

Tomographie diffractive sans lentille appliquée à la culture cellulaire 3D

Anthony BERDEU^{1,2}, Fabien MOMEY^{1,2}, Nathalie PICOLLET-D'HAHAN^{1,3,4}, Frédérique KERMARREC MARCEL^{1,3,4}, Xavier GIDROL^{1,3,4}, Thomas BORDY^{1,2}, Jean-Marc DINTEN^{1,2}, Cédric ALLIER^{1,2}

¹Univ. Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France, ²CEA, LETI, MINATEC Campus, F-38054 Grenoble, France, ³CEA, iRTSV-Biologie à Grande Echelle, F-38054 Grenoble, France, ⁴INSERM, U1038, F-38054 Grenoble, France

anthony.berdeu@cea.fr, fabien.momey@cea.fr

Résumé – L'étude des cellules cultivées in vitro est mise en œuvre par les biologistes depuis plusieurs dizaines d'années. Si d'importants progrès ont été réalisés dans les méthodes d'imagerie à l'échelle microscopique, certaines informations demeurent inaccessibles à l'échelle mésoscopique, en raison du champ de vue réduit. La vidéo-microscopie sans lentille, en plaçant directement les cellules vivantes sur un capteur numérique en regard d'une illumination cohérente selon le principe de l'holographie en ligne, a déjà fourni une réponse à cette problématique en culture 2D. Avec le développement des méthodes de culture en 3D, l'extension de la technique d'imagerie sans lentille à l'acquisition et la reconstruction 3D de la vie cellulaire constitue un nouveau défi. Nous avons développé un banc expérimental dédié à la tomographie diffractive sans lentille et étudiés des premières approches algorithmiques de reconstruction 3D sur des acquisitions de cellules prostatiques en 3D.

Abstract – The study of in vitro cell populations is a major concern for biologists in the realms of drug screening and oncology for example. With standard microscopy techniques, crucial information at the mesoscopic scale is still difficult to reach due to reduced field of view and complexity to monitor cell behaviors in real time over large periods of time. Lensfree video microscopy has already overcome these difficulties in the context of 2D cell biology. Based on the in-line holography principle, it puts cells directly between a coherent light source and a sensor allowing large field of view, e.g. 30 mm². With the growth of 3D cell cultures, the new challenging task is to extend this imaging technique to acquisitions and 3D reconstructions of cellular culture. For this purpose, we have developed an experimental optical bench dedicated to lensfree diffractive tomography and studied several 3D reconstruction algorithms on acquisitions of 3D prostatic cell cultures.

1 Introduction

Les expériences et études en biologie cellulaire sont traditionnellement mises en œuvre sur des modèles de cultures 2D réalisées sur un support solide en verre ou en plastique. Or ces modèles sont en inadéquation avec la réalité de la physiologie des tissus (structures 3D par essence), limitant la compréhension des processus biologiques, d'où le développement récent de la culture cellulaire en 3D [1, 2], où les cellules sontensemencées dans un gel spécial (MatrigelTM) dans lequel elles peuvent évoluer dans toutes les directions de l'espace.

Se pose alors la question de l'imagerie 3D de ce nouveau modèle biologique. La microscopie confocale classiquement utilisée pour visualiser les cellules est limitée par l'étape de fixation et de marquage qui tue les cellules, ce qui rend impossible la réalisation d'un suivi en temps réel. De plus, pour des applications de test systématique de principes actifs par exemple, ces approches ne disposent pas d'un champ d'observation suffisant pour visualiser un grand nombre d'objets en même temps, et donc d'obtenir des résultats quantitatifs significatifs.

L'imagerie sans lentille [1, 2, 3, 4, 5], basée sur les principes de l'holographie numérique en ligne [6, 7], peut être à même de passer ces difficultés :

- Possibilité d'acquérir des volumes de plusieurs mm³,
- Acquisitions en temps réel en incubateur,
- Simplicité de mise en œuvre et robustesse.

