



**HAL**  
open science

# Vers une reconstruction super-résolue et sectionnée optiquement pour l'imagerie rétinienne par illumination structurée

Yann Lai-Tim, Laurent Mugnier, François Orioux, Roberto Baena-Gallé,  
Michel Paques, Serge Meimon

## ► To cite this version:

Yann Lai-Tim, Laurent Mugnier, François Orioux, Roberto Baena-Gallé, Michel Paques, et al.. Vers une reconstruction super-résolue et sectionnée optiquement pour l'imagerie rétinienne par illumination structurée. GRETSI 2019 - XXVIIème Colloque francophone de traitement du signal et des images, Aug 2019, LILLE, France. hal-02409638

**HAL Id: hal-02409638**

**<https://hal.science/hal-02409638>**

Submitted on 13 Dec 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Vers une reconstruction super-résolue et sectionnée optiquement pour l'imagerie rétinienne par illumination structurée

Y. LAI-TIM<sup>1,2</sup>, L. MUGNIER<sup>1</sup>, F. ORIEUX<sup>3</sup>, R. BAENA-GALLÉ<sup>4</sup>, M. PAQUES<sup>2</sup>, S. MEIMON<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DOTA, ONERA, The French Aerospace Lab,  
29 Avenue de la Division Leclerc, 92320 Châtillon, France

<sup>2</sup>CIC 1423, INSERM, Quinze-Vingts Hospital,  
28, rue de Charenton 75012 Paris, France

<sup>3</sup>Laboratoire des Signaux et Systèmes, Univ. Paris-Sud,  
3 rue Joliot-Curie, 91192 Gif-sur-Yvette, France

<sup>4</sup>Instituto de Astrofísica de Canarias et Departamento de Astrofísica, Universidad de La Laguna,  
c Vía Láctea s/n, 38205, La Laguna, Tenerife, Espagne  
yann.lai-tim@onera.fr, laurent.mugnier@onera.fr

**Résumé** – La microscopie par illumination structurée (SIM en anglais) est une technique d'imagerie utilisée en microscopie plein champ qui permet d'obtenir super-résolution (SR) et sectionnement optique (SO) grâce à des algorithmes de reconstruction dédiés. Dans cette communication, nous nous intéressons à l'application de la SIM à l'imagerie rétinienne *in-vivo* qui offre de nouvelles possibilités pour l'étude des structures et fonctions rétiniennes. Les méthodes de reconstruction SIM couramment utilisées en microscopie supposent un objet statique et donc ne conviennent pas au cas de l'imagerie rétinienne *in-vivo* à cause des mouvements oculaires. Les quelques approches proposées pour l'imagerie rétinienne ne permettent de réaliser que de la SR.

Nous proposons une méthode de reconstruction adaptée à l'imagerie rétinienne qui réalise SR et SO conjointement. Elle repose sur un modèle physique multi-couches de la formation d'images, qui prend en compte les mouvements de l'objet. L'idée originale de notre approche est de reconstruire un objet bi-couche comprenant la section optique super-résolue de l'objet et une tranche où sont rejetées toutes les contributions défocalisées de l'objet. Nous validons la méthode proposée par simulations et sur des données expérimentales de microscopie.

**Abstract** – Structured Illumination Microscopy (SIM) is an imaging technique for achieving both super-resolution (SR) and optical sectioning (OS) in wide-field microscopy using dedicated reconstruction algorithms. In this communication we focus on the very promising application of SIM to *in vivo* retinal imaging, which could benefit the study of the retinal 3D structure and function in the living eye. The SIM approaches commonly used in microscopy require a static object and are thus not suitable for *in vivo* retinal imaging due to uncontrolled eye movements. The few approaches developed with retinal imaging in mind only achieve SR.

