

MICROSCOPIE TOMOGRAPHIQUE DIFFRACTIVE ISOTROPE

Matthieu Debailleul, Hui Liu, Jonathan Bailleul, Bertrand Simon, Ludovic Foucault, Bruno Colicchio,
Olivier Haeberlé

Laboratoire MIPS, Université de Haute-Alsace

61 rue A. Camus, 68093 Mulhouse.

Contact : matthieu.debailleul@uha.fr

Résumé

La microscopie tomographique diffractive est une technique d'imagerie combinant imagerie en amplitude-phase par variation des conditions d'illumination, suivies d'une reconstruction numérique du spécimen observé. L'intérêt de cette approche, par rapport à la microscopie optique classique est double. L'information enregistrée est liée à la distribution des indices optiques complexes dans le spécimen observé, une quantité difficilement, voire non accessible en imagerie incohérente. De plus, cette approche permet de doubler la résolution par rapport à l'holographie. Cependant, cette technique souffre d'un défaut commun aux systèmes en transmission : l'OTF présente un cône manquant de fréquences, qui se traduit par une élongation de la réponse impulsionnelle optique, et donc une dégradation de l'image le long de l'axe longitudinal. Plusieurs solutions existent pour résoudre ce problème : numérique (reconstruction itérative sous contrainte) ou expérimentales (couplage transmission-réflexion, rotation de l'objet). Dans cet article, les principes de la tomographie diffractive, son lien avec l'holographie et ses limites en terme d'imagerie sont d'abord rappelés. Nous présentons ensuite le système de rotation de l'échantillon permettant de combiner la tomographie diffractive par balayage de l'illumination avec la rotation de l'échantillon. Cette technique a été appliquée à différents échantillons (biologie, matériaux) afin d'illustrer les avantages par rapport aux images obtenues en tomographie diffractive "classique".

Mot clés : *Holographie, compensation d'aberration, super résolution, imagerie tomographique, optique de Fourier et traitement du signal.*

1. Introduction

En microscopie classique, lors de l'utilisation d'un système d'illumination-détection incohérent (champ large, contraste de phase, DIC), l'image enregistrée résulte d'une interaction complexe entre l'illumination incohérente et le spécimen. Le contraste observé permet d'étudier efficacement la morphologie, mais ne donne pas directement d'information quantitative sur les caractéristiques sur ce spécimen. En particulier, la distribution d'indice complexe peut être difficile à reconstruire.

Pour surmonter ces problèmes, notamment en biologie, les techniques employées nécessitent souvent un marquage fonctionnel des échantillons (fluorescence, confocal, STED, PALM, NSIM...). L'imagerie basée sur les marqueurs fluorescents est aujourd'hui la technique de choix employée en imagerie microscopique, grâce à la grande variété de fluorophores développés et les résolutions atteintes. Le STED et le PALM ont notamment été récompensés par le prix Nobel en 2014.

Cependant, ces modes d'imagerie peuvent parfois poser des problèmes (phototoxicité, photoblanchiment, densité d'énergie importante) et pour les scientifiques ne pouvant utiliser ces systèmes, d'autres types de microscopie doivent être développés.

Parmi ces alternatives, l'enregistrement en phase et amplitude effectué en holographie permet de remonter à la carte de permittivité de l'objet sans traitement particulier de l'échantillon. Ainsi, il est possible d'obtenir l'indice de réfraction complexe en utilisant un modèle de diffraction adapté. Grâce à ses capacités d'imagerie cohérente, la microscopie holographique numérique fournit des informations pertinentes sur une large gamme d'échantillons transparents ou réfléchissants [1]. Elle présente plusieurs avantages comparée à l'imagerie incohérente, comme la possibilité de manipuler numériquement des fronts d'onde complexes (repropagation, corrections d'aberration, autofocus [2] etc.). Un des inconvénients est la résolution limitée en lumière cohérente [3].

Différentes solutions ont été développées pour contourner ce problème. Le spectre accessible peut être élargi en déplaçant le capteur et en combinant les différents hologrammes à différentes position de la caméra,

afin d'obtenir un hologramme synthétisé plus large, améliorant l'ouverture numérique [4]. Des systèmes de synthèse d'ouverture basés sur l'utilisation de réseaux pour décaler les fréquences objet ont été réalisés en 1D [5] et 2D [6]. Des systèmes à exposition unique utilisant un multiplexage spatial ont aussi été proposés. Ils utilisent une grille de sources et une addition incohérente de plusieurs hologrammes [7]. L'utilisation de sources basse cohérence ou un balayage en longueur d'onde, bien que moins efficaces, permettent également d'élargir le spectre acquis [8, 9].