L'adaptation de la technique de vidéo-microscopie sans lentille

appliquée à l'imagerie de cultures cellulaires 3D constitue l'objet de cet article. Nous décrivons un banc optique possédant deux modalités d'acquisition et les différentes méthodes développées pour reconstruire en 3D des objets biologiques.

2 Matériel et méthode

2.1 Banc expérimental

Contrairement à l'imagerie sans lentille 2D où une seule projection suffit théoriquement à restituer l'objet 2D (cf. section 2.2), reconstruire un objet 3D à partir d'images acquises par cette même technique requiert de multiplier les angles d'éclairage. Pour se faire, nous avons mis en œuvre un banc expérimental dédié, illustré par la figure 1. Il est composé d'un éclairage semi-cohérent et d'un capteur grand champ (29,4 mm², pixels monochromes, 1,67 μm de côté).

L'optimisation des angles d'éclairage est liée aux contraintes des algorithmes qui seront développés et aux objectifs de simplicité et capacité visés. Ceci nous a amené à considérer deux modalités de tomographie différentes :

- Mode θ : l'éclairage et le capteur sont fixes, l'objet tourne sur lui-même. Cette géométrie est adaptée à un montage de type « scanner tomographique ».
- Mode φ : l'objet reste fixe et l'éclairage fixé sur un bras tourne autour. Cette géométrie sera la plus pertinente dans l'étude des cultures cellulaires, posées dans une boîte observée en transmission.

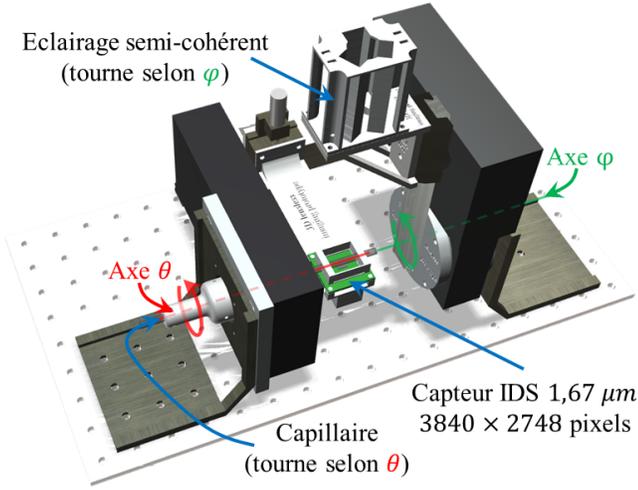


FIGURE 1 – Vue 3D du banc expérimental mettant en avant les deux modalités de rotation possibles : θ et φ .

2.2 Modèles de formation des images

Dans le cadre de l'imagerie sans lentille 2D, l'échantillon plan à estimer est modélisé par une fonction de transmission complexe $t(x, y) = |t|e^{i\varphi}$, où $|t(x, y)| < 1$ représente son coefficient d'absorption et $\varphi(x, y)$ le déphasage qu'il introduit dans l'onde complexe incidente U_{inc} .

Pour une onde incidente normalisée $U_{inc} = 1$, de longueur d'onde λ et se propageant orthogonalement au plan du capteur, l'onde résultante U_c située à une distance z est :

$$U_c = t * h_z \quad (1)$$

Avec $h_z = \frac{e^{2i\pi z}}{i\lambda z} e^{i\pi(x^2+y^2)/\lambda z}$ le noyau de Fresnel à la distance z . L'intensité de l'onde mesurée par le capteur est alors :

$$I_c = |U_c|^2 = |t * h_z|^2 \quad (2)$$

Bien que l'intégration de U_c sur le capteur ne nous donne que l'information sur son module, plusieurs méthodes existent pour retrouver la phase manquante. Dans ce papier, nous utilisons un algorithme basé sur une méthode de type restitution holographique [7], utilisant des acquisitions à différentes longueurs d'onde [8, 9].

