

Protocole d'acquisition et algorithme associé pour une analyse grand champ de lames de tissus colorées par imagerie sans lentille

SOPHIE MOREL¹, LIONEL HERVÉ¹, ANTOINE DELON², THOMAS BORDY¹, OLIVIER CIONI¹, CATHERINE FROMENTIN³,
JEAN-MARC DINTEN¹, CÉDRIC ALLIER¹

¹Univ. Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France, CEA, LETI, MINATEC Campus, Technologies for Healthcare and Biology division, F-38054 Grenoble, France

²Laboratoire Interdisciplinaire de Physique, Université Grenoble 1

³Laboratoire d'anatomocytopathologie, Centre Hospitalier Schaffner, Lens

Sophie.Morel@CEA.fr, Cedric.Allier@CEA.fr,

Résumé - Nous décrivons une nouvelle méthode d'imagerie sans lentille et un algorithme dédié qui permet d'obtenir des images couleurs grands champs (9.7 mm²) de lames de tissus cellulaires. Et ce sans avoir à multiplier le nombre d'acquisitions, méthode récemment utilisée pour pouvoir reconstruire des échantillons à très fortes densité cellulaire. Dès lors, le temps de calcul nécessaire à la reconstruction holographique est drastiquement diminué de l'ordre de 0.4 s/mm² au lieu de typiquement 4.5 minute/mm². Cette avancée permet d'envisager l'utilisation l'imagerie sans lentille pour l'acquisition des lames de tissus colorés utilisées en anatomopathologie.

Abstract - We describe a new lensfree imaging setup and a dedicated algorithm which allows to obtain color images of large areas (9.7 mm²) of colored tissue slides. And this can be obtained without having to increase the number of acquisitions, method recently used to be able to reconstruct the image of samples with very high cell density. As a result the computation time required for the holographic reconstruction is drastically decreased in the order of 0.4 s/mm² instead of typically 4.5 minute / mm². This advance allows to consider the use of lensfree imaging for the acquisition of colored tissue slides used by the anatomopathologists.

1 Introduction

La microscopie résulte toujours d'un compromis entre champ observé et résolution spatiale. Et depuis vingt ans, les développements de la microscopie se sont concentrés sur la réalisation de la super-résolution qui atteint aujourd'hui des résolutions limite de 10 nm [1] mais ceci sur des champs de seulement quelques μm^2 . À l'opposé, depuis quelques années, l'imagerie sans lentille [2] se concentre sur l'obtention d'images grand champ de plusieurs mm² mais avec une résolution de 0,5 à 3 μm , ce qui reste suffisant pour un grand nombre d'applications. Ceci permet, par exemple, d'observer simultanément des milliers de cellules et de fournir une statistique inégalée [3]. La technique de l'imagerie sans lentille se base sur l'holographie en ligne inventée par Gabor [4]. Un échantillon biologique est éclairé par une lumière cohérente et le module de l'onde diffractée par l'objet est enregistré par un capteur distant de l'objet. Les développements récents des capteurs numériques et des moyens de calculs permettent d'en réaliser maintenant le potentiel. Avec des capteurs CMOS dont les pixels avoisinent le micromètre en taille, il est désormais possible de résoudre des objets micrométriques sur un grand champ (>20 mm²), ouvrant la voie à de nombreuses applications en diagnostic [6-9]. La méconnaissance de la phase du champ diffracté mène à des artefacts de reconstruction dénommés couramment 'twin-image', qui peuvent être réduits par

des algorithmes itératifs basés sur la détection du support de l'objet dans le cas d'échantillons de faible densité cellulaire ('phase-retrieval', [5,10]).

2 Banc expérimental

Notre système est basé sur la technique d'imagerie sans lentille précédemment décrite [6] modifiée pour l'imagerie couleur des lames de tissus. L'acquisition de l'image est réalisée avec un capteur CMOS Omnivision 5647 RGB (2592 × 1944 pixels, 1,4 μm pixel pitch, champ observé de 3.6×2.7=9.7 mm²). Le filtre infrarouge est retiré du capteur pour que l'échantillon puisse être placé à environ 300 μm du capteur. L'éclairage comporte une LED quadrant Cree MC-E RGB émettant à 450-465 nm, 520-535 nm, et 620-630 nm, couplé à un diffuseur 40 ° (LSD Luminit) et un diaphragme de 150 μm (Thorlabs P150S).