We propose a reconstruction method approach, tailored for retinal imaging, which achieves SR and OS jointly. It is based on a multi-layer model of the image formation process which takes into account the object shifts. The main idea of our method is to reconstruct a 2-layer object composed of the super-resolved optical section of the object and a layer into which the object's defocused contribution are rejected. Our proposed approach is validated by simulations and on experimental microscopy data.

## 1 Introduction

L'illumination structurée est une technique d'imagerie éprouvée en microscopie plein champ qui permet d'obtenir du sectionnement optique (SO) [1] et de la super-résolution (SR) [2]. Elle consiste à projeter sur l'objet d'intérêt des motifs d'illumination, généralement périodiques, qui engendrent une modulation spatiale de l'intensité émise par l'objet. Cette modulation a un double effet : d'une part elle introduit par repliement spectral, des hautes fréquences de l'objet normalement non transmises par le système optique à l'intérieur de la bande passante optique. D'autre part, la contribution modulée dans les images provient essentiellement des couches de l'objet proches

du plan focal car le contraste de modulation décroît fortement avec la défocalisation. Plusieurs images avec des positions différentes du motif d'illumination sont toutefois nécessaires pour parvenir à démêler l'information modulée de la contribution conventionnelle non modulée. Une grande variété de méthodes algorithmiques, exploitant ces deux effets, ont été développées pour reconstruire l'objet observé avec du SO et/ou de la SR.

Parmi les algorithmes de reconstruction existants, on distingue d'une part les méthodes 2D qui réalisent soit du SO en extrayant et démodulant les composantes fréquentielles modulées dans les images comme proposé initialement par Neil [1], soit de la SR en recombinaison des différentes composantes fréquentielles d'après l'idée originale de Gustafsson [2]. Bien

qu'il existe des approches 2D qui tentent d'allier et SR et OS dans une même reconstruction, elles nécessitent un plus grand nombre de paramètres à ajuster. D'autre part, on distingue les méthodes 3D qui intrinsèquement réalisent à la fois du SO et de la SR [3] en dépit d'un nombre d'images requis plus important puisqu'il faut acquérir toute une série focale d'images. Une méthode 3D proposée récemment reconstruit un volume 3D à partir de données 2D (pour une seule position focale) [4], réduisant ainsi drastiquement le nombre d'images requis au dépend d'une plus grande sensibilité aux bruits. Dans cette communication, nous présentons une méthode de reconstruction qui, à partir de données 2D, permet de réaliser conjointement du SO et de la SR à l'aide d'un modèle 3D multi-couche de formation d'images [5]. Contrairement à l'approche 3D [4], notre méthode conserve la simplicité d'opérations 2D dans le modèle et reconstruit un objet à deux couches au lieu d'un volume ce qui le rend plus robuste au bruit. L'intérêt de la reconstruction d'un objet bi-couche est de reconstruire d'une part une section super-résolue de l'objet et d'autre part une couche où l'on rejette la contribution de tous les plans défocalisés de l'objet. Notre méthode prend également en compte les mouvements de l'objet observé en vue de l'appliquer à l'imagerie rétinienne.

En effet, l'application de la SIM à l'imagerie rétinienne offre de nouvelles possibilités dans l'étude *in vivo* des structures et fonctions de la rétine grâce aux effets de SR et SO. La principale difficulté d'adaptation des méthodes SIM à l'imagerie rétinienne provient des mouvements oculaires non contrôlés qui entraînent des décalages inter-frames lors de l'acquisition d'images rétiniennes. Quelques auteurs [6] proposent de recalculer les images par rapport aux mouvements oculaires pour se ramener à un objet statique dans les images recalées avec des phases de la modulation néanmoins non contrôlées, puis d'appliquer une méthode de reconstruction 2D qui permet, par une estimation de la phase de modulation à chaque image, d'obtenir un objet super-résolu. Toutefois, cette approche ne réalise pas de SO. L'apport de notre méthode est qu'elle permet une reconstruction avec SO et SR dans un cadre bayésien non supervisé, à l'aide d'un modèle 3D de formation d'images prenant en compte explicitement les mouvements de l'objet. La méthode proposée étend les travaux présentés lors d'une précédente communication [7]. Contrairement à ce qui a été proposé par le passé, elle ne nécessite plus la soustraction, souvent délicate, d'une image conventionnelle aux images SIM acquises. Nous validons notre méthode par simulations puis sur des données expérimentales de microscopie.

