNRS, \*\*Lab. DYOGEN  
Institut Albert Bonniot, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche Cedex

### RÉSUMÉ

*La microscopie à rayons X offre la possibilité d'obtenir des images à hautes résolutions spatiales d'échantillons biologiques situés directement dans leur environnement naturel. Or, si l'on veut bénéficier de la reproductibilité des mesures, de manière à suivre une dynamique par exemple, il est nécessaire de travailler avec de faibles temps d'exposition, ce qui engendre des images avec de très faibles rapports signal sur bruit. Le but de cet article est à partir d'images acquises après un faible temps d'exposition, de tendre vers la qualité, en termes de résolution et de niveau de bruit, d'images obtenues après un long temps d'exposition. Pour cela, on appliquera itérativement l'algorithme de restauration de Richardson-Lucy avec un modèle théorique de la réponse impulsionnelle suivi d'une phase de filtrage dans le domaine de Fourier. De manière à comparer les images entre elles, nous utiliserons des algorithmes d'estimation du bruit ainsi que les valeurs de rapports signal sur bruit de crête.*

### ABSTRACT

*X-ray microscopy allows to obtain images of thick biological specimens in their natural state with high spatial resolution. Nevertheless, if we want to keep the reproducibility of the measures, to follow a dynamic for example, we are constrained to work with low time exposure for the acquisition process. Such restriction leads to images with low signal to noise ratio. Here, we will present deblurring method to restore images obtained after low time exposure, in order to tend to the quality of the images obtained after long time exposure, in terms of resolution and noise level. To achieve this, we apply in an iterative schema the Richardson-Lucy restoration algorithm with a theoretical model of the point spread function combined with a filtering in the Fourier domain. In order to compare the results, we use noise estimators algorithms and peak signal to noise ratio values.*

### 1. INTRODUCTION

La microscopie à rayons X permet d'obtenir des images à hautes résolutions spatiales en comparaison avec la microscopie optique (de l'ordre de 30 nm contre 200 nm en optique). De plus, la microscopie à rayons X permet l'acquisition en 2D ou 3D d'échantillons biologiques dans leur environnement naturel, ce qui n'est pas possible en microscopie électronique. Enfin, les dommages créés par les radiations sur les échantillons sont bien inférieurs à ceux occasionnés par la microscopie électronique, ce qui rend les échantillons réexaminables à condition de les soumettre à de faibles durées d'exposition. En effet, aux énergies utilisées dans le cadre de la microscopie à rayons X, les changements de structures apparaissent dès la première seconde d'exposition<sup>[1]</sup>. Par conséquent, si l'on veut bénéficier de la reproductibilité des mesures, il faut travailler avec des temps d'exposition très courts et ceci s'effectue au détriment du rapport signal sur bruit (SNR) et de la résolution dans l'image acquise. De plus, dans le cas d'observation d'échantillons hydratés et vivants, les mouvements internes se produisant durant l'acquisition sont source de flou dans l'image.

Le but de cette étude est donc de travailler sur ces images à faible SNR et d'essayer d'en réduire le niveau de bruit tout en gardant la résolution. Pour cela, contrairement aux algorithmes classiques de suppression de bruit, on utilise l'information au niveau de la formation de l'image dans le

microscope, passant ainsi du domaine de l'amélioration au domaine de la restauration d'images.

### 2. LES DONNEES ET PARAMETRES DU PROBLEME

Pour cette étude, nous disposons de deux catégories d'images acquises sur le microscope à rayons X en transmission de Goettingen à BESSY<sup>[2]</sup>, à savoir des échantillons biologiques et des objets tests. Les échantillons biologiques sont des parties de chromosomes géants de larves de Chironomes Thumi, préparés en collaboration avec le laboratoire Dyogen. Les objets tests représentent des structures de tailles variables dont les plus petites font 24,6 nm. Pour chacune des deux catégories, nous disposons d'images obtenues après un temps d'exposition inférieur à une seconde (images à traiter), ainsi que d'images obtenues après un temps d'exposition plus long, que l'on supposera être nos images de référence. Le but est donc, à partir d'une image à faible SNR (images I1 et I3), de tendre vers la qualité (en termes de résolution et de niveau de bruit) de l'image du même objet obtenue après un long temps d'exposition (images I2 et I4). Toutes les images présentées ne sont que des sous-images extraites d'images originales de dimensions 1024\*1024 codées sur 16 bits et sont affichées pleine dynamique.

