

Microscope tomographique diffractif

Matthieu Debailleul

IRIMAS, Université de Haute Alsace

Solutions ouvertes pour la science,
21 octobre 2022



1 Contexte

- L'imagerie au labo (IRIMAS/IMTI)
- Imagerie de phase : holographie
- Tomographie diffractive : principe & limites
- Amélioration : tomographie Iso

2 Implémentation

- Dispositifs expérimentaux
- Mise en oeuvre logicielle

Aperçu de l'équipe

et des systèmes maisons/commerciaux

- Microscopie tomographique transmission (biologie, polymères) : 1 maison (~~M. Le~~) + 1 nanolive (**M. Manzoni**)
- 1 manip tomographique polarimétrique (**A. Taddese**)
- Platine Tomo/iso
- 1 caméra de phase (phasics, **L. Foucault**)
- imagerie Doppler/hétérodyne (**N. Verrier/R. Abbessi**)
- 1 manip tomographique en réflexion (matériaux)
- Fluo champ large et confocal (systèmes commerciaux)
- Manip ptychographie (**B. Colicchio**)
- PC/GPU : reconstruction, traitements...

1,5 MCF, 1 PU (**Olivier Haeberlé**), 1 IR, 2 IE, 2 doctorants pour
1 dizaine de manip. Peu de bras...

Aperçu de l'équipe

et des systèmes maisons/commerciaux

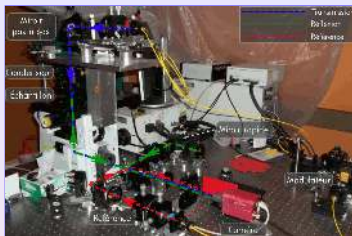
- Microscopie tomographiques transmission (biologie, polymères) : 1 maison (~~M. Le~~) + 1 nanolive (**M. Manzoni**)
- 1 manip tomographique polarimétrique (**A. Taddese**)
- Platine Tomo/iso
- 1 caméra de phase (phasics, **L. Foucault**)
- imagerie Doppler/hétérodyne (**N. Verrier/R. Abbessi**)
- 1 manip tomographique en réflexion (matériaux)
- Fluo champ large et confocal (systèmes commerciaux)
- Manip ptychographie (**B. Colicchio**)
- PC/GPU : reconstruction, traitements...

1,5 MCF, 1 PU (**Olivier Haeberlé**), 1 IR, 2 IE, 2 doctorants pour 1 dizaine de manip. Peu de bras...

MTD Réflexion

Confocal

Fluo



MTD + Fluo

MTD
polarimétrique

MTD hétérodyne

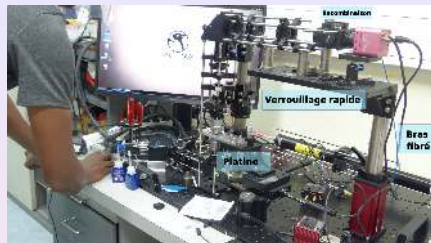
Intérêt de l'imagerie de phase

- Sans marquage
- Imagerie quantitative
- Enregistrement *complet* de l'onde : possibilité de traitements numériques (Correction d'aberration ...)
- Possibilité de repropagation : 2,5D
- Nécessite peu de photons
- Pas de phototoxicité, pas de photoblanchiment

→ **Complément/alternative à la fluo**

Microscopie tomographique diffractive

- Holographie+synthèse d'ouverture
- "Vraie" 3D
- Double imagerie : absorption/phase

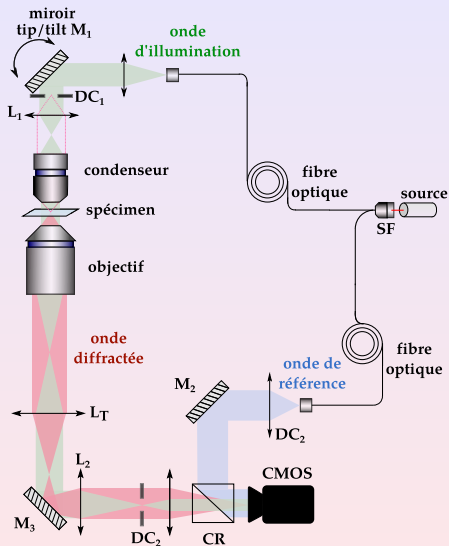


Conditions requises

- 1 Modèle direct (*physique*)
- 2 Enregistrement en phase et amplitude (*instrument*)
- 3 Modèle de repropagation de l'info 2D (*Problème inverse* → CPU)

Enregistrer la phase

- Analyseurs de fronts d'onde
- Méthodes numériques à partir de mesures d'intensité
- Interférométrie →



Repropager l'information 2D

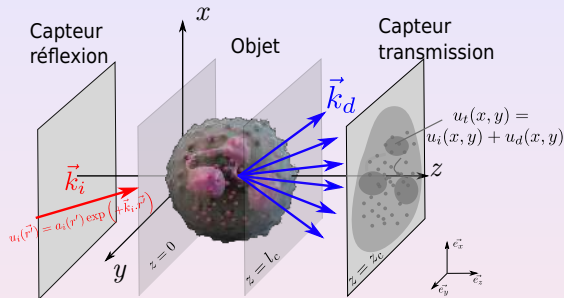
- ① Méthode itérative/optimisation
- ② Méthodes numériques "plan à plan", basées sur des FFT2D (hypothèse d'épaisseur infinitésimale) :
 - Tomographie : Rétropropagation filtrée (noyau spectre amplitude+filtrage)
 - Propagateur de Fresnel
 - Méthode convolutive de Huygens
 - Spectre d'amplitude/Rayleigh-Sommerfeld
- ③ Méthode globale 3D (Wolf 1969). Hypothèse de faibles différences d'indice. Diffraction au 1er ordre.

Méthode globale 3D : principe

- 1 Lien entre la mesure et l'information objet ?
- 2 Pratiquement : comment est calculé le volume 3D à partir de l'information 2D ?

