

Méthodes d'inversion rapide pour RIM (Random Illumination Microscopy)

Guillaume GIROUSSENS¹ Marc ALLAIN¹ Anne SENTENAC¹ Jérôme IDIER² Simon LABOUESSE³
Thomas MANGEAT³

¹Aix Marseille Univ, CNRS, Centrale Marseille, Institut Fresnel, Marseille, France

²Nantes Université, École Centrale Nantes, LS2N, CNRS, Nantes, France

³LITC, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31062, Toulouse, France

Résumé – La microscopie par éclairements aléatoires (RIM) est une nouvelle technique d'imagerie super-résolue en microscopie de fluorescence associant des éclairements de type *speckles* et une méthode des moments d'ordre deux se présentant comme la résolution d'un problème inverse quadratique. Cependant, l'algorithme itératif existant présente une vitesse de convergence limitée. Dans cet article, nous montrons qu'une estimée non itérative, super-résolue et de qualité comparable peut être obtenue par une simple déconvolution de l'image d'écart-type. Il est ensuite possible d'améliorer cette estimation en utilisant une nouvelle stratégie itérative, avec une vitesse de convergence environ vingt fois supérieure à celle de l'algorithme existant.

Abstract – Random Illumination Microscopy (RIM) is a new super-resolved fluorescence imaging technique that combines speckle illuminations with a second-order moment matching method in which the sample is recovered through the resolution of a quadratic inverse problem. However, the existing iterative algorithm suffers from a limited convergence speed. Here, we show that a simple, noniterative, linear deconvolution of the empirical standard-deviation image yields a super-resolved reconstruction of the sample of a comparable quality. Moreover, the noniterative solution can be further improved thanks to a new accelerated iterative strategy, about a twenty times faster than the existing one.

1 Introduction

En microscopie de fluorescence, le modèle de l'image z enregistrée sur la caméra est :

$$z = h \otimes (\rho E) + \varepsilon \quad (1)$$

où \otimes désigne l'opérateur de convolution, ρ est l'échantillon observé, E est l'excitation, h est la réponse du système (PSF), et ε est une perturbation de la mesure. La PSF agit comme un filtre passe-bas limitant le contenu fréquentiel de la mesure : dans le cas où l'excitation est uniforme, les fréquences de l'objet que l'on peut identifier correspondent précisément aux fréquences contenues dans la bande passante de la PSF, notée \mathcal{D}_{PSF} . Il est cependant possible d'obtenir de l'information sur l'objet au-delà de ce domaine, par exemple en utilisant des excitations non-uniformes, technique à la base de la microscopie par éclairements structurés (SIM) [1]. On montre alors que les fréquences de l'objet peuvent être restaurées sur le domaine étendu¹

$$\mathcal{D}_{\text{SR}} := \mathcal{D}_{\text{PSF}} \ominus \mathcal{D}_{\text{PSF}} \quad (2)$$

par résolution d'un système linéaire. Néanmoins, la technique SIM nécessite un contrôle très précis des illuminations utilisées, ce qui représente une contrainte forte pour les mises en œuvres expérimentales. Pour y remédier, la technique RIM (Random Illumination Microscopy) proposée récemment [2] utilise plutôt des illuminations aléatoires de speckles. La variance des images, qui dépend de l'auto-corrélation des illuminations γ_E , est alors ajustée à la variance empirique, ce

¹Le symbole \ominus désigne la différence de Minkowski, (le support de la corrélation) entre deux ensembles : $A \ominus B := \{a - b \mid a \in A, b \in B\}$

qui s'apparente à un problème inverse quadratique dont la résolution produit une estimée super-résolue de l'objet.

Dans cet article, nous rappelons les principes-clés de RIM, puis l'algorithme d'inversion RIM-VAR proposé dans [2], et montrons ses limites. Nous proposons ensuite deux alternatives à cet algorithme :

- RIM-CF, une version non itérative basée sur une approximation par linéarisation du problème, qui fournit un estimateur par simple déconvolution.
- RIM-STD, une nouvelle version itérative travaillant sur l'écart-type au lieu de la variance, qui permet, avec l'utilisation d'un préconditionneur constant et circulant, de diviser par vingt le nombre d'itérations requises pour obtenir des résultats comparables à ceux de RIM-VAR.