L'évaluation du niveau de bruit dans l'image sera effectuée à l'aide d'un algorithme d'identification du bruit basé sur les statistiques locales des régions homogènes<sup>[3]</sup>.



Enfin, de manière à pouvoir comparer les images entre elles, nous utiliserons les valeurs des rapports signal sur bruit de crête (PSNR), donnant une évaluation de l'écart entre une image  $i$  et une image  $r$  de référence, et dont la formule est

$$\text{PSNR}_{\text{dB}} = 10 \log_{10} \frac{65535^2}{E[(i-r)^2]} \quad (1)$$

Pour toutes ces opérations de comparaisons, les images ayant été acquises après un long temps d'exposition seront utilisées comme images de référence. Pour plus de rigueur, une phase préliminaire de spécification d'histogramme entre l'image traitée et l'image de référence sera appliquée.

### 3. THEORIE DE LA FORMATION DE L'IMAGE DANS LE MICROSCOPE

Jusqu'à présent, on ne disposait d'aucune mesure expérimentale de la réponse impulsionnelle (PSF) du microscope. Le modèle utilisé pour la restauration est donc purement théorique et repose sur l'analogie avec la microscopie optique. Les longueurs d'ondes utilisées dans le cadre de la microscopie à rayons X "mous" ( $0.3 \text{ nm} < \lambda < 5 \text{ nm}$ ) ne permettent pas au faisceau incident d'être focalisé par des lentilles conventionnelles utilisées en microscopie optique. Par conséquent, le dispositif optique utilisé pour faire converger les rayons X dans le plan focal est une lentille de Fresnel. C'est une lentille de diffraction constituée d'anneaux concentriques à alternance opaque et vide, et dont le rayon de chaque anneau suit la loi géométrique  $r_n = \sqrt{n\lambda f}$ . La microfabrication de ces lentilles est un problème très compliqué et est assuré par le laboratoire de physique des rayons X F.E. Röntgenphysic de l'université de Goettingen avec qui nous sommes en collaboration.

La résolution latérale  $r_{\perp}$  du microscope à rayons X est directement proportionnelle à la taille de l'anneau périphérique ( $dr_n$ ), et est donnée par la relation  $r_{\perp} = 1,22 dr_n$ . Les lentilles actuellement en fonction atteignent jusqu'à  $dr_n = 20 \text{ nm}$  et on espère descendre en dessous de  $10 \text{ nm}$  avec les nouvelles techniques de microfabrication en cours de développement.

A. G. Michette a démontré que la PSF de lentilles de Fresnel dont le nombre de zones est supérieur à 100 pouvait être approximée à celle d'une lentille circulaire utilisée en microscopie optique, avec les paramètres du microscope à rayons X<sup>[4]</sup>. Par conséquent, en discrétisant la formule analytique de la fonction de transfert optique (OTF) d'une lentille classique<sup>[5]</sup> (fig. a) à la fréquence  $\Delta\rho = 1/\Delta$  ( $N$  étant le nombre de points désirés et  $\Delta$  la taille du pixel de la caméra CCD) et en appliquant une Transformée de Fourier Discrète inverse sur le résultat, on obtient directement la PSF échantillonnée au pas de l'image à traiter (fig. b).