Modèle direct (Wolf 1969)

(Physique)

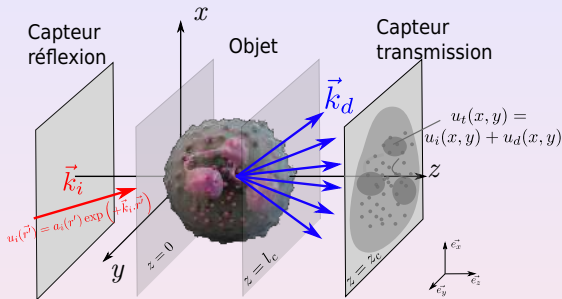


Résolution de l'équation de Helmholtz scalaire en milieu faiblement inhomogène :

$$(\nabla^2 + k_0^2)u_d(\mathbf{r}) = -f(\mathbf{r})u_t(\mathbf{r}) \quad (1)$$

$f(\mathbf{r}) = k^2(\mathbf{r}) - k_0^2$: potentiel objet

Modèle direct (*Wolf 1969*)



Champ diffracté

Source

$$(\nabla^2 + k_0^2)u_d(\mathbf{r}) = -f(\mathbf{r})u_t(\mathbf{r})$$

Diffraction

Réfraction

Champ total

Inversion et repropagation

Exprimer l'indice en fonction du champ diffracté

Solution de type intégrale (Fredholm du 2nd type homogène) :

$$u_d(\mathbf{r}) = \int_V f(\mathbf{r}') u_t(\mathbf{r}') G(|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|) d\mathbf{r}' \quad (2)$$

u_d dans l'intégrande

Inversion et repropagation

Exprimer l'indice en fonction du champ diffracté

Solution de type intégrale (Fredholm du 2nd type homogène) :

$$u_d(\mathbf{r}) = \int_V f(\mathbf{r}') u_t(\mathbf{r}') G(|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|) d\mathbf{r}' \quad (2)$$

u_d dans l'intégrande \rightarrow Approximation de Born :

$$u_d \ll u_i \Rightarrow u_t \simeq u_i$$

$$u_d(\mathbf{r}) = \int_V f(\mathbf{r}') u_i(\mathbf{r}') G(|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|) d\mathbf{r}' \quad (3)$$

Spectre 3D
de l'objet

Spectre 2D
de la mesure
sur la caméra

$$\hat{F}(k_{ox}, k_{oy}, k_{oz}) = \frac{-2ik_{dz}}{a_i} e^{(-ik_{dz}z_c)} \hat{u}_B(k_{dx}, k_{dy}; z_c)$$

La TF3D du potentiel objet est liée à la TF2D du spectre du champ diffracté et

$$\mathbf{k}_o = \mathbf{k}_d - \mathbf{k}_i$$

→ La reconstruction de l'image 3D se fait essentiellement dans l'espace de Fourier !

→ Comment placer (numériquement) ces amplitudes 2D dans l'espace de Fourier 3D ?

Construction du spectre

Relation d'élasticité

$$\mathbf{k}_o = \mathbf{k}_d - \mathbf{k}_i \quad (4)$$

On part de la mesure (k_{dx}, k_{dy}) , on en déduit k_{dz} :

$$k_{dx}^2 + k_{dy}^2 + k_{dz}^2 = k_0 = 2\pi/\lambda_0$$

Construction du spectre

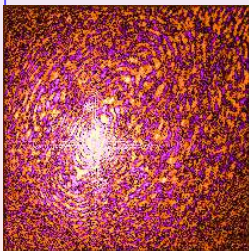
Relation d'élasticité

$$\mathbf{k}_0 = \mathbf{k}_d - \mathbf{k}_i \quad (4)$$

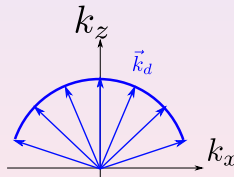
On part de la mesure (k_{dx}, k_{dy}) , on en déduit k_{dz} :

$$k_{dx}^2 + k_{dy}^2 + k_{dz}^2 = k_0^2 = 2\pi/\lambda_0$$

Mesure



$\hat{U}_B(k_{dx}, k_{dy})$

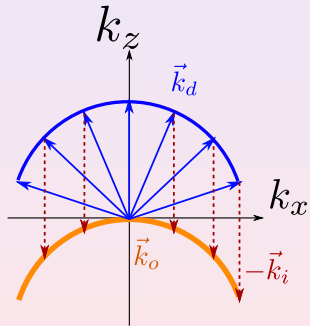


$$k_{dz} = \sqrt{k_0^2 - k_{dx}^2 - k_{dy}^2}$$

Construction du spectre

Décalage du vecteur incident

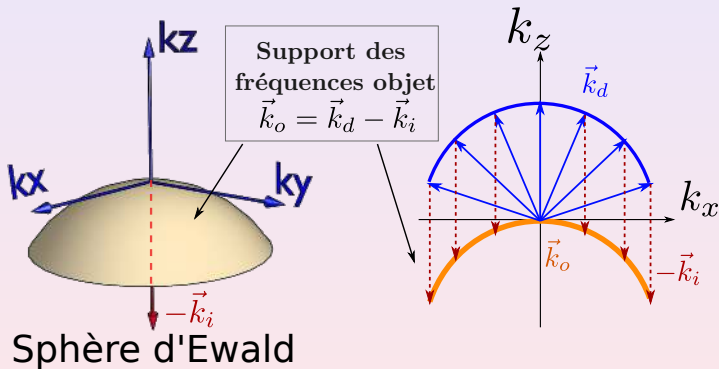
$$\mathbf{k}_o = \mathbf{k}_d - \mathbf{k}_i \quad (5)$$



Construction du spectre

Décalage du vecteur incident

$$\mathbf{k}_o = \mathbf{k}_d - \mathbf{k}_i \quad (5)$$



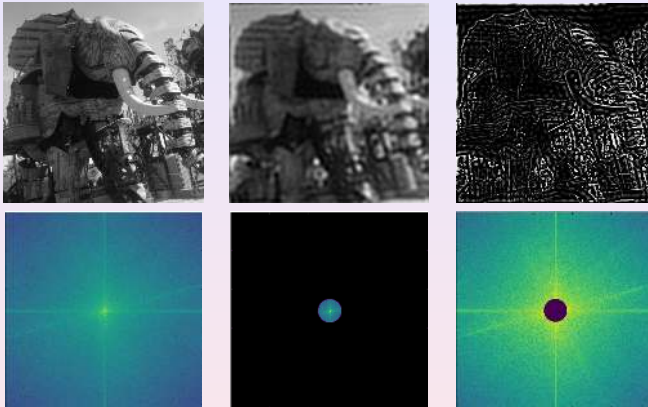
$\rightarrow \text{TF3D}^{-1} \rightarrow \text{Image 3D}$

Nous savons reconstruire l'image, mais la résolution est encore limitée...

