



# VIDÉO-MICROSCOPIE SANS LENTILLE POUR LA BIOLOGIE CELLULAIRE 2D ET 3D

Fabien Momey, Cédric Allier, Olivier Cioni, Jean-Guillaume Coutard, Lionel Hervé, Vinjimore Kesavan Srikanth, Jean-Marc Dinten, Nathalie Picollet-D'Hahan, Monika Dolega, Xavier Gidrol

► **To cite this version:**

Fabien Momey, Cédric Allier, Olivier Cioni, Jean-Guillaume Coutard, Lionel Hervé, et al.. VIDÉO-MICROSCOPIE SANS LENTILLE POUR LA BIOLOGIE CELLULAIRE 2D ET 3D. 3ème rencontre francophone d'holographie numérique appliquée à la métrologie des fluides, Nov 2014, Ecully, France. <hal-01112841>

**HAL Id: hal-01112841**

**<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01112841>**

Submitted on 3 Feb 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0  
International License

## VIDÉO-MICROSCOPIE SANS LENTILLE POUR LA BIOLOGIE CELLULAIRE 2D ET 3D

Fabien Momey<sup>1,2</sup>, Cédric Allier<sup>1,2</sup>, Olivier Cioni<sup>1,2</sup>, Jean-Guillaume Coutard<sup>1,2</sup>, Lionel Hervé<sup>1,2</sup>, Vinjimore Kesavan Srikanth<sup>1,2</sup>, Jean-Marc Dinten<sup>1,2</sup>

[fabien.momey@cea.fr](mailto:fabien.momey@cea.fr), [olivier.cioni@cea.fr](mailto:olivier.cioni@cea.fr), [jean-guillaume.coutard@cea.fr](mailto:jean-guillaume.coutard@cea.fr), [lionel.herve@cea.fr](mailto:lionel.herve@cea.fr),  
[srikanth.vinjimore@cea.fr](mailto:srikanth.vinjimore@cea.fr), [cedric.allier@cea.fr](mailto:cedric.allier@cea.fr), [jean-marc.dinten@cea.fr](mailto:jean-marc.dinten@cea.fr)

Nathalie Picollet-D'hahan<sup>1,3,4</sup>, Monika Dolega<sup>1,3,4</sup>, Xavier Gidrol<sup>1,3,4</sup>  
[nathalie.picollet-dhahan@cea.fr](mailto:nathalie.picollet-dhahan@cea.fr), [monika.pyzalska@cea.fr](mailto:monika.pyzalska@cea.fr), [xavier.gidrol@cea.fr](mailto:xavier.gidrol@cea.fr)

<sup>1</sup>Univ. Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France

<sup>2</sup>CEA, LETI, MINATEC Campus, F-38054 Grenoble, France

<sup>3</sup>CEA, iRTSV-Biologie à Grande Echelle, F-38054 Grenoble, France

<sup>4</sup>INSERM, U1038, F-38054 Grenoble, France

### MOTS CLÉS

Holographie numérique, microscopie sans lentille, culture cellulaire 2D, culture cellulaire 3D.

### RESUMÉ

L'étude de l'évolution et de l'organisation de populations de cellules cultivées in vitro intéresse les biologistes depuis plusieurs dizaines d'années. À ces fins, d'importants progrès ont été réalisés dans les méthodes d'imagerie à l'échelle microscopique. Cependant, certaines informations demeurent inaccessibles, notamment à l'échelle mésoscopique, en raison du champ de vue réduit, ainsi que la complexité et le coût pour réaliser des acquisitions hors incubateur en temps réel sur de longues périodes. En réponse à ces limitations, nous avons développé la vidéo-microscopie sans lentille, en plaçant directement les cellules vivantes sur un capteur numérique en regard d'une illumination cohérente selon le principe de l'holographie en ligne. Cette technique permet l'observation d'une culture cellulaire sur un large champ de vue (24 mm<sup>2</sup> soit plusieurs dizaines de milliers de cellules), et ce à l'intérieur même de l'incubateur, autorisant de surcroît des acquisitions dynamiques couvrant des périodes allant de quelques jours à plusieurs semaines. À partir des images holographiques brutes acquises, nous pouvons remonter aux images refocalisées par reconstruction numérique jusqu'à une résolution de 2µm. Le traitement de ces images donne accès à des niveaux d'information quantifiables allant de la cellule unique à l'organisation inter-individus de la population. Avec des premières études sur des cultures standard de cellules sur substrat 2D, nous sommes aujourd'hui en mesure, avec notre dispositif et la force de l'imagerie holographique, d'explorer et d'étudier la vie cellulaire en 3D, nous rapprochant un peu plus de la réalité physiologique des phénomènes biologiques.

