



**HAL**  
open science

# Déconvolution, débruitage et correction de la distorsion axiale pour des images de microscopie à feuillet de lumière

Adrien Julia, Rabah Iguernaissi, François Michel, Valery Matarazzo, Djamal Merad

## ► To cite this version:

Adrien Julia, Rabah Iguernaissi, François Michel, Valery Matarazzo, Djamal Merad. Déconvolution, débruitage et correction de la distorsion axiale pour des images de microscopie à feuillet de lumière. GRETSI 2023, Aug 2023, Grenoble, France. hal-04194904

**HAL Id: hal-04194904**

**<https://hal.science/hal-04194904v1>**

Submitted on 4 Sep 2023

**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.

# Déconvolution, débruitage et correction de la distorsion axiale pour des images de microscopie à feuillet de lumière

Adrien JULIA<sup>1,2</sup> Rabah IGUERNAISSI<sup>1</sup> François MICHEL<sup>2</sup> Valery MATARAZZO<sup>2</sup> Djamel MERAD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>LIS : Aix Marseille Univ, CNRS, LIS (UMR7020), Turing Centre for Living systems, Marseille, France

<sup>2</sup>INMED : Aix Marseille Univ, INSERM, INMED (UMR1249), Turing Centre for Living systems, Marseille, France

**Résumé** – La microscopie fluorescente à feuillet de lumière (LSFM) est utile pour les neurobiologistes, mais peut induire des artefacts sur les volumes reconstruits en 3D. Un pipeline en trois étapes est proposé pour améliorer la qualité des images slice par slice. Il comprend un algorithme de déconvolution 2D, un rehaussement automatique du contraste et un auto-encodeur de débruitage convolutionnel pour supprimer le bruit. De plus, une approche nouvelle est proposée pour résoudre le problème de distorsion axiale en utilisant un auto-encodeur entraîné sur des images de billes de calibration. Ce pipeline améliore la compréhension des images biologiques en dépassant les méthodes existantes.

**Abstract** – Light Sheet Fluorescence Microscopy is useful for neurobiologists but may induce artifacts on reconstructed 3D volumes. A three-step pipeline is proposed to improve the quality of slice-by-slice images. It includes a 2D deconvolution algorithm, automatic contrast enhancement, and a convolutional denoising autoencoder to remove noise. Additionally, a new approach is proposed to solve the axial distortion problem using an autoencoder trained on calibration bead images. This pipeline enhances the understanding of biological images by surpassing existing methods.

## 1 Introduction

Le développement de l'imagerie en 3D a permis de grandes avancées en neurosciences. La microscopie fluorescente à feuillet de lumière (LSFM) est une méthode capable d'imager rapidement et à haute résolution des échantillons biologiques de taille centimétrique. Contrairement à d'autres techniques d'imagerie, le sectionnement optique est obtenu en utilisant un plan d'illumination plutôt qu'un faisceau d'illumination. Un feuillet de lumière illumine l'échantillon par les côtés, et une caméra est placée perpendiculairement à l'échantillon pour imager la fluorescence générée. En déplaçant le plan d'illumination (ou l'échantillon) selon l'axe vertical, nous pouvons imager l'échantillon à différentes profondeurs et ainsi reconstruire un volume en 3D. En imageant directement un plan en 2D, cette méthode permet ainsi de réduire drastiquement la phototoxicité et le photoblanchiment. Cela permet en outre une grande vitesse d'acquisition (comparé à un microscope confocal qui scanne l'échantillon pixel par pixel), tout en conservant un bon contraste. Ce procédé induit en revanche une elongation du volume selon l'axe vertical, et des artefacts sur les images en 2D. Le travail proposé dans cet article se concentre ainsi sur l'élimination du flou et des artefacts présents sur les images en 2D. Dans n'importe quel système optique, l'image enregistrée est le résultat de la convolution de l'image observée avec la réponse impulsionnelle de l'instrument (PSF, fonction d'étalement du point). Cette PSF tend à flouter les images, dégradant ainsi l'observation des détails les plus fins. Pour résoudre ce problème, deux approches coexistent : mesurer la PSF (à l'aide de grains fluorescents) ou l'estimer (déconvolution aveugle). Mesurer la réponse impulsionnelle sur des images de fluorescence est complexe, car elle peut se décomposer en la PSF de la caméra et la PSF d'illumination (fluorescence). La résolution de la caméra limite la possibilité de mesurer la PSF : avec un objectif à grand champ (2x ou 4x),