→ Synthèse d'ouverture ?

Récupérer l'information perdue à cause de la bande passante limitée du système

Optique de Fourier



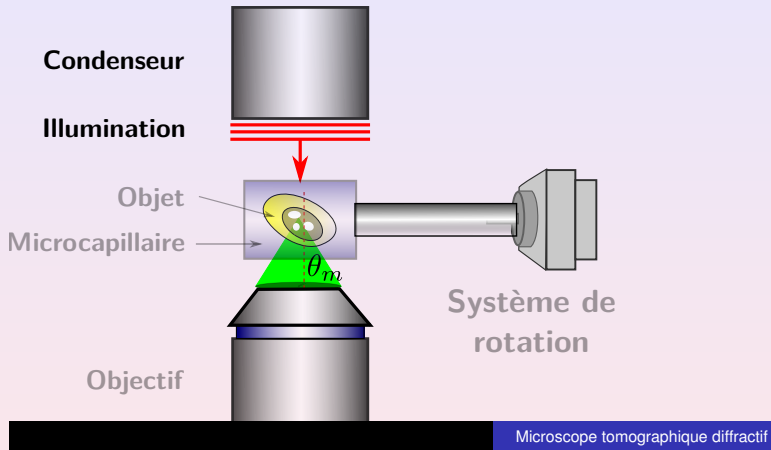
→ **Récupérer les fréquences perdues ?**

Construction du spectre

$$\mathbf{k}_o = \mathbf{k}_d - \mathbf{k}_i \quad (6)$$

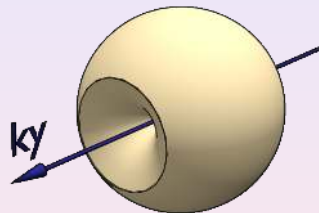
→ varier \mathbf{k}_i → déplacer la sphère d'Ewald → accéder à une autre partie du spectre objet

Synthèse par rotation de l'objet



Synthèse \mathbf{k}_i par rotation de l'objet

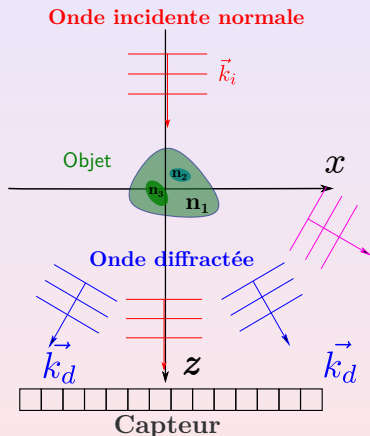
Synthèse \mathbf{k}_i par rotation de l'objet



- "Trognon" de fréquences manquantes selon l'axe k_y
- Important travail de recalage d'image

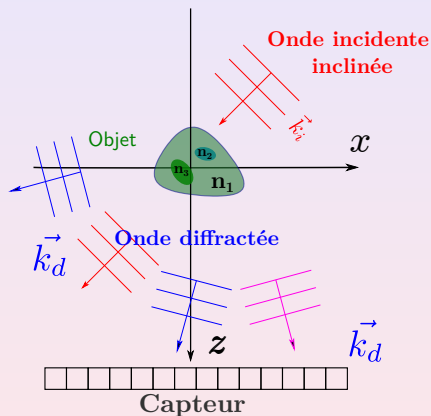
Synthèse d'ouverture par rotation de l'illumination

Miroir inclinable, SLM, DMD, primes ...



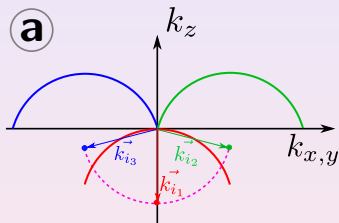
Synthèse d'ouverture par rotation de l'illumination

Miroir inclinable, SLM, DMD, primes ...



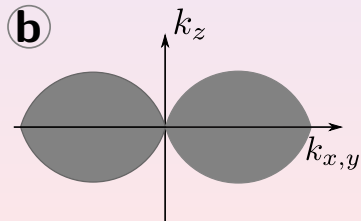
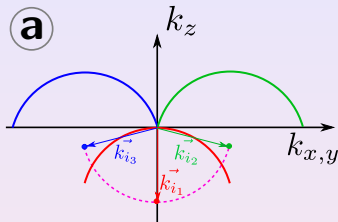
Varier k_i par inclinaison de l'illumination