2 Principe de la microscopie par éclairement aléatoire

2.1 Modèle continu

Considérons M réalisations de speckle $\{E_1, \dots, E_M\}$. Chaque image z_m s'obtient à l'aide du modèle (1) :

$$z_m(\mathbf{r}) = \int h(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \rho(\mathbf{r}') E_m(\mathbf{r}') d\mathbf{r}' + \varepsilon_m(\mathbf{r}).$$

Si E_m et ε_m sont des variables aléatoires indépendantes, la variance v_z des images est simplement la somme de la variance liée aux illuminations v_s et celle liée au bruit v_ε . La

contribution des illuminations peut s'écrire comme une double convolution sur des variables spatiales multi-dimensionnelles :

$$v_s(\mathbf{r}, \rho) = \iint t(\mathbf{r} - \mathbf{x}, \mathbf{r} - \mathbf{x}') \rho(\mathbf{x}) \rho(\mathbf{x}') d\mathbf{x} d\mathbf{x}' \quad (3)$$

avec t le noyau *symétrique* :

$$t : (\mathbf{x}, \mathbf{x}') \mapsto h(\mathbf{x}) \gamma_E(\mathbf{x} - \mathbf{x}') h(\mathbf{x}').$$

Il a été montré [3] que cette variance est sensible aux fréquences de l'objet dans un domaine contenant \mathcal{D}_{PSF} , et dans le cas de la microscopie en épifluorescence, pour laquelle $\mathcal{D}_{\text{PSF}} = \mathcal{D}_{\text{spec}}$, ce domaine correspond à \mathcal{D}_{SR} défini dans l'équation (2) [4].

Le calcul de la double convolution (3) est cependant numériquement non-trivial, et ne permet pas de calculer v_s en un temps raisonnable. Cependant, t étant symétrique, il admet la décomposition spectrale :

$$t(\mathbf{x}, \mathbf{x}') = \sum_{k \geq 1} \lambda_k \Psi_k(\mathbf{x}) \Psi_k(\mathbf{x}') = \sum_{k \geq 1} u_k(\mathbf{x}) u_k(\mathbf{x}')$$

où $\{\Psi_k\}_{k \geq 0}$ est une famille de fonctions orthonormées et $\{\lambda_k\}_{k \geq 0}$ est une suite décroissante de réels positifs, de limite nulle à l'infini. Cette décomposition peut être utilisée pour simplifier (3) qui prend la forme d'une somme incohérente de convolutions entre l'objet et les différents filtres² u_k

$$v(\mathbf{r}; \rho) = \sum_{k \geq 1} \left(\int u_k(\mathbf{r} - \mathbf{x}) \rho(\mathbf{x}) d\mathbf{x} \right)^2. \quad (4)$$

Par ailleurs, on constate empiriquement que les λ_k décroissent très rapidement. Ceci permet d'obtenir une très bonne approximation de la variance pour un coût réduit, par troncature de l'expression précédente à un ordre K réduit (typiquement inférieur à 10).

2.2 Variance matching : algorithme RIM-VAR

On suppose maintenant que le problème est discrétisé convenablement de sorte que le modèle (1) devienne :

$$\mathbf{z}_m = \mathbf{H}(\rho \odot \mathbf{E}_m) + \epsilon_m$$

où $\mathbf{H} = \mathbf{BCCB}(\mathbf{h})$ est une matrice de convolution (*Block Circulant with Circulant Blocks*) et \odot désigne le produit terme à terme de deux vecteurs. Dans ce cas, l'expression discrétisée de la variance dans l'équation (4) devient :

$$v(\rho) = \sum_{k=1}^K (\mathbf{U}_k \rho)^{\circ 2} \quad (5)$$

avec $\mathbf{U}_k = \mathbf{BCCB}(\mathbf{u}_k)$, ^{o2} désignant la mise au carré terme à terme. Les \mathbf{u}_k sont les vecteurs propres de la matrice définie non négative \mathbf{T} , discrétisant le noyau t :

$$\mathbf{T} = \text{Diag}(\mathbf{h}) \mathbf{BCCB}(\gamma_E) \text{Diag}(\mathbf{h}).$$