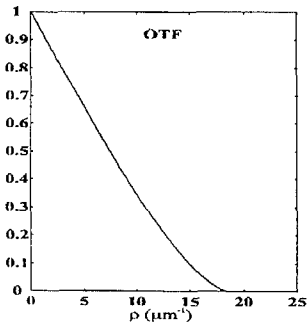


Fig. a : OTF du système

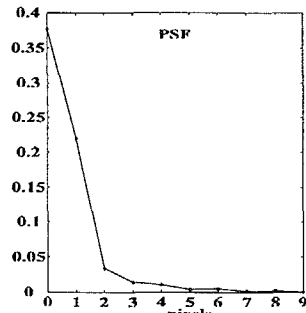


Fig. b: PSF du système échantillonnée dans le plan image

Pour la suite, on se placera dans l'approximation d'un système optique linéaire et invariant par translation, où la formation de l'image peut être régie par l'équation de convolution suivante

$$i = h \otimes o + n = a + n \quad (2)$$

$o$  étant l'objet à observer,  $i$  son image dans le microscope,  $h$  la PSF du système et  $n$  un bruit additif. On notera  $a$  comme étant l'image sans bruit de l'objet  $o$ .

### 4. RESTAURATION

La nature du bruit dominant dans nos images est de type photonique, et les bruits thermiques et électroniques ne jouent qu'un rôle négligeable dans notre cas et peuvent donc être négligés. Les fluctuations statistiques dans le nombre de photons atteignant le détecteur est gouverné par la distribution de Poisson. La probabilité qu'un nombre  $x$  de photons atteigne le détecteur pendant un intervalle de temps donné, est géré par la fonction de probabilité

$$p(x) = \frac{e^{-\lambda} \lambda^x}{x!} \quad (3)$$

où  $\lambda$  est appelé le paramètre de la distribution. La valeur moyenne  $\mu$  et la variance  $\sigma^2$  sont liées par la relation

$$\mu = \sigma^2 = \lambda$$

Une propriété de la distribution de Poisson est la suivante : si une intensité lumineuse  $I$  correspond à un nombre  $N$  de photons, alors l'écart type  $\sigma = \sqrt{N}$  est proportionnel à  $\sqrt{I}$ . Le bruit de Poisson est donc clairement dépendant du signal.

La nature du bruit présent dans nos images nous a guidés vers l'utilisation de l'algorithme de restauration de Richardson-Lucy. C'est un algorithme itératif issu de la minimisation de la probabilité de Poisson appliquée à une image. Une méthode pour détailler brièvement son origine consiste à appliquer l'équation (3) à un pixel de l'image ; on obtient ainsi la probabilité d'avoir un point de l'image  $i_m$  autour de sa valeur moyenne  $a_m$ , soit

$$p(i_m / a_m) = \frac{a_m^{i_m} e^{-a_m}}{i_m!} \quad (4)$$

Tous les points de l'image étant indépendants, la probabilité  $P$  associée à toute l'image est donnée comme le produit des probabilités de chaque pixel constituant l'image, d'où la relation

$$P(i / a) = \prod_m \frac{a_m^{i_m} e^{-a_m}}{i_m!} \quad (5)$$

Finalement, la maximisation de cette probabilité est obtenue en mettant à zéro la dérivée partielle par rapport à  $a_k$  de  $\log P(i / a)$  pour  $i$  fixé, donnant ainsi la relation

$$\sum_k (h_{m-k} \frac{i_k}{a_k}) = 1 \quad (6)$$

La relation finale de récurrence est obtenue directement en multipliant chaque membre de l'équation (6) par  $a_m$ , soit

$$o_m^{j+1} = K o_m^j \sum_k h_{m-k} \frac{i_k}{\sum_l h_{k-l} o_l^j} \quad (7)$$

où  $K$  est une constante de normalisation assurant la conservation de l'énergie. Cet algorithme est l'algorithme de Richardson-Lucy ; il donne la valeur du nouvel estimé  $o^{j+1}$  en fonction de l'estimé précédent  $o^j$ , de l'image  $i$  et de la PSF  $h$ . On notera que dans le cas de l'algorithme de Richardson-Lucy il est nécessaire d'avoir un contrôle sur le nombre d'itérations de manière à éviter tout phénomène de divergence.