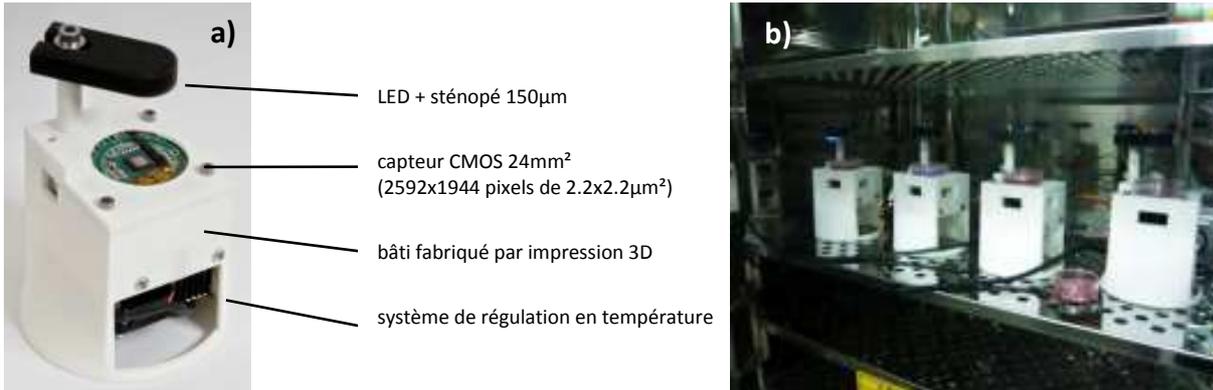
### I. INTRODUCTION

L'apparition de la vidéo-microscopie sans lentille [1-5] a récemment permis de lever certains verrous observationnels en biologie cellulaire. En effet les méthodes toujours plus sophistiquées de microscopie optique conventionnelle ne permettent pas d'accéder à un champ de vue suffisamment large pour comprendre à l'échelle tissulaire l'organisation structurale et les comportements d'une population de cellules vivantes (non fixées), ainsi que l'évolution de leurs paramètres au cours du temps, si ce n'est au prix d'une complexité et d'un coût accrus. En réponse à cela, l'imagerie sans lentille autorise de façon simple et sans marquage l'observation dynamique de la vie cellulaire, en 2D et en 3D, aussi bien à l'échelle microscopique que mésoscopique, sur un large champ de vue et sur des périodes de temps allant de quelques jours à plusieurs semaines. Basé sur le montage d'holographie en ligne de Gabor [6], notre vidéo-microscope sans lentille se compose d'une source d'illumination semi-cohérente (LED) placée en regard d'un capteur numérique (CMOS), i.e. un système très compact pouvant être placé directement dans un incubateur standard. Nous refocalisons ensuite les hologrammes bruts pour accéder à l'amplitude et la phase initiale des cellules imagées par reconstruction numérique de type "phase retrieval" jusqu'à une résolution de 2µm. L'analyse poussée des images nous permet de quantifier des indicateurs des fonctions majeures de la vie cellulaire au cours du temps. Nous présentons dans un premier temps le principe de