On peut vérifier que chaque coefficient du vecteur de variance s'exprime :

$$v_i = \rho^t \mathbf{T}_i \rho \quad (6)$$

$$\mathbf{T}_i = \mathbf{P}^i \mathbf{T} \mathbf{P}^{-i} \quad (7)$$

²Ces filtres sont définis uniquement par les conditions expérimentales, car t ne dépend que de h et γ_E .

où \mathbf{P}^i est une matrice de permutation circulaire. L'équation (6) décrit les mesures d'un *problème de phase* généralisé [5], avec N inconnues, et N mesures. Ceci est normalement insuffisant pour déterminer uniquement la solution, mais les contraintes de l'épifluorescence, (*i.e.*, objet réel et positif avec $h = \gamma_E$) garantissent une unique solution positive [4].

L'objectif de l'algorithme RIM-VAR est la minimisation des moindres carrés régularisés entre la variance empirique et la variance théorique :

$$\hat{\rho}_{\text{var}} = \arg \min_{\rho} J_{\text{var}}(\rho),$$

$$J_{\text{var}}(\rho) = \|\hat{v} - v(\rho)\|_2^2 + \mu \|\rho\|_2^2.$$

Le calcul de $\hat{\rho}_{\text{var}}$ se fait alors de façon itérative par gradient conjugué non linéaire. RIM-VAR a permis de produire de multiples images super-résolues [6, 7]. Nous avons cependant constaté que cet algorithme souffrait d'une lenteur de convergence, le nombre d'itérations nécessaire pour faire converger les composantes hautes fréquences de la reconstruction étant trop élevé pour atteindre pleinement la capacité de super-résolution de RIM. Ce problème de convergence, facilement reproductible en simulation (voir Fig. 1), devient en enjeu majeur lorsque la taille des données est importante (*i.e.*, imagerie 3D, grand champs de vue, imagerie au cours du temps). Dans la section suivante, nous proposons deux nouvelles méthodes permettant des accélérations significatives par rapport à RIM-VAR.

3 Améliorations proposées

3.1 RIM-CF, une linéarisation du problème

Considérons l'expression de la variance (5) dans le cas de la troncature extrême $K = 1$. On peut considérer cette troncature car $\|\mathbf{u}_1\|^2 / \|t\|^2 \approx 0.9$, c'est-à-dire que le premier vecteur propre contient près de 90% de l'énergie de t . On a alors :

$$v(\rho) \approx (\mathbf{U}_1 \rho)^{\circ 2}$$

avec $\mathbf{U}_1 = \mathbf{BCCB}(\mathbf{u}_1)$. De plus, dans le cas de la microscopie en épifluorescence, la matrice \mathbf{T} étant positive, un théorème de type Perron-Frobenius permet d'établir que \mathbf{u}_1 est lui-même positif, *i.e.*, \mathbf{U}_1 est à coefficients positifs. Par ailleurs, ρ est également positif, donc le produit $\mathbf{U}_1 \rho$ est aussi positif. On peut donc prendre terme à terme la racine carrée de l'expression précédente pour obtenir l'approximation de rang 1 suivante :

$$\sigma(\rho) \approx \mathbf{U}_1 \rho. \quad (8)$$

De façon approchée, l'écart-type dépend donc linéairement de l'objet, sous la PSF \mathbf{u}_1 au lieu de h . En particulier, un algorithme des moindres carrés préconditionné par la matrice $(\mathbf{U}_1^t \mathbf{U}_1 + \mu \mathbf{I}_n)$ converge en une seule itération vers le minimum. La résolution de ce problème correspond en réalité à la déconvolution de Tikhonov [8], dont la solution est :

$$\hat{\rho}_{\text{CF}} = (\mathbf{U}_1^t \mathbf{U}_1 + \mu \mathbf{I}_n)^{-1} \mathbf{U}_1^t \hat{\sigma}. \quad (9)$$

