

Abstract [EN]

3D optical microscopy for label free characterization of immunological cells

Imaging of biological cells is dominated by fluorescence microscopy, as it provides the best contrast and resolution. However, tagging the samples with fluorophores also have some drawbacks, like phototoxicity (processes involving the cells can be altered by the presence of the fluorophores) and photobleaching (long time measurement is not possible). Moreover, it usually requires an additional sample preparation step. On the other hand, label free microscopy techniques are less resolved but do not suffer from these drawbacks, which make them particularly attractive for biomedical applications. Numerous immunological processes involving cells in solution would highly benefit from a label free characterization technique to develop new quick diagnosis tools. In this context, presently best resolved label free modality based on the detection of scattered light is tomographic diffractive microscopy (TDM). It consists in shining a coherent beam on the sample with different successive illumination angles, detecting the complex (amplitude and phase) scattered field, and reconstructing in 3D the sample from this data set. It has up to now only been used in transmission geometry, and suffers from a poor axial resolution compared to the transverse one.

In this work, we present to our knowledge for the first time the characterization of cells with TDM in reflection geometry. This configuration is more difficult to implement due to the lower level of scattered signal and the more complex phase normalization of the data set required. Having solved these issues, we show that it provides the best resolution if the contour reconstruction of the cells is targeted. We validate experimentally the technique on different immunological cells, with potential application to detect important processes like immunological synapse formation or phagocytosis.

Abstract [FR]

Microscopie optique 3D pour la caractérisation sans marquage des cellules immunologiques

L'imagerie des cellules biologiques est dominée par la microscopie de fluorescence, comme elle procure les meilleurs contraste et résolution. Cependant, marquer les échantillons avec des fluorophores a aussi des inconvénients, comme la photo-toxicité (le comportement des cellules peut être modifié par la présence des fluorophores) et un temps d'utilisation limité des fluorophores, empêchant les observations sur de longues périodes. De plus, le marquage est habituellement une étape supplémentaire de préparation de l'échantillon. Au contraire, les techniques d'imagerie sans marquage sont moins résolues mais ne souffrent pas de ces inconvénients, ce qui les rend particulièrement attractives pour les applications biomédicales. De nombreux processus immunologiques impliquant des cellules en solution bénéficieraient grandement de techniques de caractérisation sans marquage pour développer de nouveaux outils de diagnostic. Dans ce contexte, la méthode sans marquage actuellement la plus résolue basée sur la détection de lumière diffractée est la microscopie tomographique diffractive (TDM). Elle consiste à éclairer l'objet par un faisceau cohérent sous différents angles successifs, détecter le champ diffracté en phase et en amplitude, et reconstruire en 3D l'objet à partir de ce jeu de données. Elle a jusqu'à présent uniquement été utilisée en configuration de transmission, qui souffre d'une résolution axiale nettement dégradée par rapport à la résolution transverse.

Dans ce manuscrit, nous présentons à notre connaissance pour la première fois la caractérisation de cellules par TDM en géométrie de réflexion. Cette configuration est plus délicate à implémenter du fait du niveau de signal plus faible et d'une procédure de normalisation en phase plus complexe du jeu de données. Ayant résolu ces difficultés, nous montrons que cette géométrie procure la meilleure résolution si c'est la reconstruction du contour des cellules qui est visée. Nous validons expérimentalement cette approche sur différentes cellules immunitaires, avec des applications potentielles pour la détection de processus importants comme la formation de la synapse immunologique et la phagocytose.