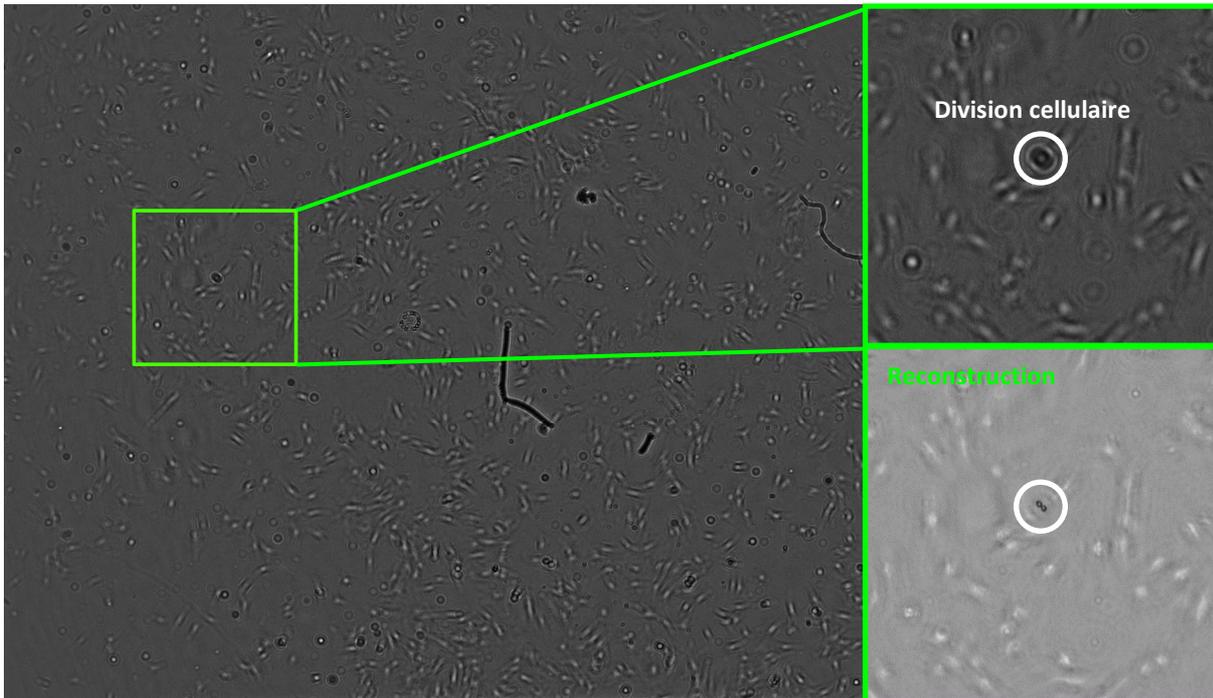
notre dispositif, et montrons ensuite une série de résultats obtenus sur des expériences de cultures de cellules en 2D et en 3D.

## II. MATÉRIEL ET MÉTHODE

Le dispositif se présente sous la forme du petit microscope de la figure 1. Un capteur CMOS est placé directement en regard d'une LED (à environ 5cm) passant au travers d'un sténopé de 150 $\mu$ m. L'échantillon à imager, contenant une culture de cellules, est placé entre la source et le détecteur. L'onde de référence de la source interfère alors avec les ondes diffractées par les objets présents dans l'échantillon. Ces interférences se somment alors en une onde transmise dont l'intensité est enregistrée par le détecteur pour constituer une image holographique.



**Figure 1** : (a) Vidéo-microscope sans lentille (prototype CEA 2013). (b) Installation de 4 vidéo-microscopes dans un incubateur standard pour l'imagerie en temps réel de cultures cellulaires en boîte de Petri.



**Figure 2** : Image 24mm<sup>2</sup> à t+5h d'une acquisition d'une culture de cellules souches mésenchymateuses. La séquence complète comporte 56 images acquises toutes les 20 minutes, soit environ 17 heures de film. À droite un agrandissement (image brute et sa reconstruction) montrant une division cellulaire.

Les avantages de notre vidéo-microscope sont nombreux comparé aux systèmes de microscopie optique conventionnelle :