\mathbf{U}_1 étant une matrice de convolution, on peut calculer $\hat{\rho}_{\text{CF}}$ par (la division ci-dessous se fait terme à terme)

$$\hat{\rho}_{\text{CF}} = \mathcal{F}^{-1} \left(\frac{\overline{\mathcal{F}(\mathbf{u}_1)} \odot \mathcal{F}(\hat{\sigma})}{|\mathcal{F}(\mathbf{u}_1)|^2 + \mu} \right) \quad (10)$$

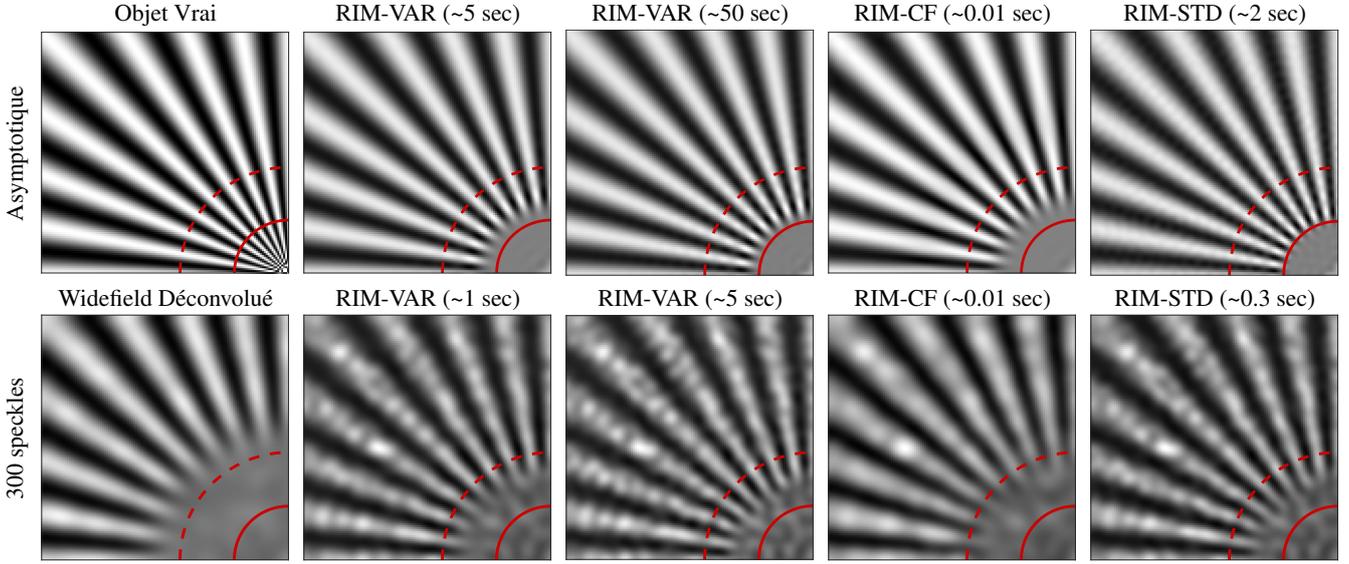


FIGURE 1 : Mise en œuvre des différents algorithmes de reconstruction présentés sur un objet 2D de taille 256×256 pixels. La ligne rouge pointillée représente la limite de résolution en imagerie conventionnelle, et la ligne continue, la limite théorique pour RIM. Dans le cas d'un nombre limité de speckles, les informations hautes fréquences étant noyées dans le bruit, moins d'itérations sont requises pour atteindre la convergence.

avec \mathcal{F} et \mathcal{F}^{-1} les opérateurs de Fourier direct et inverse, et \bar{x} la conjugaison complexe.

De plus, il est possible de montrer qu'en épifluorescence, le support spectral de \mathbf{u}_1 est également le domaine \mathcal{D}_{SR} . Ainsi, les seuls éléments empêchant d'atteindre la limite de super-résolution théorique (voir Fig. 1), sont d'une part les imprécisions expérimentales (*i.e.*, bruit, incertitudes sur la PSF, etc.), et d'autre part l'erreur de modèle induite par la forte troncature.