Toutefois, dans le cas d'échantillons de fortes densités cellulaires (par exemple 1000 cellules au mm²), les algorithmes standards sont inapplicables, ce qui mène à des reconstructions fortement dégradées. Le groupe d'Ozcan à UCLA a étudié cette problématique et a finalement réussi à obtenir des images d'échantillons très denses, des images de frottis et de lames de tissus [11-13]. La solution employée consiste à multiplier le nombre d'acquisitions et à utiliser une autre classe

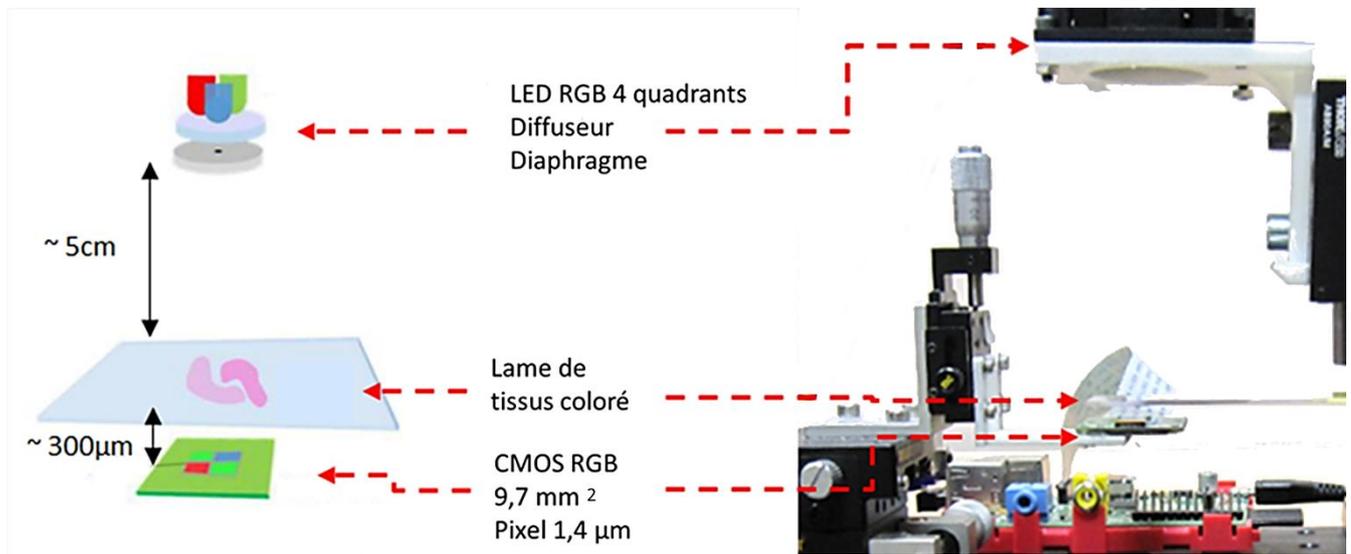


Fig. 1. Schéma de principe du banc optique et photo du montage.

d'algorithmes d'extraction de phase [10,14] qui donnent de meilleurs résultats. Par exemple dans [13], une image de 20 mm² d'une lame de tissu coloré a été reconstruite à partir d'un jeu de 288 images obtenues au moyen de platines XYZ. Le temps total d'acquisition n'est pas indiqué par les auteurs [13], mais le temps de calcul nécessaire pour effectuer la reconstruction holographique est de l'ordre de 90 minutes (4,5 minutes par mm²). Un tel temps de restitution de l'image n'est pas compatible avec des applications cliniques. En outre, une seule longueur d'onde est utilisée et les informations de couleur sont obtenues indirectement par conversion de l'image niveaux de gris en une image RGB. En résumé, si le défi de l'imagerie sans lentille des tissus a été surmonté dans [11-13], il n'est pas encore possible de l'appliquer en un temps raisonnable. Il reste à trouver une méthode d'imagerie sans lentille permettant l'acquisition ultra grand champs (70×25 mm²) des lames de tissus en vraies couleurs et dans un délai raisonnable de quelques minutes.