Une autre possibilité est de décaler les fréquences spatiales enregistrées à l'aide d'un front d'onde incliné par rapport à l'objet, afin qu'elles passent dans la bande spectrale du système. La rampe de phase peut être obtenue soit en inclinant l'objet, soit en inclinant l'onde d'illumination.

Cette dernière possibilité est couramment utilisée en microscopie tomographie diffractive (MTD, [10, 11, 12, 13]) par balayage de l'illumination.

2. Principes et limites de la MTD

2.1. Principes

Le cadre théorique a été posé par Wolf [14]. Il repose sur la résolution de l'équation de propagation en milieu inhomogène :

$$(\Delta + k_0^2)\psi_d(r) = o(r)\psi(r) \quad (1)$$

L'objet, représenté ici par la fonction $o(r)$ (potentiel objet, lié à l'indice complexe) est illuminé par une onde plane, ici contenue dans l'onde totale $\psi(r)$ (illumination+diffractée). Le champ diffracté ψ_d est enregistré en phase et en amplitude.

Sous la première approximation de Born ($\psi_d \ll \psi$), Wolf obtient le modèle de diffraction suivant :

$$\psi_d(\vec{r}) = -\frac{1}{4\pi} \iiint o(\vec{r}') \exp(i\vec{k}_i \cdot \vec{r}') G(|\vec{r} - \vec{r}'|) d\vec{r}' \quad (2)$$

où l'onde diffractée ne dépend plus que de l'onde d'illumination et de l'objet. Cette simplification mène à une solution élégante dans l'espace de Fourier :

$$\widehat{\psi}_d(\vec{k}_d) \propto \widehat{O}(\vec{k}_d - \vec{k}_i)$$

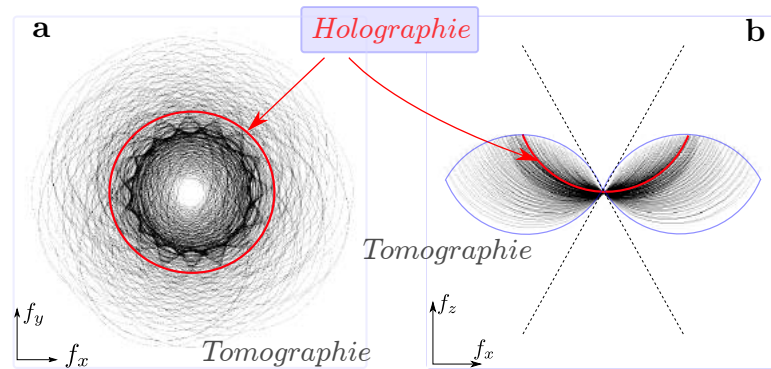


FIGURE 1: Fonction de transfert optique obtenue en tomographie diffractive par balayage angulaire de l'illumination. Coupe latérale (non centrée) (a) et longitudinale (b). Comparaison avec l'holographie.

Le spectre du champ diffusé $\widehat{\psi}$ est proportionnel au spectre objet \widehat{O} calculé en $\vec{k}_d - \vec{k}_i$. Autrement dit, l'ensemble des vecteurs d'onde diffractés \vec{k}_d forme la sphère d'Ewald, et le centre de cette sphère est décalée dans l'espace de Fourier par le vecteur d'onde d'illumination \vec{k}_i .

D'un point de vue pratique, différents hologrammes sont alors acquis avec différents angles d'illumination, menant à un remplissage de l'espace de Fourier avec les différentes sphères d'Ewald. Avec un nombre suffisant d'hologrammes et un balayage angulaire adapté, la taille du support spectral est doublée dans toutes les directions par rapport à l'holographie, et l'espace de Fourier est rempli (Fig. 1). La succession d'illuminations permet donc de construire un *condenseur virtuel*.

2.2. Dépasser les limites de la tomographie diffractive

Cependant, l'OTF finale présente un cône de fréquences manquant caractéristique (Fig. 1(b), pointillés), qui se traduit par une élongation des objets le long de l'axe longitudinal et donc une dégradation de la résolution suivant cet axe. Différentes solutions peuvent être envisagées pour remplir ce cône manquant. La plus directe est sans doute l'utilisation d'algorithmes itératifs avec contraintes pour la reconstruction [15]. Cependant, cette solution purement numérique nécessite des connaissances a priori sur l'objet. Elle rend également plus complexe et plus lente la reconstruction.