## 2 Modèle de formation d'images

Nous proposons un modèle général d'imagerie par illumination structurée qui prend en compte explicitement la nature 3D de l'objet ainsi que des décalages potentiels liés à l'objet. Notons  $o$  l'échantillon biologique observé.  $o$  représente une densité 3D de fluorophore en imagerie de fluorescence ou bien une carte 3D de réflectance en imagerie rétinienne par exemple, et sera appelé abusivement l'objet par la suite.  $(x, y, z)$  sont les

coordonnées spatiales dans l'espace objet avec  $(x, y)$  les coordonnées transverses et  $z$  la distance axiale au plan focal objet. On suppose que l'objet se déplace de manière non contrôlée selon des translations dans le plan transverse ( $Oxy$ ) ce qui est une hypothèse valable en imagerie rétinienne plein champ. L'objet, éclairé par un motif d'illumination  $m$  est observé à travers un système d'imagerie caractérisé par une fonction d'étalement de point (FEP)  $h$ . Soit  $i_j$  la  $j$ -ième image acquise par une caméra placée au plan focal image. Celle-ci peut être vue comme le résultat de convolutions 2D de chaque couche objet  $o_z$  éventuellement décalée, modulée par le  $j$ -ième motif d'illumination  $m_{j,z}(x, y) = m_j(x, y, z)$  avec la FEP 2D  $h_z$  correspondant à la profondeur  $z$ , et intégrées suivant l'axe l'optique. Comme dans [7], la version discrète décrivant ce processus de formation d'images s'écrit :

$$i_j(k, l) = \sum_z [h_z \star (m_{j,z} \cdot s_j[o_z])]_{\text{III}}(k, l) + n_j(k, l) \quad (1)$$

où la police en gras désigne la version discrète,  $\star$  représente le produit de convolution 2D discret et  $s_j[\cdot]$  est un opérateur de décalage subpixelique qui calcule la version discrète de la couche objet décalée.  $[\cdot]_{\text{III}}$  dénote l'opérateur de sous-échantillonnage éventuel. En effet, comme la fréquence maximale de l'objet reconstruit peut être deux fois supérieure à celle des images acquises par super-résolution,  $h_z$ ,  $m_{j,z}$  et  $o_z$  peuvent être échantillonnées sur une grille deux fois plus fine afin de respecter le théorème d'échantillonnage de Shannon-Nyquist. Enfin, le terme  $n_j$  décrit le bruit de détection provenant du bruit de lecture de la caméra et du bruit de photon. Nous supposons que le nombre de photons reçus par le détecteur est suffisant pour approximer le bruit de détection par un bruit blanc gaussien inhomogène de variance  $\sigma_j^2(k, l)$ .

Afin de permettre une reconstruction avec SR et SO conjointement (tout en réduisant le nombre d'inconnues à estimer), nous proposons de reconstruire un objet à deux couches : une couche correspondant à la tranche focalisée de l'objet  $o_0$  et une couche qui synthétise la contribution de tous les plans défocalisés  $o_d$ . Intéressons nous aux mécanismes permettant le SO : comme expliqué dans [6], le contraste de la modulation dans les images décroît avec la défocalisation. Cela s'explique dans l'espace des fréquences spatiales par le fait que le contraste de la modulation dans les images est atténué par la fonction de transfert optique (FTO), et que les FTOs sont de plus en plus passe-bas à mesure que la défocalisation augmente, si bien que le contraste de la modulation est d'autant plus réduit. Ainsi, en choisissant de reconstruire la couche focalisée à  $z = 0$  pour laquelle la FTO transmet la modulation et une couche défocalisée à  $z = d$  pour laquelle la FTO atténue fortement la fréquence spatiale de la modulation, on parvient à distinguer la contribution de chacune de ces couches puisque l'information modulée dans les images va alors provenir essentiellement de la couche focalisée. En notant respectivement  $h_0$  et  $h_d$ , la FEP 2D focalisée et la FEP 2D défocalisée, on obtient le modèle direct suivant :