En imagerie sans lentille 3D, l'onde totale U_{tot} en tout point $\vec{r} = (x, y, z)$ de l'espace derrière l'objet se modélise par [10] :

$$U_{tot}(\vec{r}) = U_{inc}(\vec{r}) + U_{dif}(\vec{r}) \quad (3)$$

Avec :

$$U_{dif}(\vec{r}) = \frac{-1}{4\pi} \int_{Objet} F(\vec{r}') U_{inc}(\vec{r}') \frac{e^{ik_0\|\vec{r}-\vec{r}'\|}}{\|\vec{r}-\vec{r}'\|} d^3r' \quad (4)$$

Où $k_0 = \frac{2\pi n_0}{\lambda}$ est le nombre d'onde dans le milieu d'indice n_0 dans lequel baigne l'échantillon à la longueur d'onde λ et F le potentiel diffractant relié à l'indice de réfraction complexe local $n(\vec{r})$ par la formule suivante :

$$F(\vec{r}) = -k_0^2 \left(\left(\frac{n(\vec{r})}{n_0} \right)^2 - 1 \right) \quad (5)$$

L'intensité I_c mesurée par le capteur à la distance z_c de l'objet s'écrit alors :

$$I_c = |U_{tot}|_{z=z_c}|^2 = \left| U_{inc} - \frac{1}{4\pi} (F \cdot U_{inc}) * h \right|_{z=z_c}^2 \quad (6)$$

Avec $h(\vec{r}) = \frac{e^{ik_0\|\vec{r}\|}}{\|\vec{r}\|}$. F constitue l'objet 3D à reconstruire.

2.3 Approches exploratoires de reconstruction

Nous avons exploré plusieurs pistes pour reconstruire l'objet 3D équilibrant coût calculatoire et mémoire, rapidité d'exécution et objectifs sur la qualité d'image souhaitée. L'une se base sur la cartographie de l'espace de Fourier de l'objet en prenant en compte les phénomènes de diffraction. La seconde les néglige, ne considérant que la transmission : une inversion de la transformée de Radon est alors employée.

2.3.1 Méthode 1 : cartographie de l'espace de Fourier 3D

La première approche utilise le théorème de diffraction de Fourier [10, 11] :

$$\hat{F}(K_x, K_y, K_z) = \frac{ik_z}{\pi} e^{-ik_z z} \hat{U}_{dif}(k_x, k_y; z_c) \quad (7)$$

Avec, $\begin{cases} K_x = k_x - k_0 p_0 \\ K_y = k_y - k_0 q_0 \\ K_z = k_z - k_0 m_0 \end{cases}$ et $k_z = \sqrt{k_0^2 - k_x^2 - k_y^2}$, où

(k_x, k_y) et (K_x, K_y, K_z) constituent respectivement les coordonnées dans l'espace de Fourier du détecteur et de l'objet, et (p_0, q_0, m_0) l'orientation de l'illumination (cf. fig.2). L'équation 7 découle de l'équation 4 pour une onde incidente U_{inc} plane et lorsque l'on fixe $z = z_c$, en sortie de l'objet, dans le sens de propagation des ondes [10]. Ainsi la transformée de Fourier 2D d'une projection se retrouve, moyennant une étape de filtrage, sur une calotte sphérique (surface 2D) à l'intérieur de l'espace de Fourier 3D de l'objet d'intérêt (cf. fig.2).

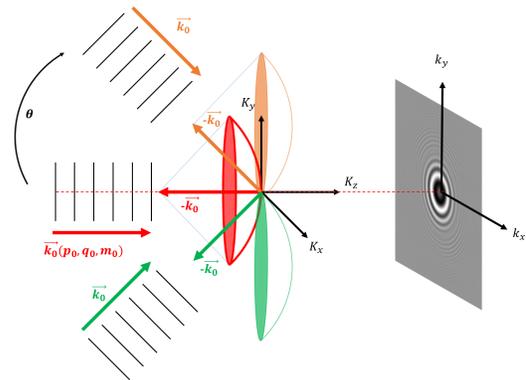


FIGURE 2 – Théorème de diffraction de Fourier : cartographie de l'espace de Fourier 3D de l'objet d'intérêt grâce aux transformées de Fourier des projections.

