

ACTIVITES SCIENTIFIQUES

Amélioration de l'imagerie microscopique 2D et 3D

Bertrand SIMON

Mots clés : optique, instrumentation, microscopie de fluorescence, microscopie holographique, microscopie tomographique optique diffractive, synthèse d'ouverture, formation d'image, traitement d'image, fusion d'images, déconvolution, déconvolution multi-noyaux.

Thématique

Le microscope optique, en offrant des possibilités d'observation à l'échelle du micromètre, a suscité et suscite un vif intérêt. En biologie, l'utilisation de la microscopie de fluorescence permet le marquage de structures et de fonctions cellulaires spécifiques. Ces possibilités d'imagerie sont étendues grâce à la technique des coupes optiques sériées qui permet, après une reconstruction numérique, d'obtenir des images tridimensionnelles du spécimen.

Cependant, ces possibilités sont limitées par le pouvoir de résolution de l'instrument qui se comporte comme un filtre passe-bas. Il existe deux voies pour remédier à ce problème. La première consiste à agir du point de vue de l'instrumentation. On modifie ainsi le microscope et le processus de formation d'image. Une autre voie consiste à restaurer les images par un traitement numérique consistant à inverser ce processus par des algorithmes de déconvolution.

Le laboratoire MIPS de l'université de Haute-Alsace travaille sur la modélisation et la caractérisation instrumentale ainsi que sur les méthodes de déconvolution en microscopie de fluorescence depuis près de quinze ans.

Mes travaux s'inscrivent dans cette thématique en suivant ces deux approches.

Travaux de DEA :

Modèles de formation d'image et Microscopie Tomographique Optique Diffractive

Les images tridimensionnelles acquises en microscopie de fluorescence nécessitent d'être déconvoluées pour être exploitées au mieux. La déconvolution nécessite cependant de connaître la réponse impulsionnelle optique de l'instrument. Celle-ci peut-être calculée à l'aide de modèle prenant en compte les paramètres physiques du système. Néanmoins, ces modèles ne tiennent pas compte des propriétés optiques du spécimen observé.

Mon travail a tout d'abord consisté à adapter les modèles de formation d'image à quelques cas particuliers. On sait que le spécimen présente une distribution d'indice non homogène. Partant de ce constat, j'ai proposé une extension du modèle de formation d'image pour les milieux stratifiés simplifié aux cas biologiques pour un milieu à n interfaces qui tient compte de la variation d'indice au sein du spécimen. Nous avons ensuite considéré le cas d'un milieu présentant une interface courbe. Ceci devrait permettre d'étendre le modèle de formation d'image à un milieu non-homogène. La mise en oeuvre d'un tel modèle nécessite d'avoir accès à la distribution d'indice optiques au sein du spécimen.

Par conséquent, j'ai travaillé à l'étude d'un montage de microscopie tomographique optique diffractive qui permet de collecter cette distribution d'indices. Ces travaux se sont poursuivis durant ma thèse.

Travaux de Thèse:

Propositions de configurations instrumentales, méthodes numériques associées Microscopie Tomographique Optique Diffractive

Une première partie de mes travaux concerne l'amélioration de la résolution en microscopie de fluorescence à travers des propositions de configurations instrumentales permettant d'améliorer la résolution latérale. Ces propositions ont pu être évaluées et simulées au moyen des modèles de formation d'images développés au laboratoire. Les méthodes de restauration numériques que j'ai mises en oeuvre de façon adaptée aux montages proposés, prolonge les travaux réalisés dans l'équipe sur la déconvolution.

La deuxième partie de mes travaux part du constat que la non-homogénéité des propriétés optiques du spécimen sont négligées dans le processus de formation d'image en fluorescence et dans les algorithmes de déconvolution. Or l'utilisation sur les mêmes spécimens de techniques d'imagerie telle que la microscopie à contraste de phase montre que ceux-ci ne sont pas homogènes. Il en résulte que la réponse impulsionnelle varie en fonction de la zone d'observation au sein du spécimen.