$$\mathcal{M}(o_0, o_d, s_j) = [h_0 \star (m_{j,0} \cdot s_j[o_0]) + h_d \star (m_{j,d} \cdot s_j[o_d])]_{\text{III}} + n_j \quad (2)$$

On choisit la distance  $d$  comme celle correspondant à la première annulation de la FTO en fonction de la défocalisation. La défocalisation équivalente vaut  $2/\sqrt{3} \approx 1.15$  radian RMS.

### 3 Méthode de reconstruction

A partir des images acquises  $\{\mathbf{i}_j\}_{1 \leq j \leq N}$ , nous reconstruisons l'objet bi-couche  $(\mathbf{o}_0, \mathbf{o}_d)$  à l'aide d'une approche *Maximum A Posteriori* (MAP) dans le cadre bayésien. Les paramètres instrumentaux du modèle direct (Eq. (2))  $(\mathbf{h}_0, \mathbf{h}_d)$  et  $\{\mathbf{m}_{j,0}, \mathbf{m}_{j,d}\}_j$  sont d'abord étalonnés de manière expérimentale. Les décalages objet pris en compte par les opérateurs  $\{\mathbf{s}_j[\cdot]\}_j$  sont ensuite estimés à l'aide d'un algorithme de recalage subpixelique adapté de [8]. (Les modifications apportées consistent en un filtrage de la modulation dans les images pour se ramener au cadre prévu par la version originale de l'algorithme, avant de les recaler). L'approche MAP consiste à minimiser le critère suivant :

$$J(\mathbf{o}_0, \mathbf{o}_d) = \sum_{j=1}^N \frac{1}{2} \left\| \frac{\mathbf{i}_j - \mathcal{M}(\mathbf{o}_0, \mathbf{o}_d; \hat{\mathbf{s}}_j)}{\boldsymbol{\sigma}_j} \right\|_2^2 + R(\mathbf{o}_0) + R(\mathbf{o}_d). \quad (3)$$

Le terme de régularisation  $R$  utilisé ici correspond à une densité de probabilité *a priori* gaussienne homogène décrite par un objet moyen et une densité spectrale de puissance à trois paramètres [9]. Ces trois paramètres ainsi que la variance du bruit sont estimés de manière non supervisée par une approche MV comme dans [10]. Etant donné qu'il n'y a pas de solution analytique de la minimisation de l'Eq. (3), celle-ci s'effectue numériquement sous contrainte de positivité. Les résultats obtenus à l'aide de cette méthode sont présentés et analysés dans les sections suivantes.

### 4 Validation par simulations

Afin de valider cette approche, nous avons généré un objet à 9 couches dont chacune est composée d'une mire sinusoïdale radiale de la forme  $f(r, \theta) = 1 + \cos(40\theta)$ . L'objet est ainsi constitué de 9 mires régulièrement espacées suivant l'axe optique de manière à avoir une mire au plan focal objet et les 8 autres de plus en plus éloignées de ce plan avec un pas de défocalisation de 0,4 radian RMS soit  $8,8 \mu\text{m}$  dans la rétine pour une pupille dilatée. On simule alors des images de taille  $512 \times 512$  pixels plein champ conventionnelle  $\mathbf{i}_{WF}$  et SIM  $\{\mathbf{i}_j\}_j$  de l'objet supposé mobile à l'aide de l'Eq. (1). La FEP focalisée  $\mathbf{h}_0$  utilisée correspond à la FEP en limite de diffraction et les FEPs appliquées aux autres plans sont des versions de  $\mathbf{h}_0$  dégradées par la défocalisation de la couche considérée. On modélise les décalages aléatoires de l'objet par une loi uniforme définie sur  $[-16, 16]$ . Deux motifs d'illumination sinusoïdaux sont utilisés ; ils correspondent à une fréquence de modulation  $f_m$  égale à la demi-coupe optique  $f_c/2$  dans les directions horizontale puis verticale. La fréquence de modulation choisie est optimale pour le sectionnement optique [6] et permet en