Dans notre cas, seul le module $|U_{tot}|$ est accessible dans nos mesures alors que l'équation 7 s'applique sur l'onde diffractée. En première approximation, une rampe de phase $e^{ik_0 \cdot \vec{r}}$ caractéristique de la propagation en onde plane incidente entre l'objet

et le capteur, est introduite :

$$U_{dif} \simeq |U_{tot}| e^{i\vec{k}_0 \cdot \vec{r}} - U_{inc} \quad (8)$$

Une partie du spectre fréquentiel 3D de l'objet peut ainsi être cartographiée, méthode classiquement mise en œuvre pour la reconstruction en microscopie tomographique diffractive [12, 13]. Les résultats des transformées de Fourier discrètes (FFT) des projections sont interpolés dans l'espace de Fourier 3D discret de l'objet. Enfin, une transformée 3D discrète inverse est appliquée pour retrouver l'objet :

$$F = \mathcal{F}_{3D}^{-1} \left(\mathcal{M} \left(\hat{U}_{dif} \left(\vec{k}_0^1 \right), \dots, \hat{U}_{dif} \left(\vec{k}_0^n \right) \right) \right) \quad (9)$$

Où \mathcal{M} représente l'opérateur cartographiant l'espace de Fourier 3D à l'aide des différentes projections aux orientations d'illumination $\left[\vec{k}_0^1, \dots, \vec{k}_0^n \right]$.

2.3.2 Méthode 2 : Inversion de la transformée Radon

La seconde approche fait l'approximation que les données sont des images d'absorption pure, similaire au cas de la tomographie X (mode θ de la figure 1). Un algorithme basé sur l'inversion de la transformée de Radon peut être utilisé, typiquement la rétroprojection filtrée (FBP [11]). Une pré-étape de reconstruction holographique à une distance z donnée est d'abord réalisée à l'aide d'un algorithme multi-longueurs d'onde décrit dans [9]. Cela a pour effet de focaliser en partie les hologrammes et de réduire les effets de diffraction (voir fig.4).

Dans les cas où l'échantillon est posé sur le capteur, seul l'éclairage peut tourner (mode φ de la figure 1). Dans ce cas, un pré-traitement permet de nous ramener à une géométrie de révolution du couple source/détecteur autour d'un axe fixe (type tomographie X). Il consiste en une projection sur un plan redressé tel qu'illustré sur la figure 3. La reconstruction holographique est effectuée après le redressement des images en prenant en compte l'évolution de la distance z avec l'angle φ .

3 Premières données et résultats

3.1 En mode θ

La figure 4 présente les acquisitions effectuées sur une aile d'insecte (de type culicidae) et la reconstruction associée via la méthode 2 (section 2.3.2). Les points de vue furent réalisés tous les 5° sur 360° . Des poils sur le bord de l'aile de l'ordre de $10 \mu m$ apparaissent dans le volume de plus de $4,5 mm^3$.

3.2 En mode φ

Les cultures cellulaires sur matrigelTM, se développant principalement à la surface du gel à l'interface avec le milieu de culture, conduisent à des structures à forte composante 2D et se prêtent donc bien à la méthode 2.

La figure 5 représente les données et la reconstruction 3D réalisées à partir de cellules de la prostate RWPE1 qui, posées sur du MatrigelTM, tendent à développer un réseau. Elle met en évidence les résultats obtenus à l'aide des deux méthodes 1 et 2 (voir 2.3.1 et 2.3.2).