Dans une première étape nous nous limiterons à un critère visuel, de manière à trouver un compromis entre le temps de calcul et la qualité du résultat, soit un nombre de 15 itérations. Un critère plus quantitatif sera donné dans le chapitre suivant.

Le résultat de la restauration sur l'image de l'objet test obtenue après un court temps d'exposition est représenté sur l'image I5. Il apparaît très nettement qu'une texture relativement régulière prédomine, altérant ainsi fortement la qualité de l'image restaurée. La phase suivante, consiste en la caractérisation et la suppression de cette texture dans le domaine de Fourier.

## 5. FILTRAGE DANS LE DOMAINE DE FOURIER

La caractérisation et la suppression de cette texture sont effectuées dans le domaine de Fourier. L'image I6 représente un spectre caractéristique du résultat de la restauration par l'algorithme de Richardson-Lucy sur les images acquises après un court temps d'exposition. Il apparaît très nettement un anneau centré sur la fréquence (0,0). La symétrie cylindrique du spectre permet de ramener notre étude à une dimension. La forme générale de l'anneau est déterminée en appliquant un lissage circulaire sur les spectres (image I7).

De manière à observer les faibles variations dans le domaine de Fourier, on a représenté les spectres en décibels, en utilisant la définition suivante

$$|I(u,v)|_{dB} = 20 \log_{10} \frac{|I(u,v)|}{|I(0,0)|} \quad (8)$$

La figure (c) représente les profils des spectres des images restaurées et filtrées.

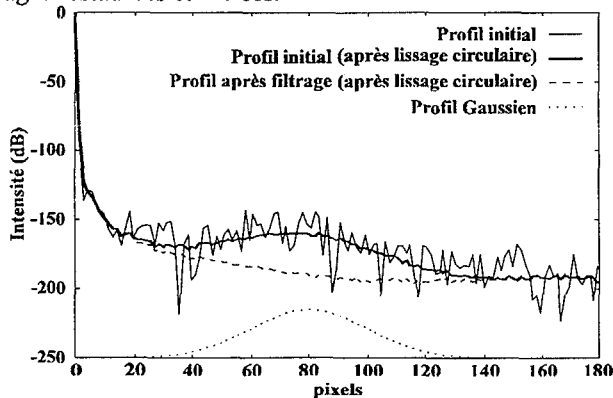


Fig. c : Profils des spectres.

La forme en cloche des profils des images restaurées nous a guidée vers l'utilisation d'un filtre coupe bande de profil Gaussien. L'image I8 représente le résultat d'un tel filtrage appliqué sur l'image restaurée I5. On observe clairement la suppression de la texture sans modification de l'information. De plus, on peut constater une baisse du niveau de bruit par rapport à l'image initiale.

A ce niveau du traitement, on observe qu'il est possible d'introduire un nouveau critère d'arrêt sur l'algorithme de Richardson-Lucy. En effet, dans notre cas particulier, il est nécessaire que l'anneau à l'origine de la texture se détache suffisamment des basses fréquences pour pouvoir appliquer notre étape de filtrage sans trop altérer la résolution de l'image. Cela nécessite donc un nombre suffisant d'itérations de manière à obtenir une texture la plus régulière possible avant la phase de filtrage.

L'idée finale est d'appliquer itérativement les processus de restauration + filtrage et d'observer la convergence des images ainsi que l'évolution du niveau de bruit au cours des

itérations. Les images I9 à I11 représentent le résultat des trois premières itérations sur l'image de l'objet test. L'image I12 montre le résultat de ce filtrage après la troisième itération sur l'image du chromosome. Les identificateurs des niveaux de bruit ainsi que les valeurs des rapports signal sur bruit de crête au cours des itérations sont affichés dans le tableau 1. Les changements de structures observés sur les images de chromosomes durant l'exposition (images I1 et I2) font qu'il n'y a pas lieu de suivre les valeurs des PSNR sur ce type d'images.