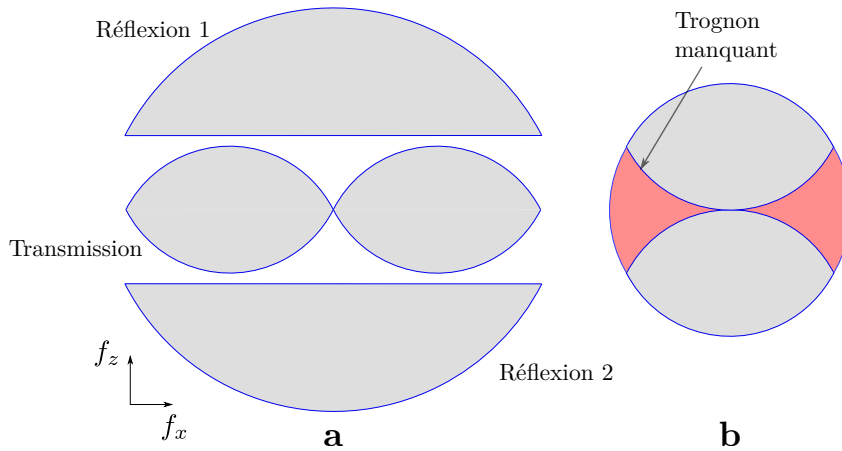


FIGURE 2: Fonctions de transfert optique obtenues en (a) tomographie par balayage en réflexion/transmission et (b) en rotation pure de l'objet.

Expérimentalement, des hautes fréquences peuvent être acquises grâce à une acquisition en réflexion. Néanmoins, la fusion avec les données de transmission est rendue difficile par l'absence de recouvrement des supports spectraux avec des objectifs standards, le recouvrement nécessitant des ouvertures numériques supérieures à 1,45. En outre, l'obtention d'un support symétrique nécessite trois acquisitions (deux en réflexion, et une en transmission), ce qui complexifie le montage expérimental.

Une solution plus évidente consiste à faire tourner l'objet autour d'un axe de rotation. Cette solution a déjà été appliquée en holographie ([16],[17]). Le support obtenu permet de combler en partie le cône manquant, mais la résolution latérale est diminuée par rapport à la tomographie par balayage de l'illumination. En outre, le support 3D présente également une zone vide de fréquences, car le balayage n'est effectué que selon un axe latéral. Cette zone manquante qui a la forme d'un trognon (*missing applecore* [18]) est obtenue par rotation autour d'un axe de la sphère d'Ewald (Fig. 2(b)). Enfin le remplissage de l'espace de Fourier nécessite un grand nombre de rotations, ce qui multiplie les traitements numériques pour la fusion des différents hologrammes.

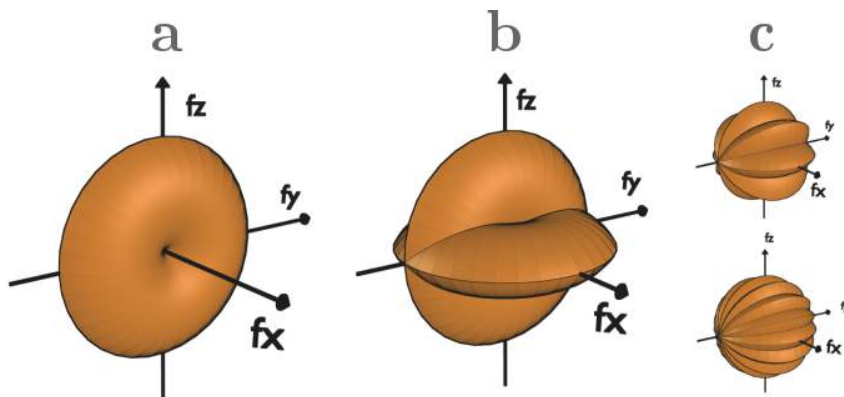


FIGURE 3: Fonctions de transfert optique obtenues pour un nombre croissant de rotations de l'objet (1, 2, 3 et 4 rotations)

Une dernière possibilité consiste à effectuer une acquisition en tomographie par balayage (MTD), puis à faire tourner l'objet. L'OTF 3D obtenue en MTD (Fig. 1) pivote dans l'espace de Fourier. Avec un nombre de rotations adéquat, ce procédé permet de conserver la résolution latérale doublée, tout en remplissant le cône manquant (Fig. 3). On obtient alors une *tomographie diffractive isotrope* en associant rotation de l'objet et balayage de l'illumination. Le nombre de rotations de l'objet permet de remplir plus ou moins l'espace de Fourier et d'améliorer la résolution après traitement et fusion des données (recalage spatial, normalisation en phase...). Le remplissage de l'espace de Fourier est donc bien plus rapide qu'avec une simple rotation de l'objet, et nécessite donc beaucoup moins de rotations de l'objet.