la PSF observée mesure seulement quelques pixels. Par conséquent, la majorité des travaux portant sur la déconvolution d'images LSFM utilise des méthodes d'estimations itératives de la PSF [3][9][4]. Parmi ces travaux, [3][2] ont estimé la PSF d'un microscope à feuillet de lumière en utilisant un modèle itératif reposant sur l'algorithme de Richardson-Lucy. Le modèle détermine ainsi la meilleure estimation possible de l'image reconstruite, qui une fois convoluée par la PSF correspond au mieux avec l'image enregistrée. Un critère de qualité est utilisé pour quantifier la différence entre ces images. Dans leur article le plus récent [2], un filtre utilisant la méthode du 3D rolling ball a été ajouté avant la déconvolution. Cela permet ainsi de réduire le signal de fond pour éviter de l'amplifier durant la déconvolution. Une autre méthode utilisant l'algorithme de Richardson-Lucy a été proposée pour résoudre la déconvolution multivue d'images 3D par [9]. Le travail de [10] se propose d'étudier le cas d'une PSF variant spatialement en modélisant un modèle de formation d'image simulant la physique d'un LSFM. La déconvolution tend à amplifier le bruit présent dans les images, ainsi, l'utilisation d'un algorithme de débruitage est nécessaire, d'autant plus si l'on décide ensuite d'augmenter le contraste (ce qui amplifie aussi le bruit). [12] propose d'utiliser un système optique différent, en générant un feuillet de lumière épais, pour retirer le bruit Poisson-Gaussien image par image (en utilisant un filtre glissant). Leur méthode permet ainsi de déconvoluer un stack d'images et aussi de retirer les artefacts introduits par la déconvolution. D'une façon similaire, [1] ont réalisé un microscope à feuillet de lumière modifié iSPIM : le faisceau d'illumination utilisé ici est un faisceau de Bessel (à l'ordre 0) au lieu d'un faisceau Gaussien. Les artefacts générés par le faisceau de Bessel sont corrigés en utilisant un algorithme de deep-learning CBS-deep. Des lignes noires peuvent aussi être observées sur les images, causées par des zones de l'échantillon plus absorbantes ou diffusantes. [11] propose une méthode pour les retirer, et la revue [8] pré-

sente plusieurs méthodes pour les corriger. En microscopie, les objectifs à milieu d’immersion (liquide) sont fréquemment utilisés afin d’améliorer l’ouverture numérique de l’objectif. Ceci permet ainsi d’obtenir une meilleure résolution. Cependant, la différence d’indices de réfraction entre l’échantillon et le milieu d’immersion induit des aberrations sphériques, dégradant plus particulièrement les volumes reconstruits en 3D. En effet, ces aberrations limitent la résolution axiale de l’appareil, élongeant ou compressant les volumes reconstruits selon l’axe de profondeur de l’échantillon. Ce problème est peu étudié dans la littérature, malgré le travail de [5] proposant de calculer un facteur de correction à appliquer selon l’axe  $z$ . C’est pourquoi nous proposons dans cet article une méthode innovante pour corriger cet artefact.

## 2 Méthode

Bien que le microscope à feuillet de lumière soit capable d’atteindre des performances exceptionnelles, permettant d’imager de grands volumes en gardant une résolution suffisante pour observer les cellules, les images obtenues avec ce système présentent des artefacts tels que le bruit et la distorsion. Au cours de cette étude, nous vous proposons un pipeline corrigeant ces aberrations. Nous proposons d’augmenter d’abord la lisibilité des régions d’intérêt en corrigeant les images de leur réponse impulsionnelle. Le rehaussement du contraste permet aussi, ensuite, d’observer des détails fins invisibles sur les images brutes. Ces deux procédés amplifiant le bruit, nous avons décidé d’ajouter à la fin du pipeline une étape de réduction du bruit. Finalement, le stack entier est corrigé de la distorsion axiale contaminant le volume reconstruit en 3D.