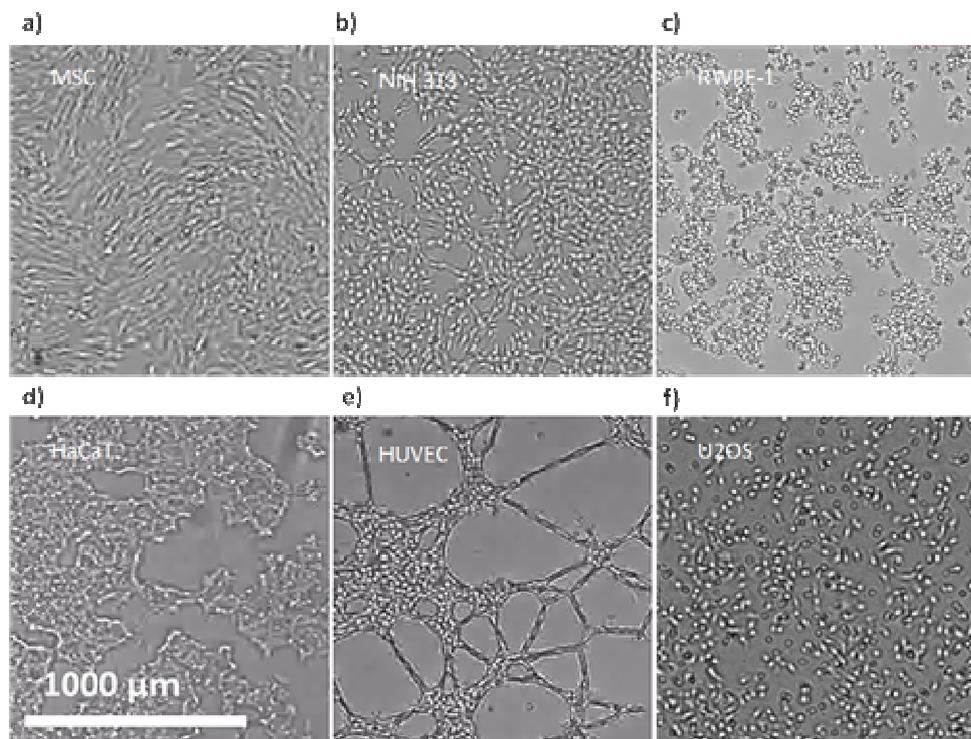
- Son très faible encombrement permet de l'utiliser directement dans un incubateur standard. De plus, il a été conçu pour permettre l'imagerie de cultures cellulaires sur des supports également standards (boîte de Petri, plaques à puits, etc.). Ainsi les protocoles habituels des biologistes ne sont pas modifiés.

- Le fait de pouvoir acquérir des images sans retirer le dispositif de l'incubateur autorise le suivi en temps réel et sur de longues périodes de la culture cellulaire sans perturber les conditions environnementales (température, humidité, etc.). On a ainsi accès à un nouvel angle d'étude de la vie cellulaire (viabilité, divisions, prolifération, motilité, apoptose, etc.) à chaque stade de son évolution dans le temps. Un microscope standard peut aussi offrir de telles informations, mais réclame une mise en œuvre spécifique et coûteuse pour le lier à un système d'incubation.
- Le grand champ de vue est apporté directement par la taille du capteur CMOS (24mm<sup>2</sup>), puisqu'aucune optique ne vient le réduire. Cela permet ainsi d'imager la culture cellulaire à l'échelle mésoscopique, donnant accès à des informations sur l'organisation structurale de la population de cellules avec une grande statistique (quelques milliers de cellules par image), là où le champ de vue d'un microscope classique ne permet de voir que quelques dizaines de cellules au maximum. De plus, le capteur est suffisamment résolu (taille du pixel 2.2 x 2.2µm<sup>2</sup>) pour imager la cellule unique ce qui, moyennant une étape algorithmique de reconstruction holographique, ouvre la voie à des mesures intrinsèques comme la taille, la forme, etc (cf. figure 2).
- L'imagerie holographique donne accès à une information dans les 3 dimensions de l'espace, rendant cette modalité parfaitement adaptée à l'observation de cultures cellulaires aussi bien en 2D qu'en 3D avec une résolution de l'ordre de 2µm, proche des microscopes optiques conventionnels.

Compte-tenu des distances caractéristiques du montage, c'est le phénomène de diffraction en champ proche, suivant la théorie de Fresnel, qui s'applique. La reconstruction des cellules est obtenue grâce à un algorithme de type "phase retrieval" [7-8], ce qui nous permet de restituer en phase et en amplitude la localisation 3D ainsi que la forme des quelques milliers de cellules observées (cf. figure 2), ayant des tailles de l'ordre de la dizaine de microns, jusqu'à une résolution d'environ 2µm, et de suivre l'évolution de leur morphologie et leurs déplacements au cours du temps.