La restriction des angles, limités dans cette configuration, entraîne une reconstruction plus résolue selon x et y qu'en z . Malgré cela, la répartition en z est bien visible. Notons la détection de quelques cellules hors du plan du matrigelTM. De plus, les irrégularités en z de la surface de matrigelTM qui n'est pas parfaitement horizontale apparaissent aussi.

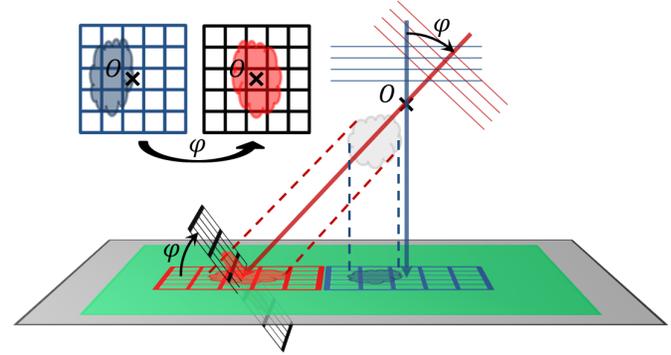


FIGURE 3 – Schématisation du redressement de l'image lors d'une acquisition avec un angle φ . Sur le quadrillage bleu, l'angle d'observation est normal, aucun redressement n'est nécessaire. En rouge, l'éclairage est de biais et l'ombre portée est étirée. Elle est redressée sur le quadrillage noir. Toutes les projections sont calculées à partir d'un axe passant par le point O autour duquel tournent virtuellement les projections.

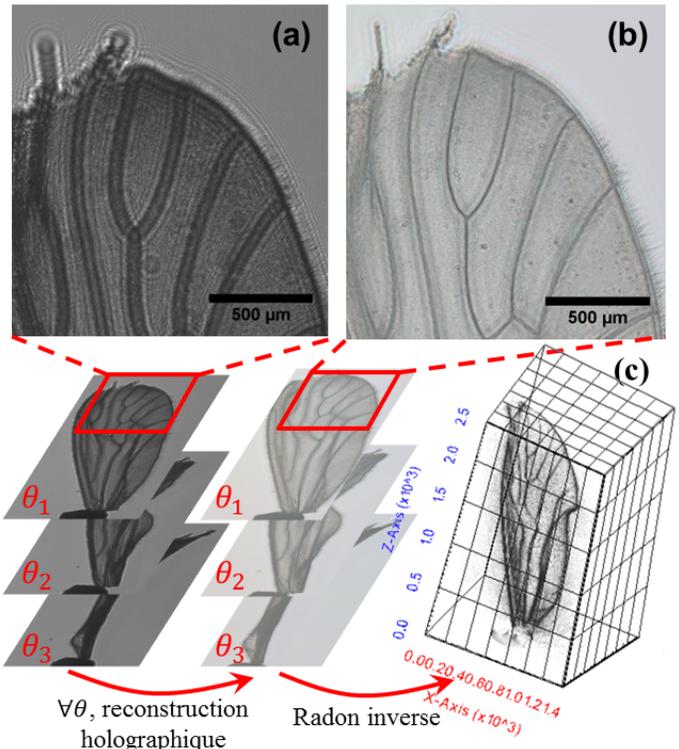


FIGURE 4 – Schématisation de la méthode 2 de reconstruction 3D. (a et b) Pour chaque angle de prise de vue, l'hologramme est reconstruit à la distance z de l'échantillon pour focaliser les taches de diffraction. Ici, l'objet à forte composante 2D était idéal pour tester cette méthode. (c) L'objet 3D est ensuite reconstitué par FBP pour chaque coupe.