### 2.1 Déconvolution de la PSF et débruitage

La première étape de notre méthode repose sur la correction des effets délétères de la réponse impulsionnelle du système d’acquisition sur les images enregistrées. En corrigeant les images de la réponse impulsionnelle (i.e. la PSF), nous pouvons ainsi retirer le flou induit par l’optique. Pour ce faire, nous utilisons la méthode proposée par [3][2] : obtenir une PSF suffisamment résolue est impossible en LSFM, ils se proposent donc de la simuler. La PSF est dérivée d’un modèle de formation d’image au sein d’un LSFM, permettant ainsi d’avoir une PSF résolue à tous les grossissements. L’image enregistrée  $D$  s’exprime comme l’image observée  $O$  dégradée par la fonction de transfert  $H$  et contaminée par du bruit additif selon :

$$D = O \otimes H + N \quad (1)$$

En introduisant l’algorithme de Richardson-Lucy, on peut estimer l’image observée  $O$  :

$$O^{n+1} = O^{(n)} \left[ \frac{D}{H \otimes O^{(n)}} \right] \otimes \hat{H} \quad (2)$$

Afin de limiter l’amplification du bruit inhérente à l’algorithme de Richardson-Lucy, une régularisation préservant le flux a été introduite [3][2]. Nous décidons d’augmenter le contraste des images en utilisant une méthode conventionnelle : Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization (CLAHE). Cette méthode est rapide à calculer et limite l’amplification du bruit tout en augmentant le Power Signal To Noise Ratio (PSNR).

La seconde étape de ce pipeline consiste à retirer le bruit, présent dans les images brutes, et renforcé par les traitements précédant. Au cours du développement du traitement d’images numériques, la suppression du bruit a été très largement étudiée. Cependant, lorsque l’on manipule des images de fluorescence, le débruitage est d’autant plus important : la fluorescence émise par l’échantillon marqué par la Green Fluorescent Protein (GFP) est très faible, dégradant le rapport signal sur bruit. Nous pouvons modéliser le bruit ainsi présent par un mélange de bruits Poisson-Gaussien. Le bruit de Shottky étant modélisé par le bruit de Poisson, et le bruit thermique par le bruit Gaussien additif. Le signal observé  $z_i$  est donc le signal  $y_i$  contaminé par du bruit  $n_i$  :

$$z_i = y_i + n_i = n_p(y_i) + n_g \quad (3)$$

Par conséquent, le débruitage consiste en l’estimation du signal  $y_i$ , connaissant le signal bruité  $z_i$ . En nous basant sur le travail de [7], nous avons développé un auto encodeur constitué de trois couches de convolution sur l’encodeur, et trois couches de convolution transposée sur le décodeur. Nous avons ajouté une couche de dropout spatial après la seconde couche de convolution, et une normalisation par batch après chaque couche de convolution, afin de limiter le sur-apprentissage. Nous avons aussi ajouté une couche de skip connection entre la seconde couche de convolution de l’encodeur et la seconde couche de convolution du décodeur. Les skip connection évitent la disparition du gradient pendant la backpropagation, et aident le décodeur à reconstruire une image sans artefacts, en passant les détails des images directement vers la sortie.

### 2.2 Correction de la distorsion en 3D

La qualité des reconstructions est limitée par les aberrations optiques. En effet, les hétérogénéités des indices de réfraction entre le milieu d’immersion et l’échantillon transparisé engendrent la diffusion du feuillet de lumière. Cette diffusion va ainsi compresser le volume reconstruit (si l’indice de réfraction du milieu d’immersion, l’huile, est plus faible que l’indice de réfraction de l’échantillon), ou élonger le volume reconstruit (dans le cas d’objectif à air). Bien que [5] ait étudié les sources de ces aberrations et ainsi proposé une méthode pour la corriger, l’utilisation d’un facteur de correction pour un stack entier d’image demeure insuffisant. En effet, cette méthode ne prend pas en compte la variation de la distorsion dans le volume  $x - y - z$ . Par conséquent, nous proposons ici une méthode plus robuste pour corriger les dégradations sur l’axe  $z$  des reconstructions en 3D. La transformation inverse (permettant de corriger la distorsion) peut être apprise en utilisant un auto encodeur et des images de grains fluorescents. Ces grains, parfaitement sphériques, mesurent  $4\mu\text{m}$  de diamètre et sont immergés dans un cube de gel d’agarose. Nous avons imagé ces cubes à plusieurs grossissements (2x, 4x et 6x). Une base de données d’entraînement est créée en utilisant ces images de grains : à partir du stack d’images de grains fluorescents, un stack « virtuel » et non élongé est reconstruit. En utilisant ce stack virtuel comme cible de l’apprentissage d’un auto-encodeur, et le stack d’images de grains comme images d’entrée de l’auto-encodeur, nous pouvons ainsi apprendre la transformation permettant de corriger les images. Pour réaliser les premiers tests, nous avons construit un auto-encodeur à une couche de convolution, avec 1024 filtres de taille (3,3). L’auto