Pour ce faire nous présentons ici une nouvelle méthode qui se base sur l'obtention d'une image unique en RGB associée à un nouvel algorithme de reconstruction itératif. Cette méthode permet d'obtenir des images RGB de 9.7 mm² avec un temps de reconstruction qui ne dépasse pas 4 secondes sur GPU, pour une image de 1944x2592 pixels et une résolution spatiale de quelques micromètres.

3 Problème inverse

3.1 Notations

α est l'amplitude complexe de l'onde lumineuse, A est l'amplitude complexe normalisée de l'onde lumineuse, m est le module de A , φ est la phase de A , I est l'intensité de l'onde lumineuse ($I=|\alpha|^2/A^2$), h est la

transformée complexe de Fresnel qui décrit la propagation lumineuse, λ la longueur d'onde, \vec{r} les coordonnées radiales et z la coordonnée axiale. On définit par $z=0$ le plan de l'échantillon et $z=Z$ le plan du détecteur. La Fig. 2 illustre la plupart des notations utilisées. Par exemple A_Z^λ correspond à l'amplitude normalisée au niveau du plan $z=Z$ fonction des coordonnées radiales \vec{r} et de la longueur d'onde λ .

3.2 Théorie

En faisant l'hypothèse d'un échantillon mince (quelques microns) de transmission $A_0^\lambda(\vec{r})$ éclairé par une onde plane d'amplitude, l'amplitude sortant de l'échantillon est donné par $\alpha_0^\lambda(\vec{r}) = \alpha^\lambda \cdot A_0^\lambda(\vec{r})$. $A_0^\lambda(\vec{r})$ s'interprète donc comme la transmission de l'onde incidente sur l'échantillon. C'est l'inconnue du problème que l'on cherche à reconstruire.

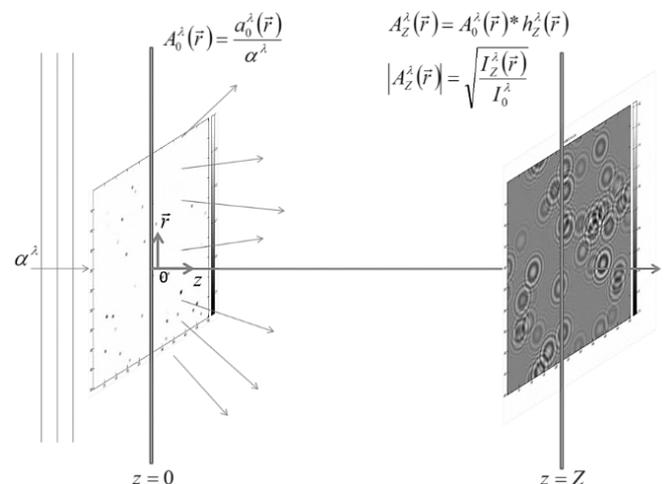


Fig. 2 : Schéma de principe et conventions de notations. Le capteur se situe dans le plan $z=Z$ et l'objet dans le plan $z=0$.

En utilisant le principe de Huygens-Fresnel, l'amplitude au niveau du plan du détecteur est donné par:

$$\alpha_Z^\lambda(\vec{r}) = \alpha^\lambda \cdot A_0^\lambda(\vec{r}) * h_Z^\lambda(\vec{r})$$

$$h_Z^\lambda(\vec{r}) = \frac{i}{\lambda Z} \exp\left(i \frac{2\pi Z}{\lambda}\right) \cdot \exp\left(i\pi \frac{|\vec{r}|^2}{\lambda Z}\right) \quad (1)$$

L'intensité lumineuse enregistrée par le capteur est donc

$$I_Z^\lambda(\vec{r}) = |\alpha^\lambda|^2 \cdot |A_0^\lambda(\vec{r}) * h_Z^\lambda(\vec{r})|^2 \quad (2)$$