théorie un gain de résolution de facteur 1,5. Les images sont ensuite bruitées par un bruit blanc gaussien homogène pour deux niveaux de bruit, correspondant à un rapport signal sur bruit (RSB) de 100 et de 10. Des exemples d'images simulées pour un RSB de 10 sont affichés sur la Figure 1. Sept images par motif d'illumination sont considérées, afin que les décalages aléatoires de l'objet introduisent une diversité de phase du motif suffisante pour la reconstruction [6]. Ainsi,  $7 \times 2 = 14$  images sont utilisées par reconstruction.

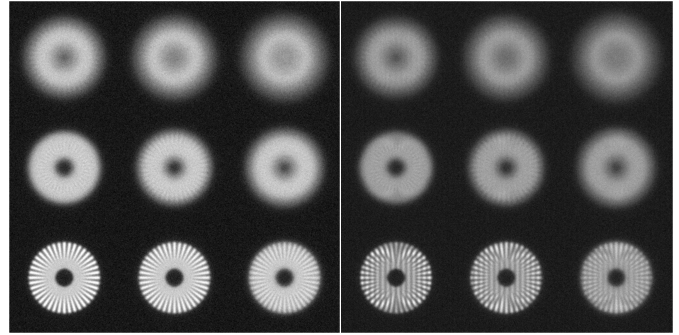


FIGURE 1 – Images simulées pour un RSB de 10. De gauche à droite : images conventionnelle  $\mathbf{i}_{WF}$  et avec illumination structurée  $\mathbf{i}_j$ . La mire située au plan focal objet se trouve dans le coin inférieur gauche, et les autres mires sont progressivement défocalisées de gauche à droite puis de bas en haut.

Nous appliquons alors la méthode de reconstruction décrite dans la section 3 aux données simulées nous obtenons les résultats présentés à la Figure 2 pour un RSB de 10. Comme on a modélisé la couche défocalisée  $\mathbf{o}_d$  à une défocalisation de 1.15 radian RMS, on s'attend à ce que les mires situées à des défocalisations inférieures soient reconstruites dans la couche focalisée  $\mathbf{o}_0$  et que les autres soient attribuées à  $\mathbf{o}_d$ . Ce résultat attendu se vérifie dans les reconstructions où l'on constate, dans  $\hat{\mathbf{o}}_0$ , la diminution croissante de l'intensité moyenne des mires radiales avec la défocalisation avec une atténuation de plus de 90 % à partir d'une défocalisation de 1.2 radian RMS, soit un SO de  $30 \mu\text{m}$  rétinien environ. Inversement, le phénomène contraire est observé dans  $\hat{\mathbf{o}}_d$  où l'intensité moyenne des mires croît avec la défocalisation. De plus, on observe un gain en résolution latérale dans  $\hat{\mathbf{o}}_0$  par rapport à l'image plein champ conventionnelle  $\mathbf{i}_{WF}$ . Le gain en résolution mesuré par rapport à la limite de diffraction est de 1,2 pour un RSB de 10 et de 1,4 pour un RSB de 100. On constate en outre que l'estimation des décalages objet ne dégrade pas les reconstructions par rapport à celles obtenus en utilisant les décalages vrais, au bruit près.