Des algorithmes de déconvolution élaborés au laboratoire sont capables de prendre en compte la non-invariance de la réponse impulsionnelle. Pour fonctionner, ces algorithmes nécessitent d'avoir accès aux propriétés optiques du spécimen. C'est pourquoi le laboratoire a décidé de réaliser un montage de microscopie tomographique optique diffractive qui permet de mesurer la distribution d'indices optiques au sein du spécimen. Mon travail a alors consisté à réaliser ce montage expérimental.

Dans la pratique, le spécimen observé est successivement illuminé par une série d'ondes planes cohérentes dont on fait varier l'angle d'incidence. Pour chacune de ces incidences, l'onde diffractée par le spécimen est collectée par l'objectif du microscope puis est enregistrée dans l'espace de Fourier au moyen d'un interféromètre à décalage de phase et d'un capteur CCD. Les enregistrements successifs permettent de reconstruire un spectre étendu des fréquences par une technique analogue à la synthèse d'ouverture radar. A partir de ce support, il est possible de procéder à la reconstruction d'une image tridimensionnelle de l'objet.

Les résultats expérimentaux obtenus ont permis de mettre en évidence la capacité de ce montage à imager la distribution tridimensionnelle d'indices optiques complexes au sein du spécimen, ainsi que le gain en résolution obtenu vis à vis des techniques de microscopie holographique plus classiques. Enfin, le couplage de l'instrument avec la microscopie de fluorescence confocale m'a permis de montrer que les informations obtenues via les deux techniques d'imagerie étaient différentes et complémentaires.

Articles

- ♦ *Optical tomographic microscopy with fixed sample and variable directions of illumination*,
B. Simon, M. Debailleul, V. Georges, V. Lauer, O. Haeberlé,
IOP, Measurement Sciences and technologies (en correction)
- ♦ *Tomographic diffractive microscopy of transparent samples*,
B. Simon, M. Debailleul, V. Georges, V. Lauer, O. Haeberlé,
European physics journal, applied physics (accepté 17/10/2007)
- ♦ *Multi-kernel deconvolution applied to confocal fluorescence microscopy with engineered point spread function*,
B. Simon, O. Haeberlé,
Journal of the European Optical Society - Rapid publications, 06028, Vol 1 (2006)
- ♦ *Improving the lateral resolution in confocal fluorescence microscopy using laterally interfering excitation beams*,
O. Haeberlé and B. Simon,
Optics Communications, Volume 259, Issue 2, Pages 400-408, (2006).

Conférences avec actes

Pour les présentations orales comme pour les posters, le nom de la personne qui a présenté les travaux est inscrit en gras.