En définissant $I^\lambda = |\alpha^\lambda|^2$ l'intensité mesurée en l'absence d'échantillon, on obtient la relation pour le module $m_Z^\lambda(\vec{r})$ de $A_Z^\lambda(\vec{r})$:

$$m_Z^\lambda(\vec{r}) = |A_Z^\lambda(\vec{r})|^2 = \sqrt{\frac{I_Z^\lambda(\vec{r})}{I^\lambda}} \quad (3)$$

Deux remarques:

1/ La mesure $m_Z^\lambda(\vec{r})$ donne uniquement accès au module de $A_Z^\lambda(\vec{r})$. Si la phase était connue il serait possible de calculer la transmission de l'objet simplement par la convolution $A_0^\lambda(\vec{r}) = A_Z^\lambda(\vec{r}) * h_{-Z}^\lambda$ car $h_{-Z}^\lambda * h_Z^\lambda = \delta$

2/ Pour chaque phase $\varphi_Z^\lambda(\vec{r})$, $A_Z^\lambda(\vec{r}) = m_Z^\lambda(\vec{r}) \exp\left(i\varphi_Z^\lambda(\vec{r})\right)$ est compatible avec la mesure mais cette variété de phase introduit une infinité de solution pour l'échantillon compatible avec les mesures :

$$A_0^\lambda(\vec{r}) = A_Z^\lambda(\vec{r}) * h_{-Z}^\lambda \quad (4)$$

L'algorithme consiste à trouver un jeu d'amplitudes dans la plan objet $A_0^\lambda(\vec{r})$, compatible avec les acquisitions $m_Z^\lambda(\vec{r})$, sachant que ces amplitudes ont des formes communes aux différentes longueurs d'ondes. Ceci est réalisé à l'aide de l'algorithme à bascule schématisé sur la figure 3 où l'on force l'attache aux données dans le plan de détection (initialisation et étape 5), puis l'on renforce l'information commune des amplitudes dans le plan objet (étape 3). Ici 20 itérations ont été utilisées.

Pour renforcer l'information commune des trois champs complexes objet $A_0^\lambda(\vec{r})$, la constatation suivante a été dressée :

chacun de ces champ se compose d'une partie « vraie » commune aux trois longueurs d'ondes, et d'une partie « twin » qui diffère car elle s'apparente à des anneaux de diffraction dont l'espacement dépend de la longueur d'onde. Ainsi, la simple moyenne de ces champs (opération de l'étape 3) tend à conserver la partie « vraie » et à gommer la partie « twin ». Sans cette étape, l'algorithme aurait traité les acquisitions aux trois longueurs d'onde comme indépendantes.

4 Résultats sur lame d'anatomopathologie

Un exemple de résultat de reconstruction du champ objet (modules et phases) est illustré sur la figure 4, pour le cas d'un échantillon dense anatomopathologique coloré en HES (Hematoxyline Eosine Safran) d'une lame de colon. Les trois reconstructions (1 par longueur