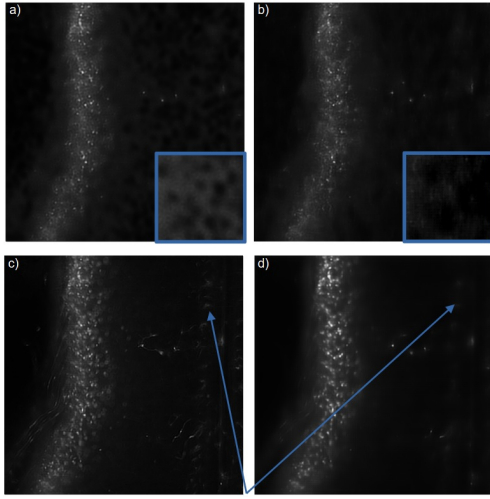


FIGURE 1 : a) DAE de [7], b) DAE proposé, c) image déconvoluée avec [3][2], d) pipeline entier : déconvolution + CLAHE + débruitage

encodeur est entraîné avec la fonction de coût Binary Cross Entropy et l’optimiseur RMSprop.

### 3 Résultats

Nous proposons d’évaluer notre pipeline en deux parties principales : les traitements en 2D et en 3D.

#### 3.1 Traitements images par images

Cette partie consiste à retirer le flou des images via la déconvolution de Richardson-Lucy et l’élimination des artefacts tels que le bruit. Pour évaluer les performances de l’auto encodeur de débruitage, nous avons généré une base de données corrompue artificiellement par un bruit Poisson-Gaussien. Des métriques couramment utilisées en traitement d’image (PSNR et SSIM) nous permettent de quantifier la qualité du débruitage (Tableau 1). Des essais sur un modèle de bruit additif Gaussien seul n’ont pas révélé d’écarts significatifs de performances entre les méthodes de débruitage présentées ici. Le modèle Poisson-Gaussien se rapprochant mieux de la réalité, nous avons choisi de présenter l’évaluation de notre méthode avec ce modèle.

TABLE 1 : PSNR et SSIM comparant les méthodes conventionnelles, le DAE de [7] et notre modèle

	PSNR (dB)	SSIM
Original + noise	17.123 ± 0.028	0.164±0.001
Bilateral filter	21.541 ± 0.021	0.373±0.001
Median filter	23.410 ± 0.043	0.486±0.002
Total variation	25.324 ± 0.076	0.801±0.003
Wavelet (Bayes)	25.538 ± 0.090	0.807±0.004
Wavelet (Visushrink)	25.654 ± 0.094	0.820±0.004
Mean filter	26.096 ± 0.091	0.841±0.004
BM3D	26.884 ± 0.121	0.886±0.004
DAE (Gondara)	38.564 ± 0.174	0.977±0.001
<b>DAE (ours)</b>	<b>39.319 ± 0.191</b>	<b>0.979 ± 0.001</b>

L’utilisation de méthodes deep permet de grandement améliorer la qualité des images sans pour autant introduire des

TABLE 2 : PSNR après déconvolution, CLAHE et débruitage

	PSNR (dB)
Deconvolution	33.863 ± 5.115
CLAHE	31.609 ± 4.071
Deconvolution + CLAHE	29.238 ± 3.835
Deconvolution + CLAHE + denoising	33.463 ± 4.108