### 5 Reconstructions sur données expérimentales

Nous avons appliqué notre méthode à des données expérimentales de microscopie fournies par l'auteur du logiciel ouvert fairSIM [11]. Il s'agit d'images d'actine marquée et observée par un microscope OMXv4 en fluorescence. Les motifs d'illumination projetés correspondent à une modulation à deux ordres :  $f_{mod,1} = 0,45f_c$  et  $f_{mod,2} = 0,9f_c$ . Le gain de ré-

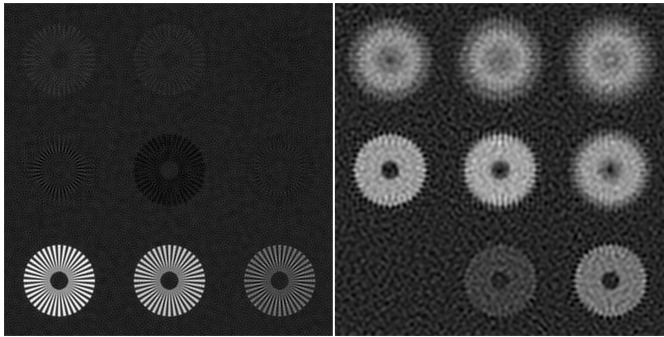


FIGURE 2 – Reconnstructions  $\hat{o}_0$  (gauche) et  $\hat{o}_d$  (droite) pour un RSB de 10.

solution maximal est donc de facteur 1,9. Trois orientations de motif et cinq phases par orientation sont utilisées, ce qui fait un total de 15 images SIM, dont l’une est affichée sur la Figure 3.

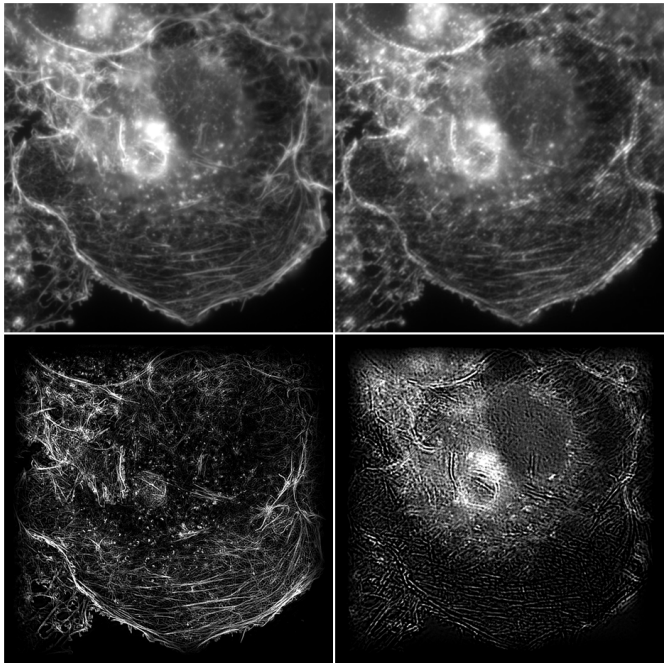


FIGURE 3 – Haut : images conventionnelle (gauche) et SIM (droite). Bas : reconstructions des couches focalisée  $\hat{o}_0$  (gauche) et défocalisée  $\hat{o}_d$  (droite).

Nous avons étalonné les paramètres instrumentaux de notre modèle à partir des caractéristiques du microscope et estimé les autres paramètres à partir des images SIM conformément à la méthode présentée dans la section 3. Les reconstructions obtenues, en supposant l’objet statique, des couches focalisée  $\hat{o}_0$  et défocalisée  $\hat{o}_d$  sont représentées à la Figure 3. En comparant l’image conventionnelle, estimée en moyennant les images SIM, avec les reconstructions, on constate que le contenu diffus et flou de l’échantillon est rejeté dans  $\hat{o}_d$  tandis que les structures fines et nettes (donc proches du plan focal) sont restituées dans  $\hat{o}_0$  avec une résolution accrue. Notre méthode produit donc conjointement du SO et de la SR sur données expérimentales.