Balayage de l'objet avec une succession d'onde plane inclinées

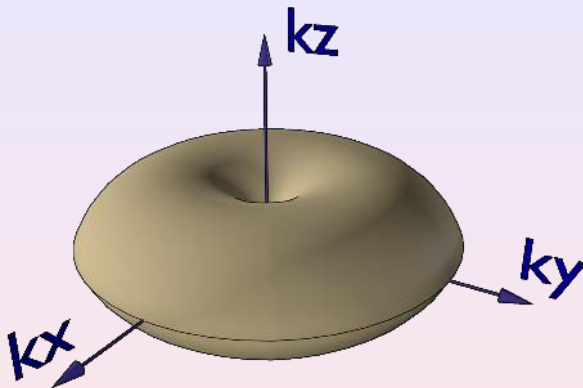


Varier k_i par inclinaison de l'illumination

Balayage de l'objet avec une succession d'onde plane inclinées

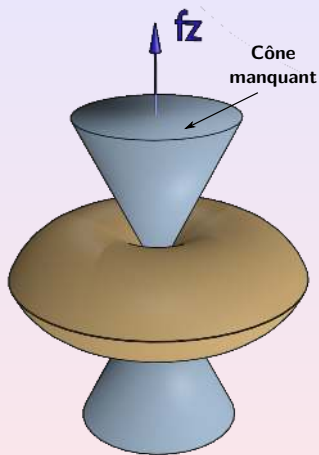


Varier k_i par inclinaison de l'illumination



→ **grande stabilité, pas de recalage d'images**

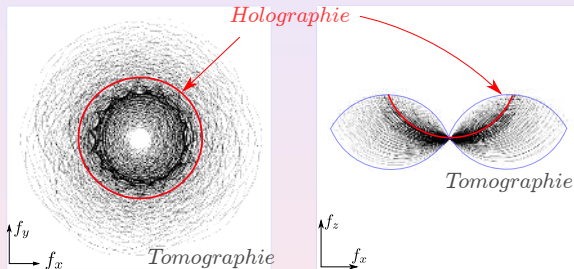
Cône manquant de fréquence



→ Déformation selon l'axe z

Fonctions de transfert optique expérimentales

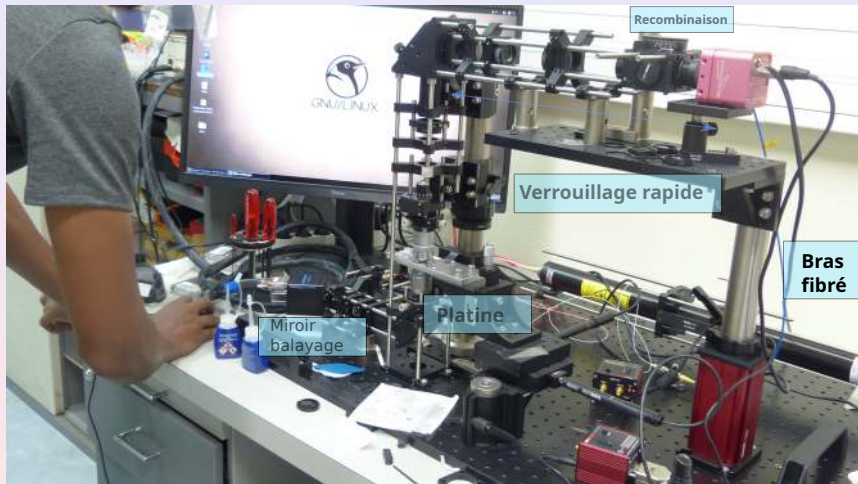
Comparaison Holographie/Tomographie



Manip & applications

Manip de labo

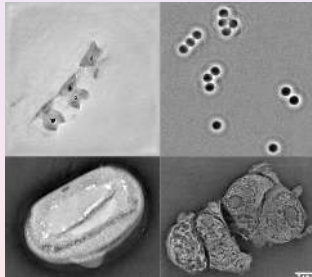
Mais un minimum adaptée pour les utilisateurs "finaux"...



Minimale impulsion 4000

Applications

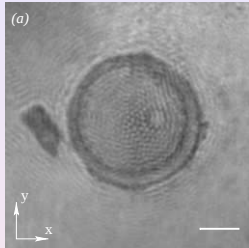
- Imagerie 3D
- 2 images : absorption et indice de réfraction
- Application à la biologie, matériaux . . .



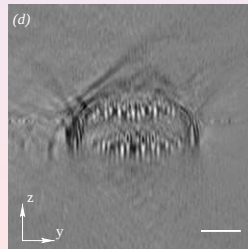
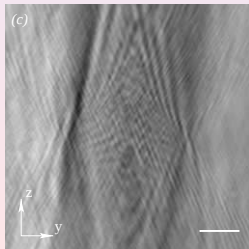
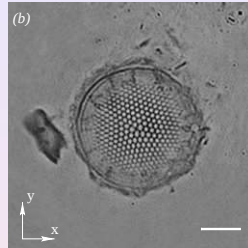
Comparaison holographie/tomographie

diatomé *Coscinodiscus* SP

Holographie

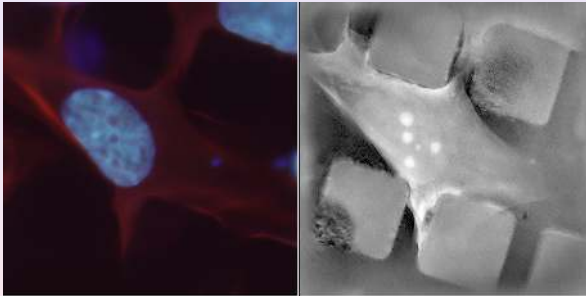


Tomographie diffractive



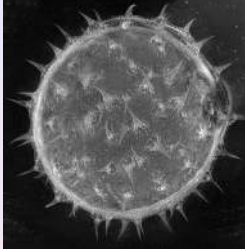
Imagerie multimodale fluo/tomo

Observation multimodale de l'adhérence de cellules Saos-2 sur substrat hétérogène