artefacts, comme nous pouvons l’observer en utilisant des méthodes conventionnelles. En effet, le débruitage par un filtre en ondelettes introduit de l’aliasing, et, les filtres médian, moyenneur et bilatéral tendent à lisser les images. Le filtrage par variation totale permet cependant de garder des images nettes, mais le gain en PSNR est réduit par rapport aux méthodes deep. En outre, notre modèle d’auto encodeur permet d’obtenir de bien meilleurs résultats que le Denoising Auto Encoder (DAE) introduit par [7] : en effet le gain en PSNR est supérieur, tout en gardant une SSIM plus proche de 1. L’implémentation des couches de spatial dropout, batch normalization et skip connection évitent les artefacts de reconstruction. En effet, ces artefacts sont visibles sur la Figure 1 a) : le modèle de [7] tend à ajouter des disques sombres sur l’arrière plan, alors que notre modèle est capable de traiter des images très bruitées sans introduire ces artefacts. Nous constatons aussi que les cellules (et les détails fins) sont moins lissés en utilisant notre modèle, comme souligné par la Figure 1 b). Par la suite, afin d’évaluer le gain effectif du pipeline image par image, nous avons comparé les métriques de qualité après chaque étape du pipeline dans le Tableau 2. Les résultats indiquent un gain très net de qualité après l’utilisation de nos méthodes. Le pipeline général améliore d’avantage la qualité que les étapes séparées, excepté pour la déconvolution, qui donne des résultats similaires. Cependant, la qualité d’image est un choix objectif, nous avons ainsi demandé l’avis de biologistes sur la pertinence de notre méthode, et il est clair pour eux que le pipeline général améliore grandement la qualité et la lisibilité des images. En effet, ce pipeline est capable d’améliorer le contraste des régions d’intérêt tout en réduisant le signal de fond contaminant, tel que pointé par la flèche sur les Figure 1 c) et d).

#### 3.2 Correction de l’élongation selon l’axe z

Dans cet article, nous avons obtenu des résultats préliminaires de notre algorithme de correction de la distorsion. Notre modèle est capable de reconstruire des volumes sans introduire d’artefacts non présents dans les stacks d’images initiaux. Il est en effet très important de ne pas introduire d’information inexistante sur des images destinées à des études biologiques, qui pourrait ainsi fausser les travaux de nos confrères. Les premiers résultats ne mettent pas en évidence de grandes améliorations sur la distorsion axiale (Figure 2). En effet, la taille de notre base de données est relativement restreinte pour l’entraînement, et nous espérons de meilleurs résultats avec une base de données plus grande. De plus, nous avons prototypé pour l’instant ce modèle en réduisant la taille des images à 128 x 128, ce qui limite ainsi la capacité de l’auto encodeur à détecter une élongation des grains fluorescents sur l’axe z. Cette base de données réduite nous empêche aussi de comparer notre méthode à celle proposée par [5], nous aurions besoin d’avoir des images plus grandes pour nous confronter à leur méthode. Cependant, cette méthode est originale et permet à ce

jour de reconstruire un volume 3D sans introduire d'artefacts. Nous sommes en train de travailler sur une base de données plus robuste, afin d'étendre et d'enrichir les possibilités de cet auto encodeur.

## 4 Conclusion

Le microscope à feuillet de lumière est capable de produire des images de haute qualité d'échantillons biologiques à différentes échelles. Nous avons, dans cet article, développé des méthodes de post-traitement améliorant grandement la qualité des images issues de ce microscope. Notre pipeline proposé pour la correction d'images image par image est capable à la fois d'augmenter le signal dans les régions d'intérêt tout en réduisant le bruit de fond contaminant. L'algorithme de déconvolution proposé par [3][2] combiné à un rehaussement automatique du contraste augmente la capacité à distinguer les détails fins sur les images d'échantillons biologiques. Le DAE présenté dans cet article surpasse les résultats obtenus par [7] tout en évitant la génération d'artefacts sur les images reconstruites, ce qui permet ainsi d'efficacement retirer le signal de fond. En effet, la suppression du bruit de fond est importante lorsqu'il s'agit d'images devant être ensuite reconstruites en 3D en utilisant une projection d'intensité maximale (MIP). Un signal de fond résulte ainsi en l'enclavement de la région d'intérêt dans une enveloppe floue. Nous avons aussi abordé la problématique de la distorsion axiale fréquemment rencontrée en microscopie LSFM, en utilisant une approche innovante reposant sur un auto encodeur convolutionnel.