3.2 Passage à un critère sur les écart-types

En présence de conditions expérimentales favorables, il est intéressant de limiter l'erreur de troncature associée à RIM-CF. Nous proposons alors une approche basée sur l'ajustement des écarts-type empirique et théorique, *via* la minimisation du critère des moindres carrés

$$J_{\text{std}}(\boldsymbol{\rho}) = \|\hat{\boldsymbol{\sigma}} - \boldsymbol{\sigma}(\boldsymbol{\rho})\|_2^2 + \mu \|\boldsymbol{\rho}\|_2^2.$$

Ce choix est en partie motivé par le fait que le critère J_{var} possède une dépendance d'ordre 4 relative à l'objet, tandis que J_{std} est presque quadratique³. Par ailleurs, RIM étant un problème de phase généralisé, l'utilisation d'un critère des moindres carrés s'avère être une extension de l'algorithme de Wirtinger-Flow [9] à ce type de problème. Choisir un critère basé sur les écart-types est alors équivalent à choisir un critère basé sur les amplitudes plutôt que sur les intensités. En reconstruction de phase classique, d'après [10], un tel choix présente de meilleures propriétés de convergence.

De manière intéressante, le critère J_{std} , peut se minimiser à l'aide d'un schéma par approximation majorante. En se rappelant que $\sigma_i(\boldsymbol{\rho}) = \sqrt{\boldsymbol{\rho}^t \mathbf{T}_i \boldsymbol{\rho}}$, chaque résidu de J_{std} s'écrit sous la forme :

$$j_i(\boldsymbol{\rho}) = (\hat{\sigma}_i - \sigma_i(\boldsymbol{\rho}))^2 = \boldsymbol{\rho}^t \mathbf{T}_i \boldsymbol{\rho} + \hat{v}_i - 2\hat{\sigma}_i \sqrt{\boldsymbol{\rho}^t \mathbf{T}_i \boldsymbol{\rho}}$$

³C'est la racine d'un ordre 4, qui est donc réellement quadratique uniquement dans le cas de la troncature de rang 1.

qui peut être majoré en tout point $\boldsymbol{\rho}_0$ par concavité de $-\sqrt{\cdot}$:

$$j_i(\boldsymbol{\rho}) \leq \boldsymbol{\rho}^t \mathbf{T}_i \boldsymbol{\rho} + \hat{v}_i - 2\hat{\sigma}_i \left(\sigma_i(\boldsymbol{\rho}_0) + \frac{(\boldsymbol{\rho} - \boldsymbol{\rho}_0)^t \mathbf{T}_i \boldsymbol{\rho}_0}{\sigma_i(\boldsymbol{\rho}_0)} \right).$$

En sommant sur les différents critères, et en ajoutant le terme de pénalisation, on arrive à :

$$J_{\text{std}}(\boldsymbol{\rho}) \leq Q(\boldsymbol{\rho}; \boldsymbol{\rho}_0) \equiv \boldsymbol{\rho}^t \mathbf{S} \boldsymbol{\rho} - 2(\boldsymbol{\rho} - \boldsymbol{\rho}_0)^t \mathbf{w} + C \quad (11)$$

où C est une constante indépendante de $\boldsymbol{\rho}$, et avec

$$\mathbf{w} = \sum_i \frac{\hat{\sigma}_i \mathbf{T}_i}{\sigma_i(\boldsymbol{\rho}_0)} \boldsymbol{\rho}_0 \quad \text{et} \quad \mathbf{S} = \mu \mathbf{I}_n + \sum_{i=1}^n \mathbf{T}_i. \quad (12)$$