3. Tomographie diffractive isotrope

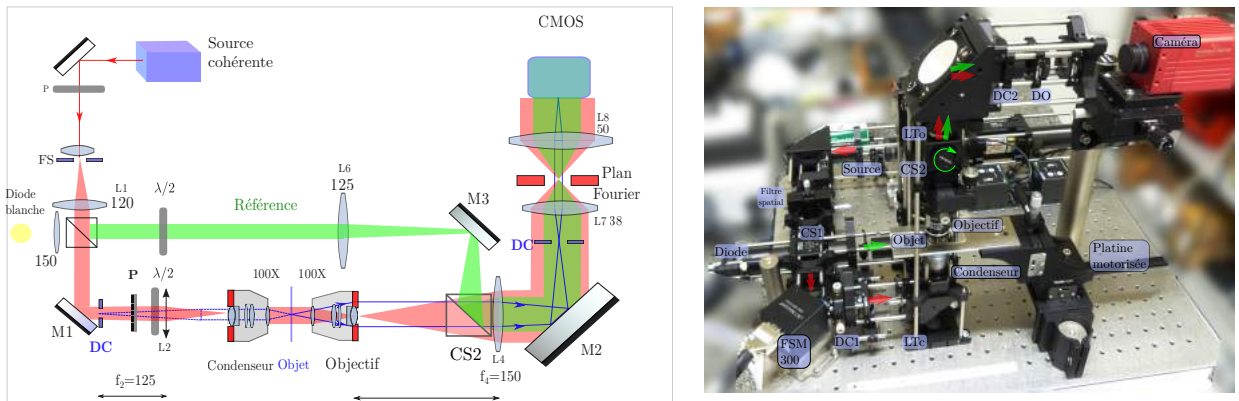


FIGURE 4: Schéma et photo avec platine standard du dispositif expérimental.

3.1. Dispositif expérimental en MTD : Interféromètre

L'acquisition en phase et en amplitude repose sur un interféromètre de type Mach Zehnder (Fig. 4) monté dans un système à cage. Une source cohérente est divisée par une cube séparateur en une onde d'illumination (rouge) et une onde de référence (vert). Le miroir M1 est un miroir sur membrane déplacée par quatre actionneurs (*voice coil actuator* ou *actionneur à bobine mobile*, FSM 300 Newport, $f_{max}=1$ kHz) qui assure le balayage angulaire de l'illumination. Un doublet de Plössl ($f=125$ mm) sert de lentille de balayage. Le premier objectif (X100, $NA=1,4$) est utilisé en tant que condensateur créant une onde plane sur l'objet. L'onde diffractée (bleu) est collectée par un deuxième objectif, de caractéristiques identiques. L'onde objet est recombinée avec l'onde de référence par le cube séparateur 2 (CS2), qui permet également le réglage de l'angle de hors-axe. Un doublet final permet de régler le grandissement et donc l'échantillonnage sur la caméra d'acquisition (Photonfocus MV1-D2048-96-G2-10, GigE, 90 fps@1024x1024). L'échantillon peut être déplacé grâce à la platine motorisée.

La vitesse d'acquisition des hologrammes est essentiellement limitée par la caméra, qui peut acquérir une centaine d'hologrammes par seconde. Si l'on envisage 300-400 hologrammes par tomographie, chaque image 3D est acquise en 3 à 4 secondes.

Les hologrammes subissent un prétraitement afin de corriger d'éventuelles aberrations ou d'éliminer les bruits de fond liés à l'imagerie cohérente [19, 20]. Les reconstructions d'images reposent sur les algorithmes déjà décrits par ailleurs ([10],[15]), utilisant l'approximation de Born ou de Rytov selon l'objet étudié.

3.2. Dispositif expérimental MTD-iso : système de rotation

Une rotation de l'objet d'un angle θ se traduit par une rotation du même angle de ce spectre. Pour effectuer cette rotation, l'échantillon est d'abord attaché à une fibre optique. La fibre est clivée puis trempée dans un polymère photopolymérisable. L'objet est alors collé à ce polymère, puis un faisceau UV est envoyé dans la fibre afin d'assurer la fixation.