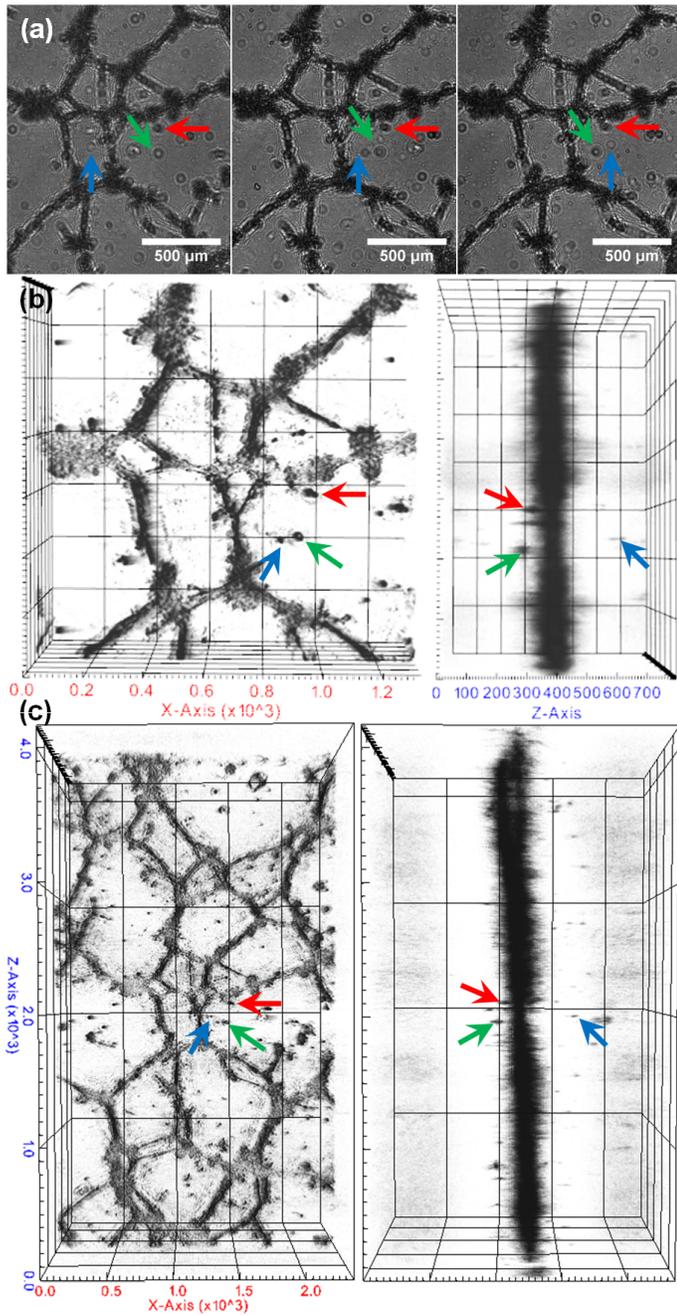


FIGURE 5 – Résultats d’une acquisition en mode φ . (a) Données brutes sur trois angles différents. Les flèches pointent sur des cellules hors du plan de la surface du matrigelTM et mettent en évidence la parallaxe des différents plans d’hologrammes où reposent les cellules. (b) Reconstruction 3D sur les plans $[X, Y]$ et $[Y, Z]$ via la méthode 1. (c et d) Reconstruction 3D sur les plans $[X, Y]$ et $[Y, Z]$ via la méthode 2.

4 Discussion et conclusion

Nos travaux présentent un démonstrateur d’une nouvelle technique de tomographie diffractive sans lentille pour la biologie cellulaire 3D. Se basant sur la technique d’imagerie sans lentille, issue des avancées en holographie numérique en ligne,

nous montrons qu’il est possible, en multipliant les angles de vue autour d’un objet d’intérêt, de reconstruire des volumes de plusieurs mm^3 . Nos approches préliminaires par inversion directe permettent donc d’observer des objets focalisés de l’ordre de la dizaine de microns, typiquement des cellules.