L'approximation majorante étant quadratique, on peut en déduire le schéma de mise à jour suivant :

$$\boldsymbol{\rho}_{k+1} = \arg \min_{\boldsymbol{\rho}} Q(\boldsymbol{\rho}; \boldsymbol{\rho}_k) = \boldsymbol{\rho}_k - \frac{1}{2} \mathbf{S}^g \mathbf{g}_k, \quad (13)$$

où \mathbf{g}_k est le gradient de J_{std} au point $\boldsymbol{\rho}_k$, et \mathbf{S}^g correspond à l'inverse généralisé de \mathbf{S} . Sous la forme (12), le calcul de la matrice \mathbf{S} , ainsi que de son inverse \mathbf{S}^g , requiert le calcul des matrices \mathbf{T}_i , que l'on souhaite éviter afin de garder une faible complexité algorithmique. Si l'on approche les matrices \mathbf{T}_i par des matrices de rang K , \mathbf{S} apparaît comme la généralisation du préconditionneur utilisé pour le problème de rang 1 (9) :

$$\mathbf{S} = \mu \mathbf{I}_n + \sum_{k=1}^K \mathbf{U}_k^t \mathbf{U}_k$$

On constate alors que \mathbf{S} est une matrice circulante, ce qui permet d'effectuer les produits par \mathbf{S} et \mathbf{S}^g par transformées de Fourier rapide.

Ce schéma de mise à jour est l'équivalent de l'algorithme PRIME [11] obtenu en reconstruction de phase. Il correspond aussi à un algorithme de gradient préconditionné par la matrice \mathbf{S} , avec un pas constant. Cependant, nos tests ont montré que ce pas était parfois très sous-optimal, d'où l'idée de combiner

le préconditionneur avec une recherche de pas. Le schéma itératif RIM-STD retenu pour minimiser J_{std} est finalement un algorithme de gradient conjugué non linéaire préconditionné :

$$\rho_{k+1} = \rho_k + \alpha_k \mathbf{d}_k \quad (14)$$

où \mathbf{d}_k est la direction de descente donnée par :

$$\mathbf{d}_k = \begin{cases} -\mathbf{S}^{-1} \mathbf{g}_k & \text{si } k = 0, \\ -\mathbf{S}^{-1} \mathbf{g}_k + \beta_k \mathbf{d}_{k-1} & \text{sinon} \end{cases} \quad (15)$$

et α_k , le pas dans cette direction, est calculé de façon à vérifier les conditions d'Armijo. Finalement, nous avons opté pour un coefficient de conjugaison β_k donné par la formule de Polak-Ribière.

On choisit généralement pour initialisation $\rho_0 = \hat{\rho}_{\text{CF}}$, mais des initialisations uniformes ou aléatoires donnent sensiblement les mêmes résultats. Au final, cette approche permet de gagner entre un et deux ordre de grandeurs en terme de nombre d'itérations par rapport à RIM-VAR (voir Fig. 1).

4 Validation sur données réelles 3D

L'intérêt majeur de ces deux améliorations est de rendre possible le traitement global de données 3D en un temps raisonnable. Afin de valider nos méthodes, nous proposons de les tester sur un échantillon test composé de billes fluorescentes au dessus d'un plan fluorescent. En théorie, les problèmes de sectionnement optique rendent impossible l'observation du plan, et détruisent le contraste de l'image. A l'inverse, les études des capacités de super-résolution de RIM [3] suggèrent qu'en plus de produire de la super-résolution, RIM est capable de produire du sectionnement optique, ce qui devrait permettre de localiser le plan, et restaurer le contraste de l'image. Ces prédictions théoriques, sont effectivement observées la pratique (voir Fig 2).

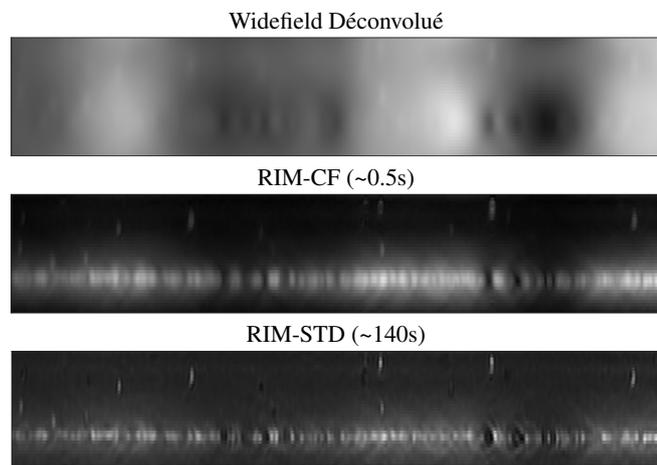


FIGURE 2 : Coupe XZ d'un échantillon 3D ($1024 \times 1024 \times 30$) représentant des billes fluorescentes au-dessus d'un plan lui-aussi fluorescent.