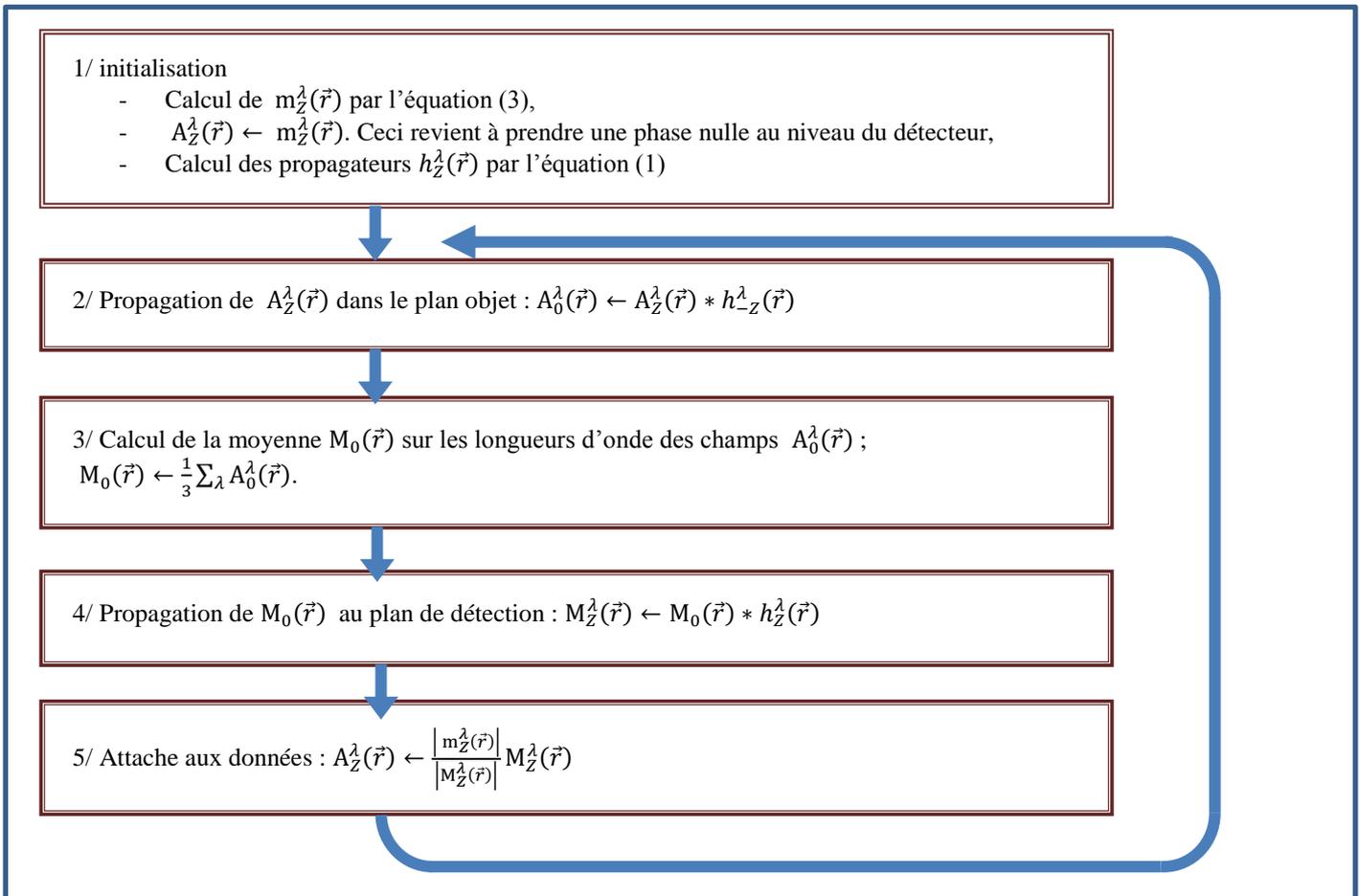
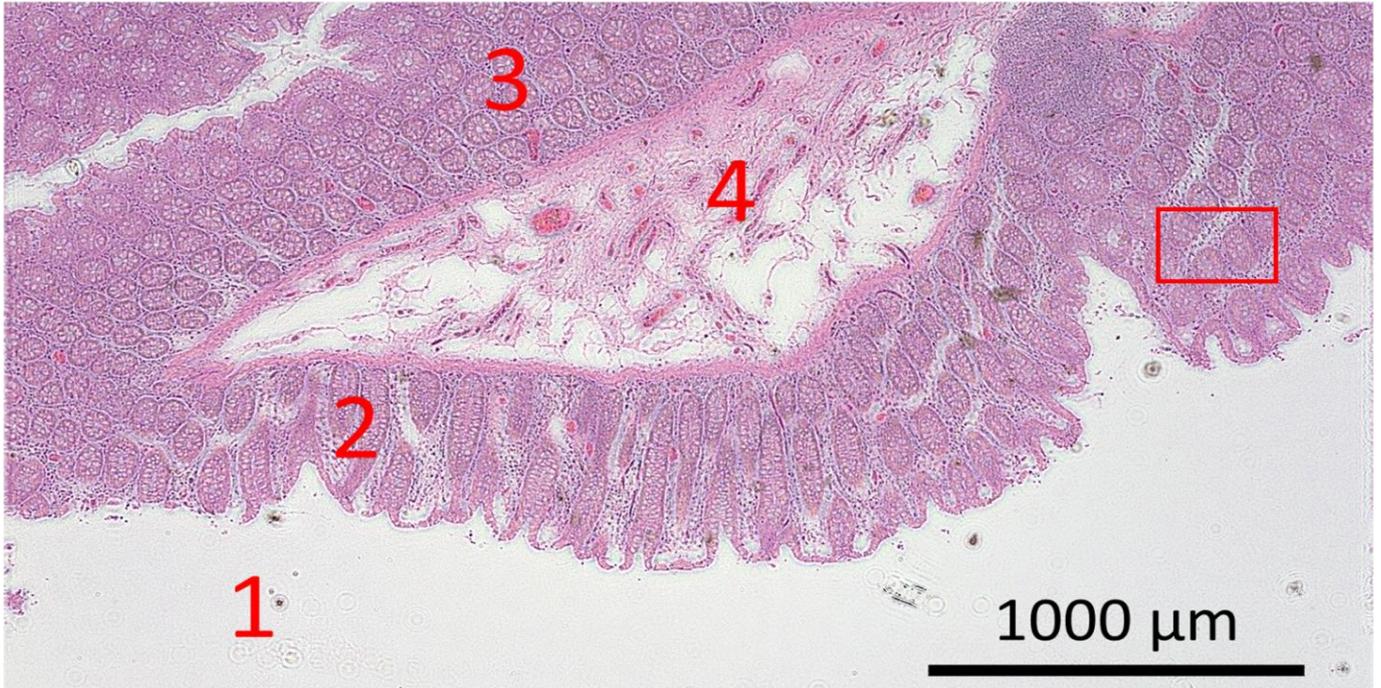
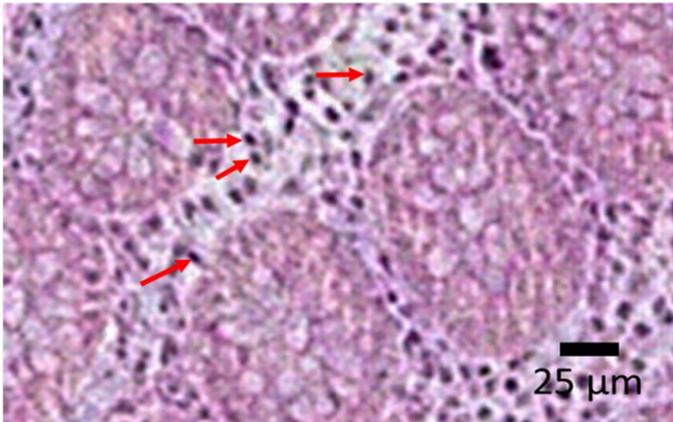