### III. RÉSULTATS

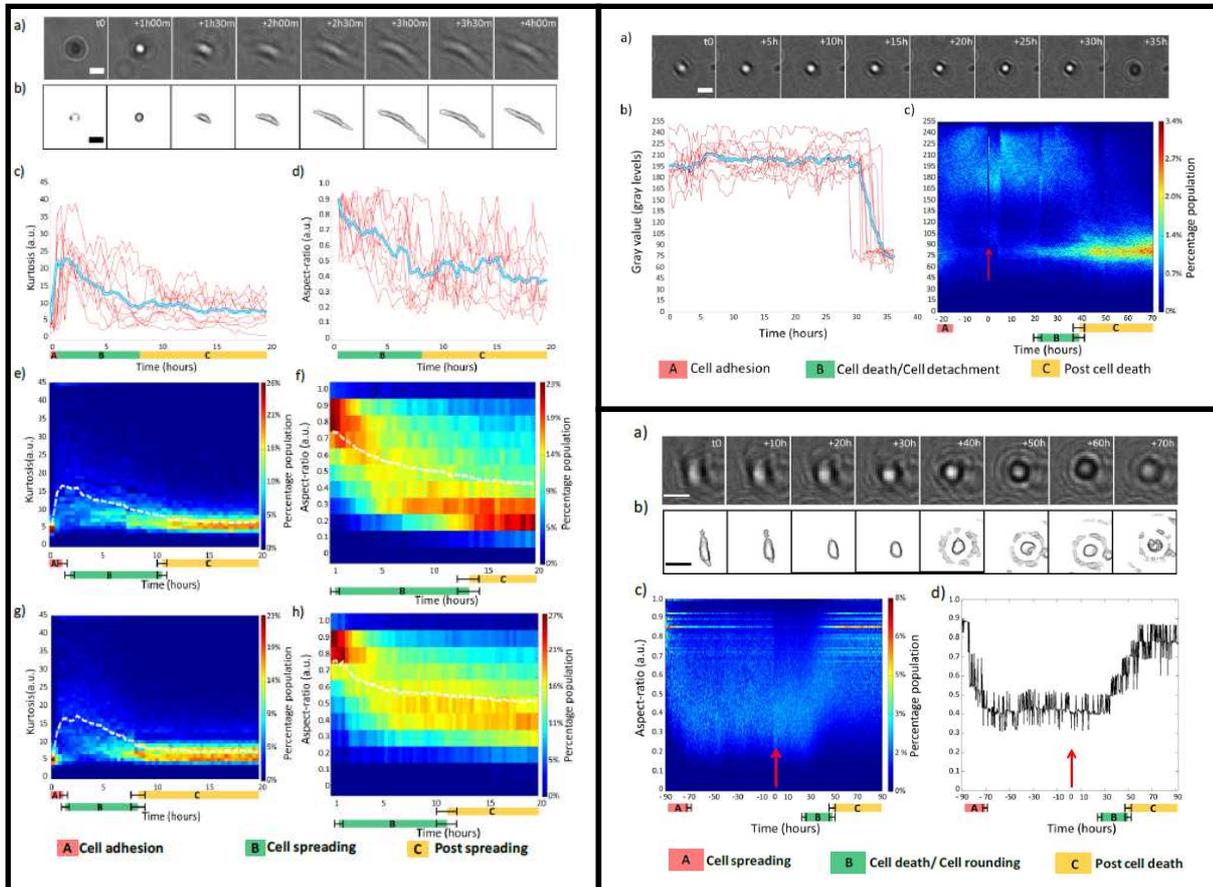
#### III.1 ÉTUDE DE CULTURES CELLULAIRES 2D



**Figure 3** : Visualisation de diverses lignées cellulaires. (a) cellules souches mésenchymateuses. (b) cellules humaines fibroblastes primaires. (c) cellules épithéliales de la prostate RWPE-1. (d) cellules kératinocytes de l'épiderme de lignée HaCaT. (e) cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical humain HUVEC. (f) cellules humaines d'ostéosarcome U2OS. Toutes les cellules ont été cultivées au fond d'une boîte de Petri, exceptées les cellules HUVECensemencées sur Matrigel™ (BD Biosciences).

Nous avons démontré le grand intérêt de l'imagerie sans lentille comme outil fiable et unique pour le suivi en large champ et en temps réel dans l'incubateur des phénomènes majeurs de la vie cellulaire en culture 2D : adhésion au substrat, prolifération et motilité, division, mort. À cet effet, nous avons analysé les acquisitions de

cultures de multiples lignées cellulaires (cf. figure 3) : cellules souches mésenchymateuses, cellules fibroblastes 3T3, cellules épithéliales de la prostate RWPE-1, cellules kératinocytes de l'épiderme de lignée HaCaT, cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical humain HUVEC, cellules humaines d'ostéosarcome (osseuses tumorales) U2OS. Ces différentes lignées cellulaires montrent une signature spécifique permettant leur identification. Nous avons à l'heure actuelle constitué une base de données filmées extrêmement riche de ces différentes populations de cellules (plus de 1000 heures d'expérience).