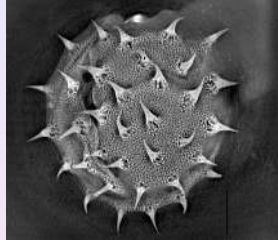


Pollen Helianthus Tuberous

Max intensité



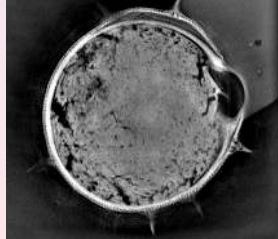
Tranche supérieure



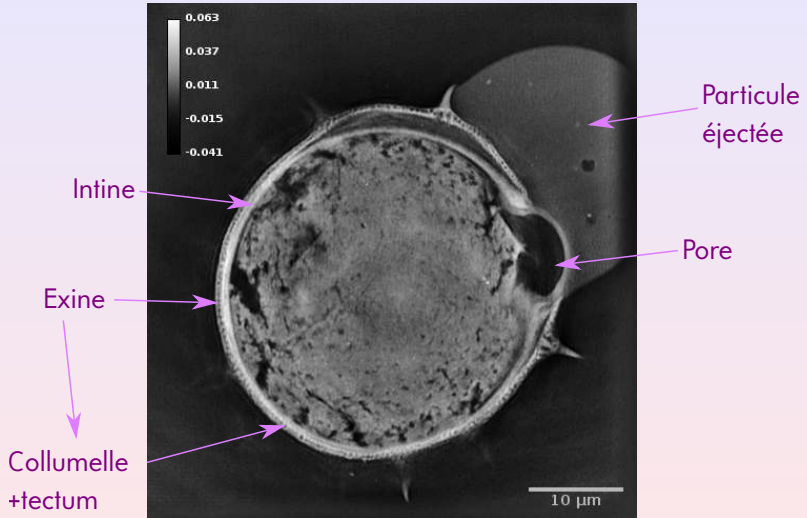
Tranche inférieure



Tranche centrale

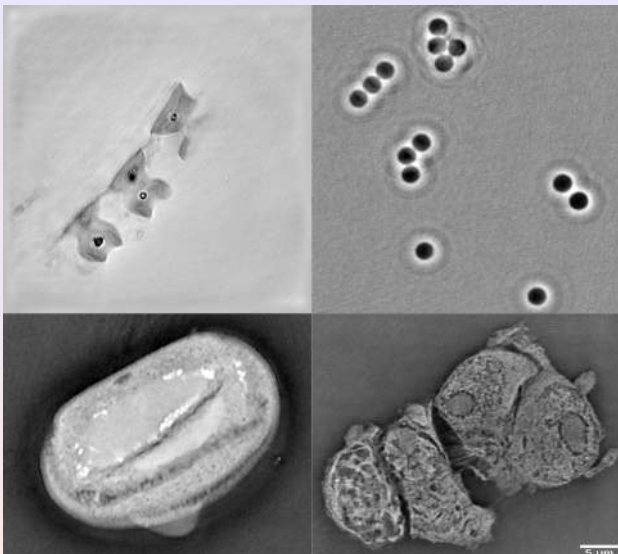


Pollen Helianthus Tuberousus



Données variées disponibles

Phytolithes, polymères, pollens, billes fonctionnalisées, Cellule HEK293

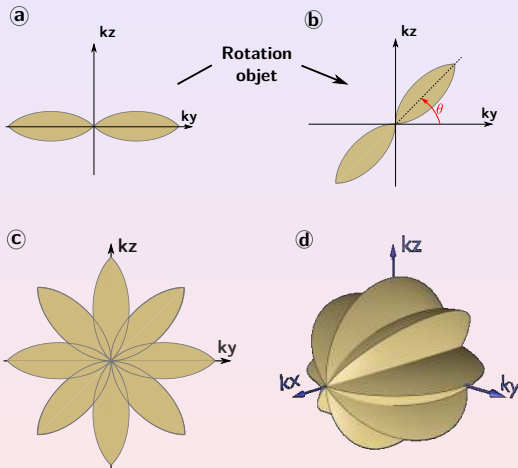


Le problème du cône manquant de fréquence

- 1 Tomo Iso
- 2 Algorithmes itératifs sous contraintes

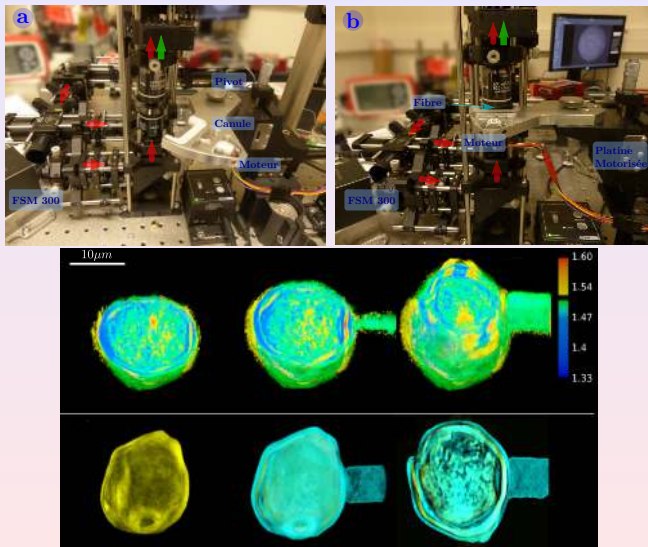
Remplir le cône manquant de fréquence

Construction dans l'espace fréquentiel



Remplir le cône manquant de fréquence

Tomo iso : rotation objet + tomographie par variation d'illumination



- 1 Modèle direct
- 2 Enregistrement phase/amplitude + Synthèse d'ouverture par balayage de l'illumination (instrumentation)
- 3 Repropagation 3D (logiciel)

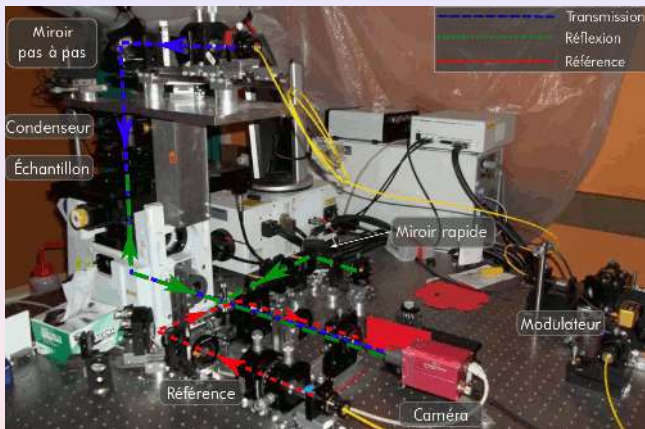
2. Partie expérimentale

Mise en oeuvre expérimentale et logicielle ?