Itération	objet test		Echantillon biologique
	Niveau de bruit	PSNR	Niveau de bruit
0	2488,0	24,8	2086,1
1	1958,8	31,2	1776,6
2	1864,7	31,6	1462,0
3	1788,6	32,0	1371,1
Référence	1529,58	x	739,6

Tableau 1. Valeurs des Niveaux de bruit et des PSNR au court des itérations pour les images de l'objet test et du chromosome

Les images observées ainsi que les valeurs des niveaux de bruit et des PSNR au cours des itérations nous montrent clairement une convergence des images vers les images de références.

## 6. CONCLUSION

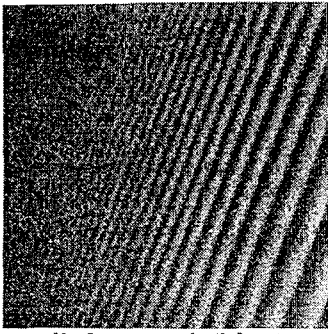
Un schéma itératif pour supprimer le bruit sans altérer la résolution de l'image a été proposé, et ceci en utilisant l'information au niveau de la formation de l'image dans le microscope. L'intérêt d'un tel schéma est d'éviter les longs temps d'expositions aux rayons X et par conséquent de réduire les dommages observés sur les échantillons biologiques durant l'acquisition.

## REMERCIEMENTS

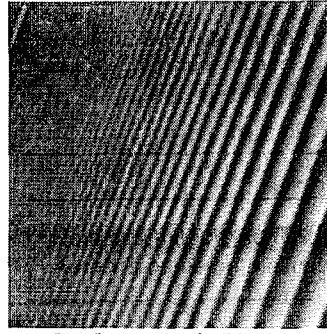
Les images ont été acquises sur le microscope à rayons X en transmission de Goettingen à BESSY. Nous remercions G. Schmahl, P. Guttman et J. Lehr pour leur collaboration et leur aide.

## REFERENCES

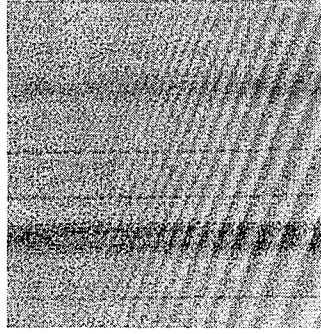
- [1] G. SCHNEIDER, X-ray microscopy IV, "Investigations of soft X-radiation induced structural changes in wet biological objects, (à paraître).
- [2] D. RUDOLPH, B. NIEMAN, G. SCHMAHL, O. CHRIST, X-ray microscopy, "The Göttingen X-ray microscope and X-ray microscopy experiments at the BESSY storage ring", pp. 192-202, Springer, Berlin, 1984.
- [3] K. CHEHDI, "Identification de la nature du bruit pour un filtrage optimal", Quatorzième colloque Gretsi, pp. 547, 1993.
- [4] A.G MICHETTE, Optical systems for soft X-rays, pp. 165, Plenum, New York, 1986.
- [5] J.W. GOODMAN, Introduction to Fourier Optics, pp. 113, Mc. Graw-Hill, San Fransisco, 1968.



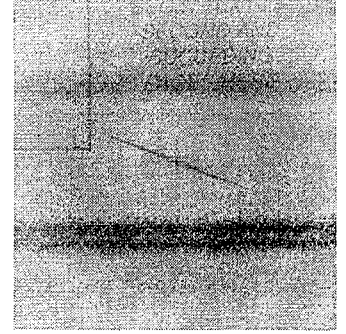
13 : Image initiale (0,5 sec)



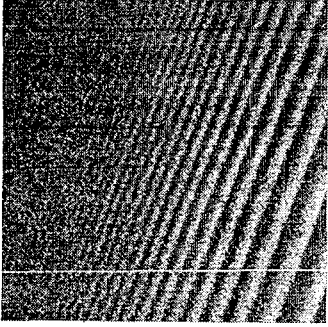
14 : Image initiale (20 sec.)



