

MICROSCOPIE DE BIREFRINGENCE A BALAYAGE LASER ET PLEIN CHAMP PAR CODAGE SPECTRAL DE LA POLARISATION

Hugo Lavie¹, Xavier Theillier², Sylvain Rivet¹, Matthieu Dubreuil¹ and Yann Le Grand¹

¹Univ Brest, Laboratory of Optics and Magnetism OPTIMAG UR 938, F-29200 Brest, France

²Department of Physics and Bernal Institute, University of Limerick, V94 T9PX Limerick, Ireland

hugo.lavie@univ-brest.fr

RÉSUMÉ

Nous présentons une méthode basée sur le codage spectral de la polarisation permettant d'accéder avec une sensibilité optimale à la biréfringence d'un échantillon en un temps compatible avec la microscopie à balayage laser. Ce concept est étendu à la microscopie plein champ associée à une caméra hyperspectrale.

MOTS-CLEFS : *polarisation, biréfringence, microscopie, tissus biologiques*

1. INTRODUCTION

La microscopie de biréfringence permet de révéler sans marquage des arrangements macromoléculaires possédant un certain degré d'ordonnement dans les tissus biologiques. Il est ainsi possible de mettre en évidence les protéines fibreuses de la matrice extracellulaire ou encore le cytosquelette des cellules. Cependant, révéler des structures peu denses en microscopie de biréfringence s'avère difficile. De nouvelles méthodes plus sensibles garantissant un temps d'acquisition court sont donc recherchées.

Nous avons récemment développé une méthode de mesure de la retardance linéaire d'un échantillon, basée sur le codage spectral de la polarisation sur quasi-fond noir, dont la résolution est d'environ 10 μ rad pour un temps d'acquisition de 10 μ s [1]. Le codage spectral de la polarisation consiste à encoder la retardance linéaire dans des modulations spectrales produites par des lames de phase d'ordre élevé. Le principe du quasi-fond noir, c'est-à-dire proche de l'extinction, autorise une puissance lumineuse importante au niveau de l'échantillon, ce qui rend la mesure plus sensible, comparativement aux approches de Stokes ou de Mueller qui sont exhaustives.

La méthode développée dans [1], basée sur l'utilisation d'une source laser à balayage rapide en longueur d'onde, permet la mesure de la retardance linéaire et de l'azimut en une durée correspondant au temps de balayage en longueur d'onde de la source, ici 10 μ s. Cette durée, compatible avec le temps de résidence par pixel en microscopie à balayage laser classique, permet l'imagerie de biréfringence en « temps réel » [2]. Cependant, ce principe n'est pas directement transposable à l'imagerie plein champ. Nous avons donc exploré une alternative consistant à utiliser une source large bande associée à une caméra hyperspectrale afin d'obtenir les modulations spectrales nécessaires à la mesure de la retardance et de l'azimut [3].

Nous présentons dans ce travail les résultats de la mise en œuvre de ces 2 dispositifs (balayage laser et plein champ) en microscopie à transmission.

2. DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX

Le dispositif pour l'imagerie à balayage laser a été implémenté sur un microscope de type confocal [2]. Il consiste en une source à balayage rapide en longueur d'onde centrée à 1060nm et un dispositif de codage spectral de la polarisation utilisant des polariseurs linéaires, des lames de phase d'ordre élevé dans un rapport d'épaisseur entier et des lames quart d'onde. Le détecteur est une photodiode à avalanche. Cette méthode permet de mesurer la retardance et son azimut point par point à la cadence de balayage en longueur d'onde de la source (100kHz) et donc de former des images de biréfringence à la cadence de balayage du microscope (\approx 1Hz), comme dans le microscope de Mueller à balayage que nous avons développé il y a quelques années [4]. Le principe du quasi-fond noir

consiste à désaligner légèrement une des lames de phase d'un petit angle de biais afin de s'éloigner de la configuration d'extinction. On produit aussi une réponse linéaire en biréfringence, amplifiée par cet angle de biais et exploitant toute la dynamique du photo-détecteur.

Le dispositif pour l'imagerie plein champ a été implémenté sur un microscope en champ large équipé d'une source blanche à filament de tungstène. Le dispositif de codage spectral est quasiment identique à celui du microscope à balayage mais diffère pour s'adapter à la gamme spectrale d'analyse. La caméra hyperspectrale permet l'acquisition d'images sur la gamme 400-1000nm dans 300 canaux spectraux.

3. RESULTATS

Après la présentation des dispositifs expérimentaux et du traitement nécessaire la reconstruction des images, nous présenterons des images acquises avec les deux configurations (balayage et plein champ) sur différents échantillons.

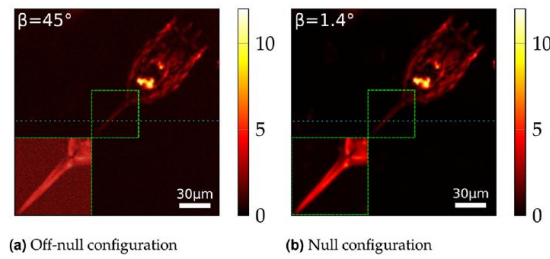


Fig. 1 : Images de retardance linéaire obtenues avec le microscope à balayage d'un rotifère en configuration (a) fond clair (type Stokes ou Mueller) et (b) quasi-fond noir [2]. On note une nette amélioration du rapport signal-à-bruit en quasi fond-noir.

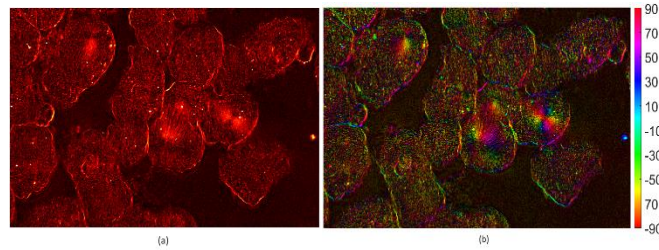


Fig. 2 : Images de (a) retardance linéaire et (b) azimuth obtenues avec le microscope plein champ de cellules de poisson à différents stades de division [3]. On remarque les faisceaux de microtubules qui se densifient lors de la division.

CONCLUSION

Les configurations développées dans ces études ouvrent la voie à la microscopie de biréfringence ultra-sensible en temps réel pour l'étude dynamique d'échantillons biologiques (tissus et cellules sous contraintes). Le caractère passif du codage spectral de la polarisation permet également d'envisager de transformer un microscope classique en un microscope de biréfringence avec des modifications mineures.

RÉFÉRENCES

- ¹X. Theillier, S. Rivet, M. Dubreuil, and Y. Le Grand, "Swept-wavelength null polarimeter for high-speed weak anisotropy measurements" *Optics Express*. Vol. 30, Issue 11, pp. 18889-18902 (2022).
- ²X. Theillier, S. Rivet, M. Dubreuil, and Y. Le Grand, "Swept-wavelength null polarimetry for highly sensitive birefringence laser scanning microscopy" *Optics Letters*, Vol. 4, Issue 2, pp. 387-390 (2024).
- ³H. Lavié, S. Rivet, M. Dubreuil, and Y. Le Grand, "Fullfield birefringence microscopy with a hyperspectral camera", *to be submitted* (2024).
- ⁴S. Rivet, M. Dubreuil, A. Bradu and Y. Le Grand, "Fast spectrally encoded Mueller optical scanning microscopy", *Scientific Report* 9:3972 (2019).