## 6 Conclusions

La microscopie par illumination structurée (SIM) est une technique d’imagerie plein champ permettant d’obtenir sectionnement optique (SO) et super-résolution (SR). Nous avons présenté une méthode de reconstruction SIM, permettant à la fois SO et SR, dont nous avons montré par simulations qu’elle est adaptée à l’imagerie rétinienne. Elle repose sur un modèle physique de la formation d’images qui tient compte des mouvements oculaires et qui distingue la couche focalisée des autres contributions défocalisées que l’on souhaite rejeter. Notre méthode est non supervisée et réalise une estimation MAP conjointe de la couche focalisée et des contributions défocalisées.

Une modification d’un système d’imagerie rétinienne plein champ à haute performance corrigé par optique adaptative [12] pour exploiter l’illumination structurée est en cours à l’hôpital des XV-XX. Ce système d’imagerie nous permettra très prochainement d’obtenir des images rétinienne *in vivo* sur lesquelles nous appliquerons notre méthode de reconstruction SIM.

Ces travaux ont été partiellement financés par l’ANR RHU LIGHT4DEAF (ANR-15-RHUS-0001) et le projet RES-SOURCES du Défi CNRS Imag’In.

## Références

- [1] M. A. A. Neil, R. Juškaitis, and T. Wilson. Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope. *Opt. Lett.*, 22(24) :1905–1907, 1997.
- [2] M.G.L. Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. Short communication. *Journal of microscopy*, 198 :82–7, 2000.
- [3] M. G. L. Gustafsson et al. Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophys. J.*, 94(12) :4957–4970, June 2008.
- [4] A. Jost, E. Tolstik, P. Feldmann, K. Wicker, A. Sentenac, and R. Heintzmann. Optical Sectioning and High Resolution in Single-Slice Structured Illumination Microscopy by Thick Slice Blind-SIM Reconstruction. *PLOS ONE*, 10(7) :e0132174, 2015.
- [5] Y. Lai-Tim et al. Jointly super-resolved and optically sectioned Bayesian method for SIM reconstruction. *Optica*, soumis.
- [6] S. Chetty and S. Gruppetta. Structured illumination microscopy for in-vivo human retinal imaging : a theoretical assessment. *Opt. Exp.*, 20(23) :25700–25710, 2012.
- [7] R. Baena-Gallé, L. M. Mugnier, and F. Orieux. Optical sectioning with structured illumination microscopy for retinal imaging : inverse problem approach. In *26ème Colloque sur le Traitement du Signal et des Images. GRETSI*, September 2017.
- [8] L. Blanco, L. Mugnier, A. Bonnefois, and M. Paques. Registration and restoration of adaptive-optics corrected retinal images. In *Proceedings of the 2014 IWCIM. IEEE*, 2014.
- [9] J.-M. Conan, L. M. Mugnier, T. Fusco, V. Michau, and G. Rousset. Myopic deconvolution of adaptive optics images by use of object and point spread function power spectra. *Applied Optics*, 37(21) :4614–4622, 1998.
- [10] A. Blanc, L. M. Mugnier, and J. Idier. Marginal estimation of aberrations and image restoration by use of phase diversity. *J. Opt. Soc. Am. A*, 20(6) :1035–1045, 2003.
- [11] M. Müller, V. Mönkemöller, S. Hennig, W. Hübner, and T. Huser. Open-source image reconstruction of super-resolution structured illumination microscopy data in ImageJ. *Nature Communications*, 7 :10980, 2016.
- [12] E. Gofas-Salas, P. Mecê, C. Petit, J. Jarosz, L. Mugnier, A. Bonnefois, K. Grieve, J. Sahel, M. Paques, and S. Meimon. High loop rate adaptive optics flood illumination ophthalmoscope with structured illumination capability. *Appl. Opt.*, 57(20) :5635–5642, 2018.