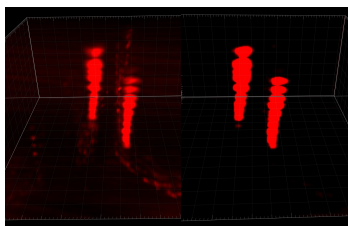


FIGURE 2 : Stack 3D reconstruit avec Imapris 9.5, stack corrigé de la distorsion

## Remerciements

Le projet qui a conduit à cette publication a reçu un financement de France 2030, le programme du gouvernement français géré par l'Agence nationale de la recherche (ANR-16-CONV-0001) et de l'Initiative d'excellence de l'Université Aix-Marseille - A\*MIDEX.

## Références

- [1] Chen BAI, Chao LIU, Xianghua YU, Tong PENG, Junwei MIN, Shaohui YAN, Dan DAN et Baoli YAO : Imaging enhancement of light-sheet fluorescence microscopy via deep learning. *IEEE Photonics Technology Letters*, 31(22):1803–1806, 2019.
- [2] Klaus BECKER, Saiedeh SAGHAFI, Marko PENDE, Christian HAHN et Hans Ulrich DODT : Visualizing minute details in light-sheet and confocal microscopy data by combining 3d rolling ball filtering and deconvolution. *Journal of Biophotonics*, 15(2):e202100290, 2022.
- [3] Klaus BECKER, Saiedeh SAGHAFI, Marko PENDE, Inna SABDYUSHEVA-LITSCHAUER, Christian M HAHN, Massih FOROUGHPOUR, Nina JÄHRLING et Hans-Ulrich DODT : Deconvolution of light sheet microscopy recordings. *Scientific reports*, 9(1):1–14, 2019.
- [4] Francesco CONTE, Alfredo GERMANI et Giulio IANNELLO : A kalman filter approach for denoising and deblurring 3-d microscopy images. *IEEE transactions on Image Processing*, 22(12):5306–5321, 2013.
- [5] Erin E DIEL, Jeff W LICHTMAN et Douglas S RICHARDSON : Tutorial : avoiding and correcting sample-induced spherical aberration artifacts in 3d fluorescence microscopy. *Nature protocols*, 15(9):2773–2784, 2020.
- [6] Tommaso FURIERI, Daniele ANCORA, Gianmaria CALLISESI, Stefano MORARA, Andrea BASSI et Stefano BONORA : Aberration measurement and correction on a large field of view in fluorescence microscopy. *Biomedical optics express*, 13(1):262–273, 2022.
- [7] Lovedeep GONDARA : Medical image denoising using convolutional denoising autoencoders. In *2016 IEEE 16th international conference on data mining workshops (ICDMW)*, pages 241–246. IEEE, 2016.
- [8] Pietro RICCI, Vladislav GAVRYUSEV, Caroline MÜLLENBROICH, Lapo TURRINI, Giuseppe de VITO, Ludovico SILVESTRI, Giuseppe SANCATALDO et Francesco Saverio PAVONE : Removing striping artifacts in light-sheet fluorescence microscopy : a review. *Progress in biophysics and molecular biology*, 168:52–65, 2022.
- [9] Maja TEMERINAC-OTT, Olaf RONNEBERGER, Peter OCHS, Wolfgang DRIEVER, Thomas BROX et Hans BURKHARDT : Multiview deblurring for 3-d images from light-sheet-based fluorescence microscopy. *IEEE Transactions on Image Processing*, 21(4):1863–1873, 2011.
- [10] Bogdan TOADER, Jérôme BOULANGER, Yury KOROLEV, Martin O LENZ, James MANTON, Carola-Bibiane SCHÖNLIEB et Leila MUREŞAN : Image reconstruction in light-sheet microscopy : spatially varying deconvolution and mixed noise. *Journal of mathematical imaging and vision*, 64(9):968–992, 2022.
- [11] Zechen WEI, Xiangjun WU, Wei TONG, Suhui ZHANG, Xin YANG, Jie TIAN et Hui HUI : Elimination of stripe artifacts in light sheet fluorescence microscopy using an attention-based residual neural network. *Biomedical Optics Express*, 13(3):1292–1311, 2022.
- [12] Zhe ZHANG, Dongzhou GOU, Fan FENG, Ruyi ZHENG, Ke DU, Hongrun YANG, Guangyi ZHANG, Huitao ZHANG, Louis TAO, Liangyi CHEN *et al.* : 3d hessian deconvolution of thick light-sheet z-stacks for high-contrast and high-snr volumetric imaging. *Photonics Research*, 8(6):1011–1021, 2020.