Fig. 3 : Algorithme utilisé pour reconstruire un objet $A_0^\lambda(\vec{r})$ donnant les mesures holographiques $I_Z^\lambda(\vec{r})$ et vérifiant une forte corrélation d'une longueur d'onde à l'autre

a)



b)



c)

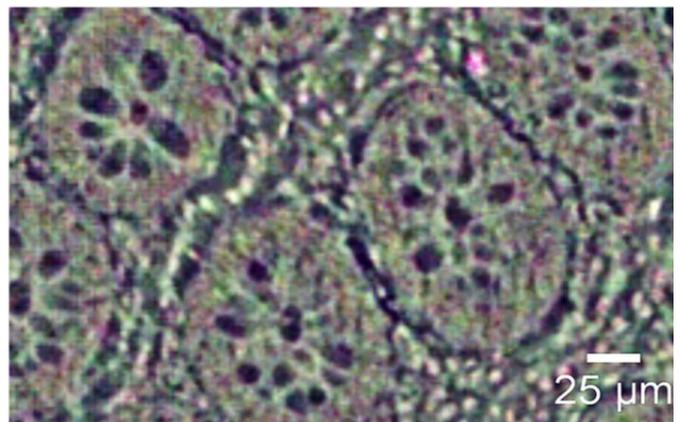


Figure 4a) Module reconstruit grand champ d'une lame anapathologique de colon. Coloration HES. 1 La lumière du tube digestif. 2 La muqueuse intestinale avec 3 les glandes intestinales. 4 La sous-muqueuse. b)c) Détail de a), respectivement module et phase. Les flèches rouges pointent sur les noyaux.