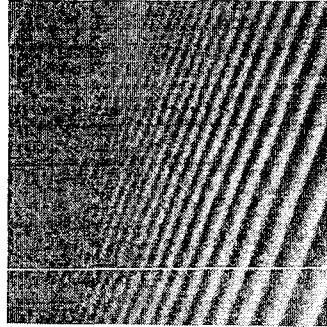
15 : Image restaurée



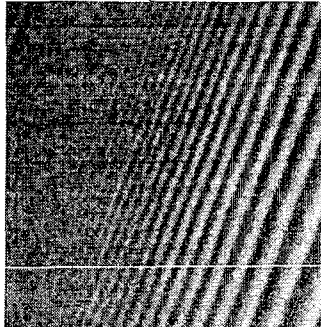
16 : Spectre de l'image 15



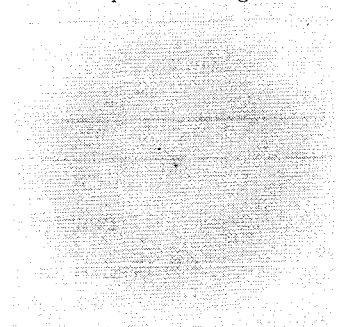
18 : Image filtrée 1ère itération



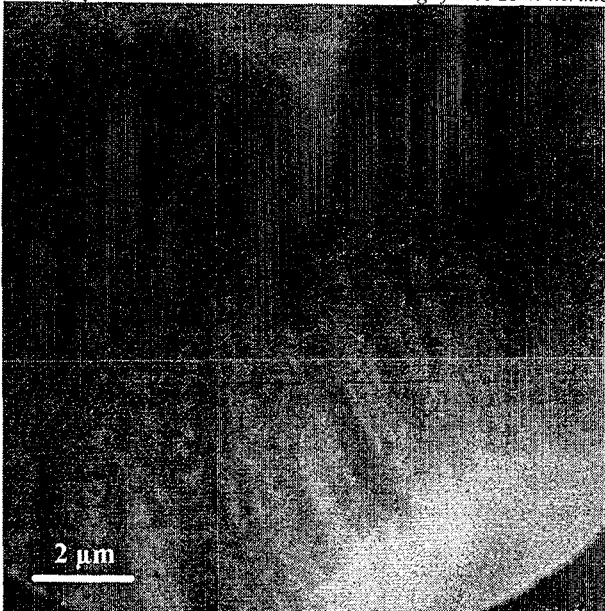
19 : Image filtrée 2ème itération



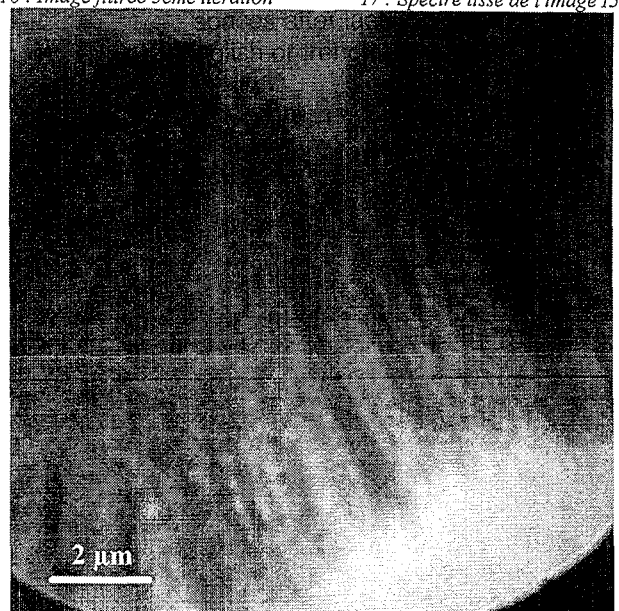
110 : Image filtrée 3ème itération



17 : Spectre lissé de l'image 15



11 : Image initiale. Durée d'exposition : 0,2 seconde.



12 : Image initiale. Durée d'exposition : 5 secondes.



111 : Image filtrée, 3ème itération.