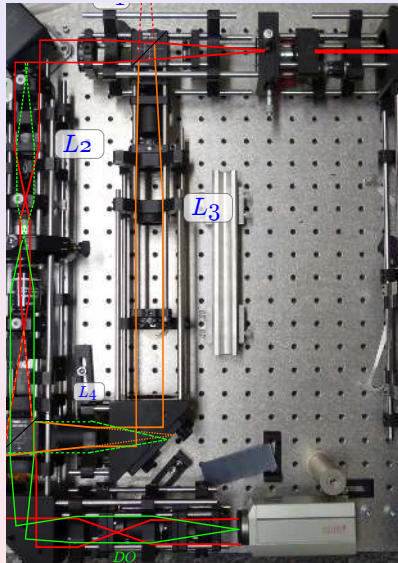
- 1 Présentation générales
- 2 Mesure de la phase : interférométrie
- 3 Système de balayage/Illumination
- 4 Imagerie à haute ouverture
- 5 Détection

- Structure
 - ① Bâti commercial : mécanique stable, mais peu adaptable/modulable
 - ② Cage Thorlabs/Linos/etc. : modulable avec de la patience mais rigidité parfois douteuse. Zéro gain sur l'alignement, voire contre-productif.
 - ③ bâti type ASI ou Cerna : modulable, mécaniquement stable
- Matériel spécifique : miroir de balayage, 2 objectifs à haute ouverture
- Optiques standards : achromat, polarisation, fibres, ...

Bâti commercial modifié (Olympus IX71)

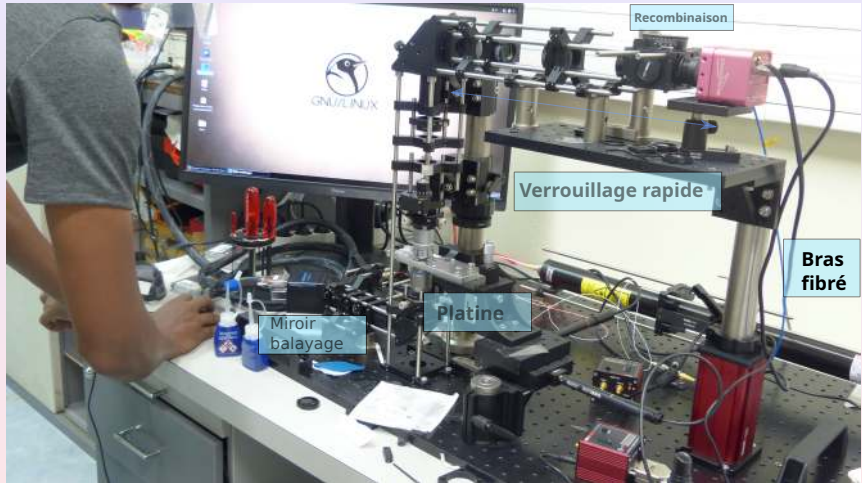


Système à cages (à plat)



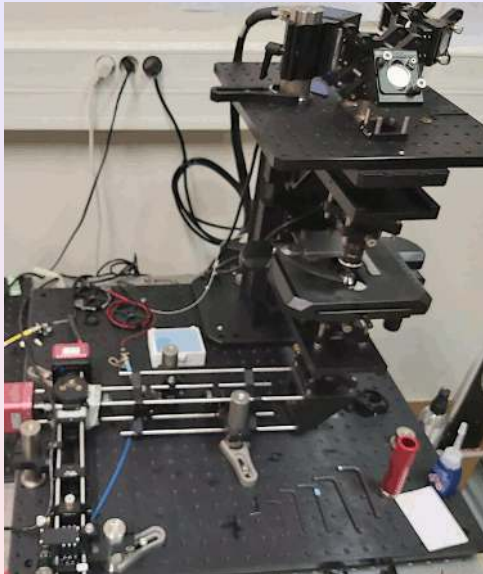
Système cage

Mais un minimum adaptée pour les utilisateurs "finaux"...



Minimale impulsion 4000

Cerna vue d'ensemble



Interférométrie ?

Est ce vraiment problématique ?

- Besoin d'un minimum de cohérence,
- Contrôle de la polarisation
- Implémentation : séparateur fibré FC/PC à visser sur le laser, donne l'illumination et la référence.



- 1 Alternative 1 : Analyseur de front d'onde (Phasics...).
couteux, problèmes d'intégration.
- 2 Alternative 2 : Algorithmes itératifs de recouvrement de phase

Interférométrie ?

Dérive de phase ? Aberrations ?

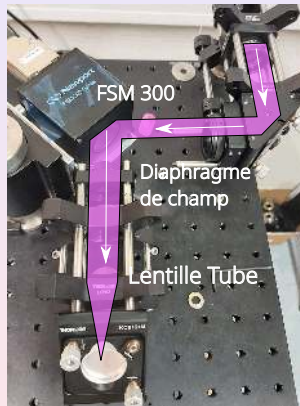
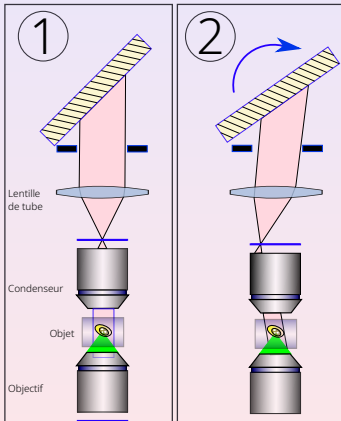
Holographie ok, mais Tomographie : multiplicité des hologrammes → dérive ?

- 1 Temps d'exposition courts (dizaine de μs)
- 2 Correction numérique des aberrations
- 3 recalage numérique de la différence de phase entre hologrammes

Illumination

Capacité à balayer la pupille arrière de l'objectif condenseur.

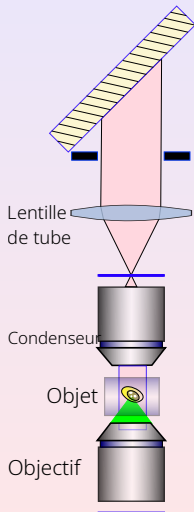
Faisceau illumination



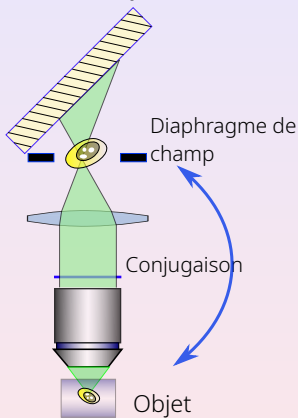
Illumination

Conjugaison des plans : illumination de Kohler.