d'onde) sont utilisées pour générer des images couleurs RGB. L'image des modules, qui correspond à la transmission de l'objet, couvre un champ de 9.7 mm², ce qui permet de visualiser en une seule acquisition différentes structures de l'organe (Figure 4a). En zoomant dans l'image reconstruite, l'opérateur peut reconnaître des détails tels que les glandes intestinales (Figures 4b et 4c). La résolution spatiale des images reconstruites (2-3μm) permet de visualiser les noyaux des cellules (flèches rouges Figure 4b). L'image de la phase de ces mêmes noyaux est illustrée en Figure 4c.

5 Conclusion

En résumé nous avons décrit une nouvelle méthode d'imagerie sans lentille qui permet l'acquisition et la reconstruction holographique de tissus colorés sans recourir à un grand nombre d'acquisitions. Le nouvel algorithme itératif de reconstruction holographique ne nécessite qu'une seule image par canal de couleur, ce qui permet de restituer des images couleur de plusieurs mm² en quelques secondes seulement.

6 References

- [1] Orri, M. (2014). Nobel Prize in Chemistry: Celebrating optical nanoscopy. *Nature Photonics*.
- [2] A. Greenbaum, W. Luo, T. W. Su, Z. Göröcs, L. Xue, S. O. Isikman, A. F. Coskun, O. Mudanyali, and A. Ozcan, "Imaging without lenses: achievements and remaining challenges of wide-field on-chip microscopy," *Nat. Methods*, vol. 9, pp. 889–895, 2012.
- [3] Kesavan, S. V., Momey, F., Cioni, O., David-Watine, B., Dubrulle, N., Shorte, S., ... & Allier, C. (2014). High-throughput monitoring of major cell functions by means of lensfree video microscopy. *Scientific reports*, 4.
- [4] D. Gabor, "Microscopy by Reconstructed Wave-Fronts", *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences* Vol. 197, No. 1051 (Jul. 7, 1949), pp. 454-487
- [5] Fienup, J.R. "Phase retrieval algorithms: a comparison," *Applied optics*, vol. 21, no. 15, pp. 2758–69, Aug. 1982.
- [6] T.-W. Su, S. Seo, A. Erlinger, and A. Ozcan, "High-throughput lensfree imaging and characterization of a heterogeneous cell solution on a chip," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 102, no. 3, pp. 856–68, Feb. 2009.
- [7] S. Seo, T.-W. Su, D. K. Tseng, A. Erlinger, and A. Ozcan, "Lensfree holographic imaging for on-chip cytometry and diagnostics," *Lab Chip*, vol. 9, no. 6, pp. 777–87, Mar. 2009.
- [8] P. Allier and A. Ozcan, "Wide-field optical detection of nanoparticles using on-chip microscopy and self-assembled nanolenses," no. January, 2013.
- [9] C. P. Allier, G. Hiernard, V. Poher, and J. M. Dinten, "Bacteria detection with thin wetting film lensless imaging," *Biomed. Opt. Express*, vol. 1, no. 3, pp. 762–770, Jan. 2010.
- [10] C. Fournier, T. Fournel, and C. Ducotet, "Twin-image noise reduction by phase retrieval in in-line digital holography," 2005.
- [11] A. Greenbaum, U. Sikora, and A. Ozcan, "Field-Portable Pixel Super-Resolution Microscopy of Dense Samples using Lensfree Holograms Recorded at Multiple Heights," vol. 1, no. c, pp. 4–6, 2012.
- [12] A. Greenbaum, A. Feizi, N. Akbari, and A. Ozcan, "Wide-field computational color imaging using pixel super-resolved on-chip microscopy," vol. 21, no. 10, pp. 12469–12483, 2013.
- [13] A. Greenbaum, Y. Zhang, A. Feizi, P. Chung, W. Luo, S. R. Kandukuri, and A. Ozcan, "Wide-field computational imaging of pathology slides using lens-free on-chip microscopy," vol. 6, no. 267, 2014.
- [14] L. J. Allen and M. P. Oxley, "Phase retrieval from series of images obtained by defocus variation," vol. 199, no. November, pp. 65–75, 2001.