Par la suite, nos efforts se concentreront sur l’amélioration des algorithmes de reconstruction. Le problème s’apparente à un problème de reconstruction tomographique à faible nombre de projections et à couverture angulaire limitée, bien connu en tomographie à rayons X [14, 15], et également exploré en tomographie diffractive théorique [16]. Ce type de problèmes se traite généralement par approche inverse, requérant uniquement un modèle direct, ici donné par l’équation 6. Suite à de premiers essais, une régularisation de type L1 ou à conservation des bords, e.g. par variation totale [17], pour des objets pacimonieux semble prometteuse.

En outre, notre méthode se heurte au problème de la connaissance imprécise des paramètres géométriques de projection, e.g. l’axe de rotation. De plus, l’incertitude sur les positions et la non-planéité des interfaces entre l’air et le milieu de culture, et les changements d’indices associés influent sur la déformation des projections, entachant la précision du modèle de projection diffractive. Là encore l’approche inverse pourrait permettre une estimation conjointe de l’objet et des paramètres de recalage optimaux à appliquer aux projections.

Références

- [1] Dolega, M.E. & al. *Label-free analysis of prostate acini-like 3D structures by lens-free imaging*. Biosensor and Bioelectronics, 49, 176-183, 2013.
- [2] Allier, C. & al. *Video lensfree microscopy 2D and 3D culture of cells*. Proceedings SPIE, 8947, Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues XII, 89471H, 2014.
- [3] Repetto, L. & al. *Lensless digital holographic microscope with light-emitting diode illumination*. Optic Letters, 29(10), 1132-1134, 2004
- [4] Su, T. W. & al. *High-throughput lensfree imaging and characterization of a heterogeneous cell solution on a chip*. Biotechnology and bioengineering, 102(3), 856-868, 2009.
- [5] Kesavan, S. V. & al. *High-throughput monitoring of major cell functions by means of lensfree video microscopy*. Nature Scientific Reports, 4, n° 5942, 2014.
- [6] Gabor, D. *A new microscopic principle*. Nature, 161, 777-778, 1948.
- [7] Onural, L. & al. *Digital decoding of in-line holograms* Optical Engineering, 26(11), 1124-1132, 1987.
- [8] Fienup, J.R. *Phase retrieval algorithms : a comparison*. Applied Optics, 21(15), 2758-69, 1982.
- [9] Witte, S. *Lensless diffractive imaging with ultra-broadband table-top sources : from infrared to extreme-ultraviolet wavelengths*. Light Sci. Appl., vol. 3, no. 3, p. e163, Mar. 2014.
- [10] Wolf, E. *Three-Dimensional structure determination of semi-transparent objects from holographic data*. Optics communications, vol. 1, n° 14, pp. 153-156, 1969.
- [11] Kak, A., Slaney, M. *Principles of computerized tomographic imaging*. IEEE Press, 1988.
- [12] Sung, Y. *Optical diffraction tomography for high resolution live cell imaging*. Optics express, vol. 17, n° 11, pp. 266-277, 2009.
- [13] Haerlé, O. & al. *Tomographic diffractive microscopy : basics, techniques and perspectives*. Journal of Modern Optics, 2010.
- [14] Sidky, E.Y. & al. *Accurate image reconstruction from few-views and limited-angle data in divergent-beam CT* Journal of X-Ray Science and Technology, vol. 14, pp. 119-139, 2006.
- [15] Chen, G. & al. *Prior image constrained compressed sensing (PICCS) : A method to accurately reconstruct dynamic CT images from highly undersampled projection data sets*. Medical Physics, vol. 35, no. 2, pp. 660-663, 2008.
- [16] LaRoque, S.J. & al. *Accurate image reconstruction from few-view and limited-angle data in diffraction tomography*. Journal of the Optical Society of America A, vol. 25, no. 7, pp. 1772-1782, 2008.
- [17] Rudin, L.I. & al. *Nonlinear total variation based noise removal algorithms*. Journal of Modern Optics, 2010.