Faisceau illumination

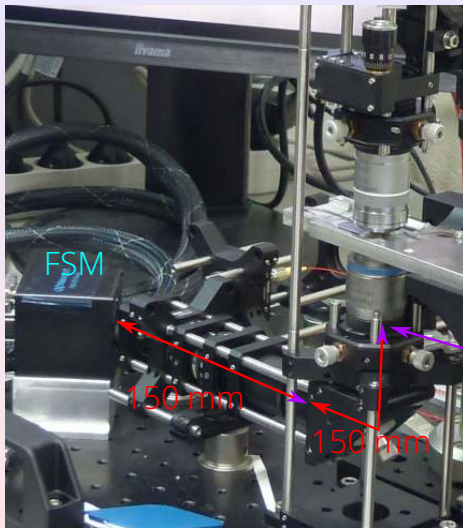


Faisceau objet (virtuel)



Illumination : difficulté

Alignement du faisceau FSM/LT/objectifs NA 1.4



Illumination : alternatives

- 1 Matrice LED+algo itératifs ou analyseur front d'onde
- 2 Optotune MR-15-30 (3000€). Pilotable en tension, 200 Hz.
En cours de test.

Partie microscopie

Doublet d'objectifs !

- ① Stabilité mécanique (bati CERN)
- ② Difficulté d'alignement avec le FSM.
- ③ À haute ouverture : distance de travail réduite. Nécessité d'utiliser deux lamelles. Motorisation bienvenue.
- ① Compromis : double objectifs peu corrigés NA=1,3.
1800x2

- Peu de besoin sur la détection : peu critique en photon, signal amplifié en holographie.
- Photonfocus MV1-D2048-96-G2, 8 bits. 4000€. Possibilité de retrait de la vitre de protection du capteur (imagerie cohérente).
- pilotage par API eBUS/Pleora (voir partie logicielle)

Alternative : caméra industrielle compatible eBus. Ex : Basler (1000€)

Partie expérimentale : résumé

- ❶ 2 objectifs (microscopie)
- ❷ un miroir inclinable (tomographie)
- ❸ 2 fibres optique (interférométrie)
- ❹ Une caméra peu exigeante
- ❺ du matériel "tiré de l'armoire"
- ❻ de la mécanique

→ Liste du matériel sur github :

https://github.com/madeba/MTD_transmission/Doc_tomo/clonage

Coût hors structure et PC ?

- 2 objectifs haute NA 1.4, miroir de balayage FSM300, caméra : 20000€. totale sur la manip actuelle : 28 000€
- Alternative : objectif NA 1.3, optotune MR-15-30, caméra Basler, optiques de polarisation moindre qualité : 8000 €. total : 14000€

Justification des alternatives :

- Pas besoin d'objectifs très corrigés
- MR-15-30 limité à 200Hz > caméra 100Hz
- Peu critique sur le signal
- en imagerie scalaire, taux de polarisation moins critique

2. Partie logicielle

4 grandes parties

- 1 Système
- 2 Contrôle/Acquisition : contrôle du CAN, caméra, platine
- 3 Reconstruction & Traitement
- 4 GUI

Contrôle, GUI, holographie, reconstruction, traitements

C++ ou Python

- 1 Système : Linux (Debian/Ubuntu/Mint)
- 2 Contrôle : liblabjackusb. Dépendance : libusb-1.0. Licence MIT.
eBUS (pleora) : propriétaire.
- 3 Holographie : fftw (GPL), Arrayfire (BSD 2-clause)+ **CUDA/** OpenCL (libre ou commercial), OpenCV (BSD/Apache 2)
Tomographie : Holographie + libTiff (BSD)
- 4 GUI utilisateurs : wxWidget (L-GPL)

Logiciels : FreeCAD (GPL),CURA (L-GPL)

L'ensemble est multi plate-forme (Linux, Windows, macOS)

Intérêt du calcul GPU ?

Rapport temps gagné/temps développement ?

ARRAYFIRE Download Consulting Training Blog

The Fastest Library for GPUs

also, hire us to accelerate your code

Easy-to-use API, like these examples

python

```
import arrayfire as af
af.set_backend('cuda')
A = af.randn(2**15, 2**15) # choose cuda, opencl, or cpu
A2 = af.randn(2**15, 2**15) # create GPU data
A2 = af.matmul(A, A) # fast function calls
B = af.fft2(A2) # ...
```

c++

```
#include <arrayfire.h>
auto A = af::randu(2048, 2048); // create GPU data
auto A2 = af::matmul(A, A); // fast function calls
auto B = af::fft2(A2); // ...
```

Get Started

- Try Quickly on Colab
- Download Binaries
- Talk to Us About Your Project
- Learn about Our Services

- API de haut niveau (simplicité)
- Surcouche s'appuyant CUDA/OpenCL voire CPU : adaptation au matériel
- Libre (BSD2)

Temps d'acquisition et de calculs (RTX 2060)

Intérêt du calcul GPU (Arrayfire/C++)

- 1 **Acquisition** : 100 hologrammes/s soit 4s pour une acquisition standard. Actuellement limité par la caméra (\simeq 100FPS). miroir de scan : 1 khz (600 hz pleine amplitude).
- 2 **Temps de calculs** pour les 2 opération les plus coûteuses :

	Nvidia	OpenCL	CPU	t_{cpu}/t_{cuda}	t_{cpu}/t_{opencl}
Holo2TF	0.075	0,380	20,7	276	55
Déroulement	1,78	2,70	7,76	4,4	2,9

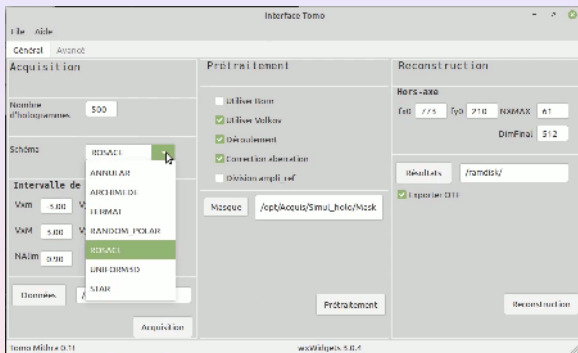
TABLE – Temps en ms pour 1 hologramme sur RTX2060 : hors axe : 1024x1024. Déroulement : 304x304

Pour 400 hologrammes : en CPU : 8300 ms+ 3100ms

En GPU : 30 ms+700 ms → Possibilité de temps réel.