Une platine a été spécialement conçue pour ce système (Fig. 5). Elle doit pouvoir accueillir la fibre, assurer une rotation minimisant les mouvements parasites (translation, précession) et s'adapter facilement au montage décrit précédemment. Le recalage des différents volumes 3D est assisté par la bibliothèque AIR, utilisée en imagerie IRM ou PET scan [21].

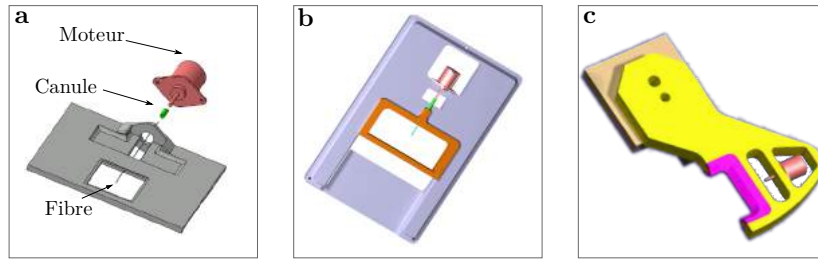


FIGURE 5: Évolution de la platine. Elle est articulée autour du moteur pas à pas, d'une canule et de la fibre supportant l'objet. La version (c) est adaptée au montage compact (Fig. 4) et peut s'interchanger facilement avec la platine standard.

3.3. Résultats

Cette technique permet donc d'obtenir une résolution isotrope de l'indice complexe (double volume : absorption et indice de réfraction). Ceci est illustrée sur la figure 6 qui détaille la carte d'indice de réfraction d'un jeune pollen de bouleau (*Betula pendula*) en haut, et des images d'absorption en bas. On peut remarquer la pointe polymérisée (en haut, à droite), sur la coupe xy .

La carte d'indice révèle la structure du pollen. L'exine, la double couche externe est composée de deux parois (interne, l'endexine et externe, l'extexine) séparées par le vestibule et ses 3 pores (amincissement de l'endexine). Ces parties sont composées d'éléments d'indice plus élevés comme la sporopollénine et la cellulose, alors que le vestibule est d'indice moins élevé. La structure interne révèle également des zones d'indice plus élevés.

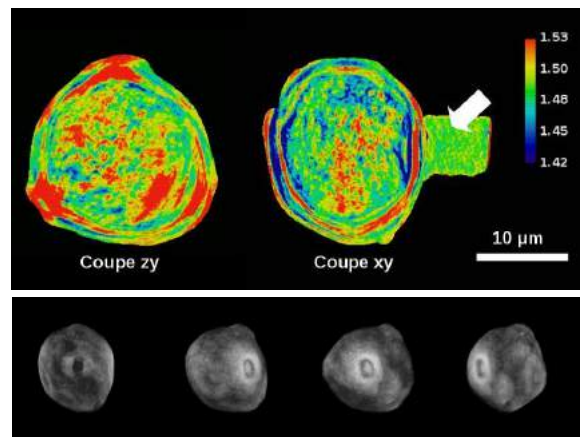


FIGURE 6: Pollen de bouleau observé par des coupes centrales dans les plans $x-y$ et $x-z$ (haut). Projection du maximum d'intensité pour différents angles de vue, à partir des images d'absorption (bas)

L'amélioration selon l'axe longitudinal est donc importante. En contrepartie, les contraintes de fusion de données des différentes acquisitions dégradent la résolution latérale, qui est légèrement inférieure à celle obtenue en MTD classique.

4. Conclusion

La microscopie tomographie diffractive isotrope est une évolution de la MTD, qui fournit les cartes d'indices et d'absorption 3D des échantillons. En associant tomographie par balayage angulaire de l'illumination et rotation de l'objet, elle permet de remplir le cône manquant de fréquence, et donc d'atteindre une résolution isotrope s'approchant de la résolution latérale obtenue en TDM.

Enfin, des extensions du système peuvent être envisagées : combinaison avec la fluorescence, imagerie spectrale ou encore système de rotation sans contact (pinces optiques).