5 Conclusion

La technique RIM permet de produire de la super-résolution en résolvant un problème inverse quadratique basé sur la statistique d'ordre deux des images. Cependant, ce problème

présente un très mauvais conditionnement, ce qui augmente fortement le nombre d'itérations requises avant convergence. En travaillant sur les écart-types plutôt que sur les variances, il est possible d'améliorer la vitesse de convergence de deux manières. D'une part, en linéarisant le problème, il est possible d'obtenir des reconstructions quasiment instantanément. D'autre part, en utilisant un préconditionneur adapté au sein une stratégie itérative, la convergence obtenue est beaucoup plus rapide que celle de l'algorithme RIM-VAR existant. Ces deux propositions permettent notamment de rendre RIM compatible avec des applications traitant de gros volumes de données, comme l'imagerie 3D.

Références

- [1] M. G. L. Gustafsson, D. A. Agard et J. W. Sedat, « Doubling the lateral resolution of wide-field fluorescence microscopy using structured illumination », *Proc. SPIE*, vol. 3919, pp. 141–150, 2000.
- [2] T. Mangeat, S. Labouesse, M. Allain, R. Poincloux, A. Bouissou, S. Cantaloube, E. Courtais, E. Vega, T. Li, A. Grégoire, C. Rouvière, S. Allard, N. Campo, M. Suzanne, X. Wang, G. Michaux, M. Pinot, R. Le Borgne, S. Tournier, J. Idier et A. Sentenac, « Super-resolved live-cell imaging using random illumination microscopy », *Cell Rep. Meth.*, vol. 1, n° 1, pp. 100009, 2021.
- [3] J. Idier, S. Labouesse, M. Allain, P. Liu, S. Bourguignon et A. Sentenac, « On the superresolution capacity of imagers using unknown speckle illuminations », *IEEE Trans. Comput. Imaging*, vol. 4, n° 1, pp. 87–98, 2018.
- [4] S. Labouesse, J. Idier, A. Sentenac, T. Mangeat et M. Allain, « Random illumination microscopy from variance images », in *28th EUSIPCO*, 2021, pp. 785–789.
- [5] Y. Wang et Z. Xu, « Generalized phase retrieval : Measurement number, matrix recovery and beyond », *Appl. Comput. Harmon. Anal.*, vol. 47, n° 2, pp. 423–446, 2019.
- [6] M. Portes et al., « Nanoscale architecture and coordination of actin cores within the sealing zone of human osteoclasts », *eLife*, vol. 11, pp. e75610, juin 2022.
- [7] N. Schweizer et al., « Sub-centrosomal mapping identifies augmin- γ turc as part of a centriole-stabilizing scaffold », *Nat. Commun.*, vol. 12, 2021.
- [8] A. N. Tikhonov, A. V. Goncharsky, V. V. Stepanov et A. G. Yagola, *Numerical Methods for the Solution of Ill-Posed Problems*, 1977.
- [9] E. J. Candès, X. Li et M. Soltanolkotabi, « Phase retrieval via Wirtinger flow : Theory and algorithms », *IEEE Trans. Inf. Theory*, vol. 61, n° 4, pp. 1985–2007, 2015.
- [10] H. Zhang, Y. Zhou, Y. Liang et Y. Chi, « A nonconvex approach for phase retrieval : Reshaped Wirtinger flow and incremental algorithms », *J. Mach. Learn. Res.*, vol. 18, n° 1, pp. 5164–5198, jan. 2017.
- [11] T. Qiu, P. Babu et D. P. Palomar, « PRIME : Phase retrieval via majorization-minimization », *IEEE Trans. Signal Process.*, vol. 64, n° 19, pp. 5174–5186, oct. 2016.