Ergonomie logicielle du système ?

Interface utilisateur wxWidget

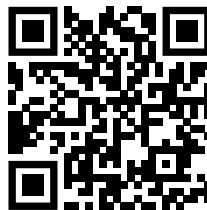


Surcouche qui s'appuie sur les binaires lancés en console et des fichiers de config.

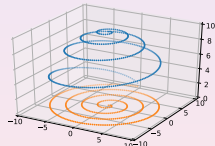
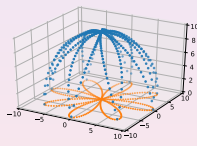
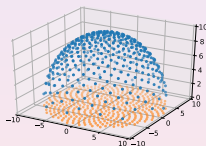
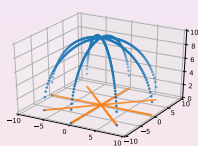
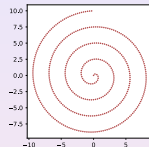
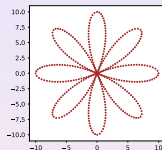
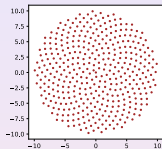
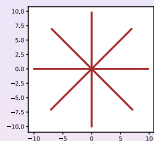
Conclusion

- Imagerie 3D sans marquage
- imagerie quantitative en absorption et indice.
- Complément/alternative à l'imagerie de fluorescence
- Travail actuel sur l'imagerie multicouche et polarimétrie 3D

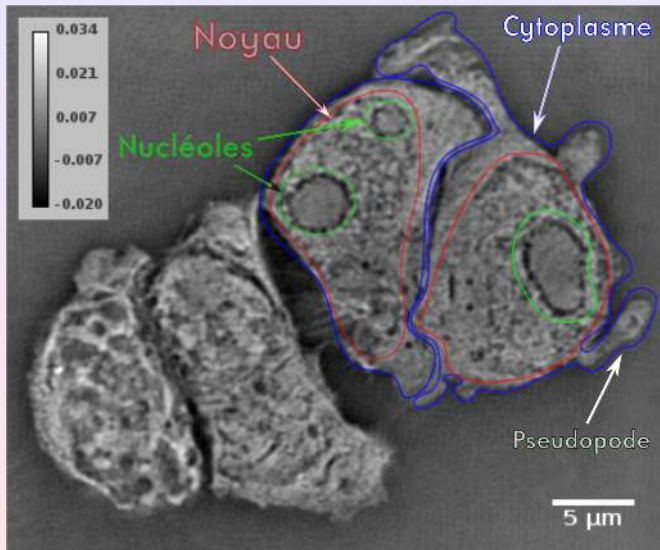
Tout le code est ouvert et disponible sur github (C++ et python) **https://github.com/madeba/MTD_transmission**



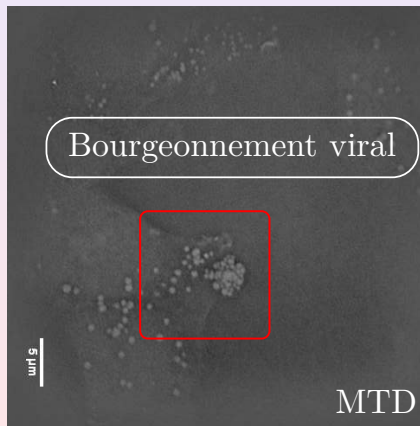
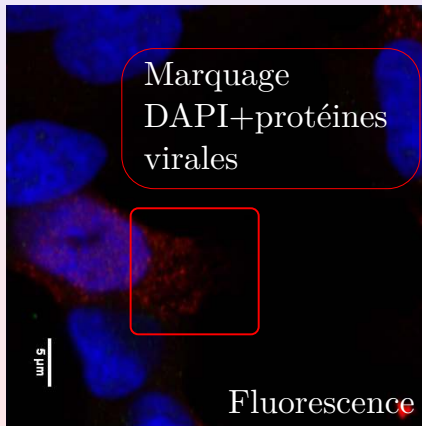
Schémas de balayage (Tadese2020)



Cellule HEK293 fixée par méthanol



Cellule humaine A549 24h après infection
par H3N2 (grippe de Hong-Kong)



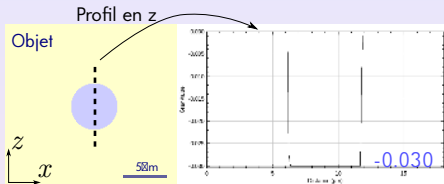
"Comparative study of iterative reconstruction algorithms for missing cone problems in optical diffraction tomography". Lim et al. Optics express, 23(13) (2015).

Revue avec :

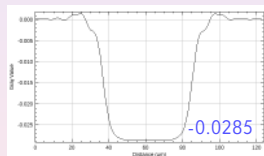
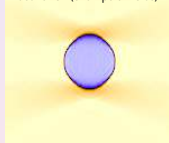
- 1 Gerchberg Papoulis
- 2 Regularisation TV avec contrainte de non négativité
- 3 Régularisation EP (edge preserving) avec contrainte de non négativité

Remplir le cône manquant de fréquence

Algo itératifs de restauration (type Gerchberg-Papoulis). Simulation sur bille $5\mu\text{m}$

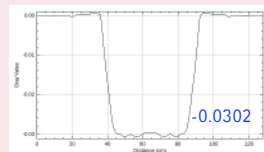


Reconstruit (champs simulés)



Sous estimation
valeur moyenne
7%

Gerchberg $\Delta n < 0$



Sur évaluation
valeur moyenne
0,6%