Références

- [1] B. Kemper and G. von Bally, "Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection," *Applied Optics*, vol. 47, no. 4, pp. A52–A61, 2008.
- [2] F. Dubois, C. Schockaert, N. Callens, and C. Yourassowsky, "Focus plane detection criteria in digital holography microscopy by amplitude analysis," *Optics Express*, vol. 14, no. 13, pp. 5895–5908, 2006.
- [3] J. Goodman, *Introduction to Fourier optics*. McGraw-hill, 2008.
- [4] J. H. Massig, "Digital off-axis holography with a synthetic aperture," *Optics Letters*, vol. 27, no. 24, pp. 2179–2181, 2002.
- [5] C. Liu, Z. Liu, F. Bo, Y. Wang, and J. Zhu, "Super-resolution digital holographic imaging method," *Applied Physics Letters*, vol. 81, no. 17, pp. 3143–3145, 2002.
- [6] M. Paturzo, F. Merola, S. Grilli, S. De Nicola, A. Finizio, and P. Ferraro, "Super-resolution in digital holography by a two-dimensional dynamic phase grating," *Optics Express*, vol. 16, no. 21, pp. 17107–17118, 2008.
- [7] V. Mico, Z. Zalevsky, P. García-Martínez, and J. García, "Synthetic aperture superresolution with multiple off-axis holograms," *Journal of the Optical Society of America A*, vol. 23, no. 12, pp. 3162–3170, 2006.
- [8] G. Popescu, L. L. Goddard, P. S. Carney, T. Kim, R. Zhou, M. A. Mir, and S. D. Babacan, "White light diffraction tomography of unlabeled live cells," June 24 2014. US Patent App. 14/313,118.
- [9] F. Montfort, T. Colomb, F. Charrière, J. Kühn, P. Marquet, E. Cuche, S. Herminjard, and C. Depeursinge, "Sub-micrometer optical tomography by multiple-wavelength digital holographic microscopy," *Applied optics*, vol. 45, no. 32, pp. 8209–8217, 2006.
- [10] M. Debailleul, B. Simon, V. Georges, O. Haeberlé, and V. Lauer, "Holographic microscopy and diffractive microtomography of transparent samples," *Measurement Science and Technology*, vol. 19, no. 7, p. 074009, 2008.
- [11] B. Simon, M. Debailleul, V. Georges, V. Lauer, and O. Haeberlé, "Tomographic diffractive microscopy of transparent samples," *European Physical Journal. Applied Physics*, vol. 44, no. 1, p. 29, 2008.
- [12] Y. Sung, W. Choi, C. Fang-Yen, K. Badizadegan, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Optical diffraction tomography for high resolution live cell imaging," in *Novel Techniques in Microscopy*, Optical Society of America, 2009.
- [13] Y. Cotte, F. Toy, P. Jourdain, N. Pavillon, D. Boss, P. Magistretti, P. Marquet, and C. Depeursinge, "Marker-free phase nanoscopy," *Nature Photonics*, 2013.
- [14] E. Wolf, "Three-dimensional structure determination of semi-transparent objects from holographic data," *Optics Communications*, vol. 1, no. 4, pp. 153–156, 1969.
- [15] K. Kim, H. Yoon, M. Diez-Silva, M. Dao, R. R. Dasari, and Y. Park, "High-resolution three-dimensional imaging of red blood cells parasitized by plasmodium falciparum and in situ hemozoin crystals using optical diffraction tomography," *Journal of biomedical optics*, vol. 19, no. 1, pp. 011005–011005, 2014.
- [16] S. Vertu, J. Flügge, J.-J. Delaunay, and O. Haeberlé, "Improved and isotropic resolution in tomographic diffractive microscopy combining sample and illumination rotation," *Central European Journal of Physics*, vol. 9, no. 4, pp. 969–974, 2011.
- [17] W. Gorski and W. Osten, "Tomographic imaging of photonic crystal fibers," *Optics Letters*, vol. 32, no. 14, pp. 1977–1979, 2007.
- [18] S. Vertu, J.-J. Delaunay, I. Yamada, and O. Haeberlé, "Diffraction microtomography with sample rotation : influence of a missing apple core in the recorded frequency space," *Open Physics*, vol. 7, no. 1, pp. 22–31, 2009.
- [19] H. Liu, J. Bailleul, B. Simon, M. Debailleul, B. Colicchio, and O. Haeberlé, "Tomographic diffractive microscopy and multiview profilometry with flexible aberration correction," *Applied optics*, vol. 53, no. 4, pp. 748–755, 2014.
- [20] H. T. Liu, *Microscopie tomographique diffractive en réflexion et profilométrie multi-angles*. PhD thesis, Université de Haute-Alsace, 2014.
- [21] Téléchargeable librement sur <http://bishopw.loni.ucla.edu/AIR5/> (consulté en septembre 2016).