- ♦ *Biological samples observed with diffractive tomographic microscopy*,
B. Simon, M. Debailleul, V. Georges, O. Haeberlé and V. Lauer,
Photonics Europe 2008, EPE105, Strasbourg, April 7-11 2008,
Proceeding SPIE XXXXXX (2008)
- ♦ *Microscopie de fluorescence quantitative 3D et microscopie tomographique optique diffractive 3D*,
A. de Meyer, B. Simon, C. Cudel, B. Colicchio, V. Georges, M. Debailleul, A. Dieterlen, **O. Haeberlé**,
4^{ème} Colloque Interdisciplinaire en Instrumentation C2I, Nancy, 17-19 Octobre 2007,
J. Ragot et M. Robert Ed. (Hermès Lavoisier), pp. 419-426 (2007) ISBN 978-2-7562-1928-1
- ♦ *Tomographic microscopy of transparent samples*,
B. Simon, M. Debailleul, V. Georges, O. Haeberlé, V. Lauer,
Focus on Microscopy 2007, Tuesday April 10th - Friday April 13th, 2007, Valencia, Spain,
Technical digest of Focus On Microscopy 2007, p. 67 (2007)
- ♦ *Three-dimensional reconstruction of transparent specimens using coherent optical diffraction microtomography*,
B. Simon, M. Debailleul, V. Georges, O. Haeberlé and V. Lauer,
5th workshop on Physics in Signal and Image Processing, jan 31th - feb 2nd, 2007, Mulhouse, France,
Proceedings of PSIP'07 – CD-ROM ISBN 2-912328-40-3
- ♦ *Microscopie tomographique optique en lumière cohérente*,
B. Simon, M. Debailleul, V. Georges, O. Haeberlé and V. Lauer,
Méthodes et Techniques Optiques pour l'Industrie, Mulhouse, France, 20-24 novembre 2006,
CD-ROM disponible: http://www.simultane.com/cmoi/club/c_club.html
- ♦ *Improving the resolution with laterally interfering beams: application to confocal and 4Pi microscopy*,
O. Haeberlé and B. Simon, « Advanced Optical Imaging »,
Topical meeting of the European Optical Society, Imperial College London, 29 June - 1 July 2005.
- ♦ *Improving the 2-D resolution in fluorescence microscopy by non rotationally symmetric apodization and image recombination*,
O. Haeberlé and B. Simon,
IMVIE2 Symposium, Imaging for Medical and Life Sciences, Strasbourg (France),
Proceedings of the IMVIE2 symposium 2005, p. 3, March 1-3 (2005).
- ♦ *Improving the lateral resolution in fluorescence confocal microscopy using laterally interfering beams*, **O. Haeberlé**
and B. Simon,
Focus on Microscopy 2005, Jena (Germany),
Technical Digest of Focus on Microscopy 2005, p. 44, March 20-23, (2005).
- ♦ *The point spread function of optical microscopes imaging through a layered or an inhomogeneous medium*,
O. Haeberlé and B. Simon,
Photonics Europe 2004, EPE113, Strasbourg,
Proceeding SPIE 5462, p. 11, April 26-30 (2004).
- ♦ *The point spread function of fluorescence microscopes imaging through layered and inhomogeneous media*,
O. Haeberlé and B. Simon, Focus on Microscopy 2004 Philadelphia (USA),
Technical Digest of Focus on Microscopy 2004, p. 31. (2004)

Posters

- ♦ *Three-dimensional coherent optical diffraction tomography of transparent living samples*,
B. Simon, M. Debailleul, V. Georges, O. Haeberlé and V. Lauer,
6th IFAC Symposium on Modelling and Control in Biomedical Systems, Reims (France) Sept. 20-22, 2006.
Proceedings of the 6th MCBS IFAC symposium, p. 47 (2006)
- ♦ *Improvement of lateral resolution in fluorescence microscopy*,
B. Simon, R. Greget and O. Haeberlé,
IMVIE2 Symposium, Imaging for Medical and Life Sciences, Strasbourg (France),
Proceedings of the IMVIE2 symposium 2005, p. 31, March 1-3 (2005).

Conférence sans actes

- ♦ *Microscopie tomographique diffractive 3D*,
B. Simon, M. Debailleul, V. Georges, O. Haeberlé and V. Lauer,
Imvie3 instrumentation, Paris (France), 20-21 Juin 2006
- ♦ *Amélioration de la résolution latérale en microscopie de fluorescence confocale par interférence de faisceaux d'excitation décalés et excitation 2-couleurs 2-photons*, O. Haeberlé, **B. Simon**,
1^{ères} Journées Imagerie Optique Non Conventionnelle, Société Française d'Optique Paris, 14-15 mars 2005.
- ♦ *Évolutions de la microscopie 3D de fluorescence*,
A. Dierterlen, O. Haeberlé, B. Colicchio, **B. Simon** and S. Jacquay,
Cinquième Colloque National Optique pour le Diagnostic Médical, Paris, 11-13 Mai 2004.