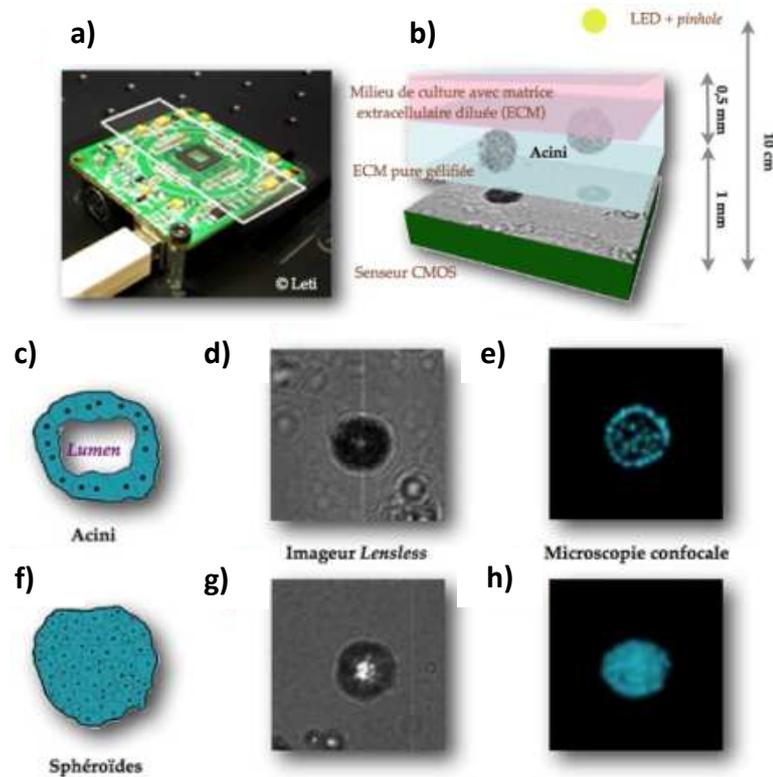
**Figure 4** : figures tirées de l'article de Kesavan et al. [9], portant sur l'étude de fonctions majeures de la vie cellulaire par vidéo-microscopie sans lentille sur trois lignées cellulaires : cellules souches mésenchymateuses, cellules humaines fibroblastes primaires, cellules humaines d'ostéosarcome U2OS. Les graphes montrent les distributions des valeurs de différents paramètres mesurés sur les images des cellules détectées (niveaux de gris, kurtosis, ratio d'aspect) et leur évolution dans le temps, permettant d'identifier et de dater des phénomènes primordiaux de la vie cellulaire : adhésion, étalement, mort cellulaire.

L'analyse des images holographiques et leur reconstruction nous ont permis de dégager nombre de métriques et marqueurs pour la quantification et le suivi des fonctions de la vie cellulaire dans le temps. La figure 4 illustre une partie des résultats obtenus, récemment publiés [9]. Grâce au grand champ de vue permettant de détecter un panel très important d'individus d'une population (typiquement plusieurs milliers de cellules), nous sommes à même d'obtenir une statistique très significative de la distribution des valeurs de ces paramètres et leur évolution dans le temps. Le phénomène d'adhésion et d'étalement des cellules ont été mis en lumière grâce à la mesure du ratio d'aspect des cellules segmentées et du kurtosis de la distribution de niveau de gris de leur hologramme respectif. Nous avons également pu déterminer que le ratio d'aspect constituait un marqueur précurseur de la mort cellulaire. Cette dernière est ensuite explicitement identifiée par le niveau de gris du centre de l'hologramme de la cellule, qui change de valeur en fonction de sa viabilité.

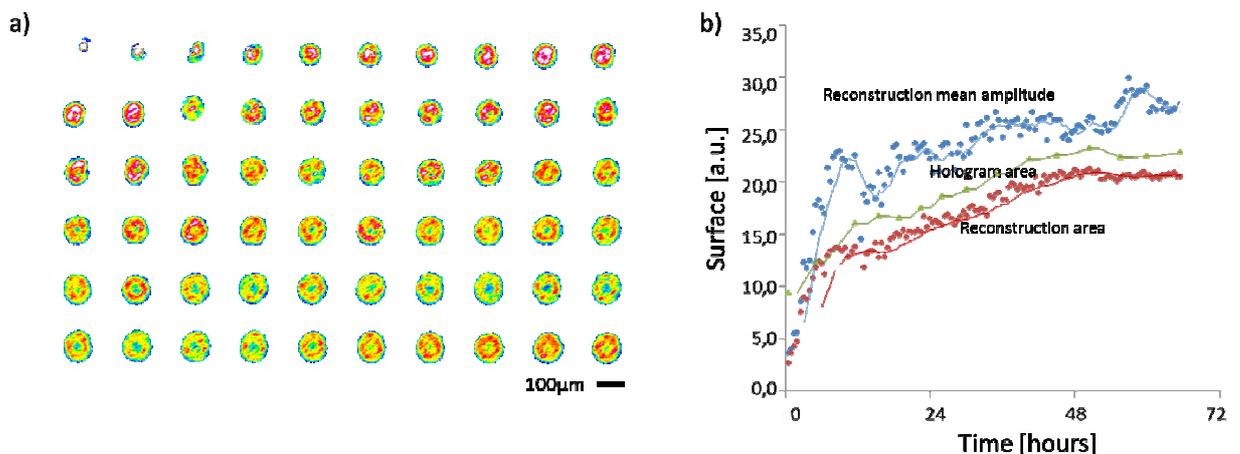
### III.2 ÉTUDE DE CULTURES CELLULAIRES 3D

Les expériences et études en biologie cellulaire sont quasiment essentiellement mises en œuvre sur des modèles de culture 2D réalisés sur supports solides en verre ou en plastique. Or ces derniers sont en inadéquation avec la réalité de la physiologie des tissus (structures 3D par essence), entraînant des limitations dans la compréhension des processus biologiques. L'imagerie classiquement utilisée pour visualiser les cellules (microscopie confocale) est limitée par l'étape de fixation (mort des cellules) et de marquage de l'échantillon biologique, par la nécessité de scanner l'objet en profondeur pour imagier le cœur de la structure (z-stacks), et par l'extrême difficulté voire

l'impossibilité de réaliser un suivi dans le temps par des acquisitions en temps réel. Enfin, pour des applications cliniques, ces approches classiques ne disposent pas d'un champ d'observation assez grand pour visualiser un grand nombre d'objets en même temps, et donc d'obtenir des résultats quantitatifs significatifs, comme par exemple évaluer à grande échelle l'effet de drogues capables d'agir pour renverser le développement des cellules cancéreuses, sujet d'importance en biologie cellulaire.



**Figure 5** : Imagerie sans lentille de structures 3D d'épithélium prostatique (cellules RWPE-1). (a) et (b) Montage d'imagerie sans lentille et principe de l'imagerie de culture 3D. Acini de lignées non cancéreuses RWPE-1 polarisées avec lumen (c), observées en imageur sans lentille sans marquage (d) et observées en microscopie confocale après marquage au DAPI (e). Sphéroïdes de lignées cancéreuses WPE1-NB26 non polarisés (f) et observés en imageur sans lentille sans marquage (g) et observés en microscopie confocale après marquage au DAPI (h).



**Figure 6** : (a) Observation au cours du temps du développement d'un acinus prostatique sur une période de 72 heures, avec un intervalle de temps de 1 heure. On visualise l'amplitude reconstruite permettant de mesurer a taille approximative de la structure. (b) Ces dimensions relatives de l'acinus sont mesurées au cours du temps par 3 métriques différentes, i.e. l'aire de l'hologramme brut (courbe verte), l'amplitude moyenne de l'objet reconstruit (courbe bleue) et sa surface occupée (courbe rouge).

Une fois de plus, l'imagerie sans lentille se révèle très adaptée pour passer ces difficultés. Nous avons mis en place une méthodologie innovante couplant la technique d'imagerie sans lentilles à la culture cellulaire 3D [10] (cf. figure 5). Nous avons démontré cette méthodologie sur l'observation de cultures 3D de cellules épithéliales de prostate RWPE-1, s'organisant en sphères creuses, les acini. Placées en Matrigel™ pendant 6 jours, les cellules s'auto-organisent en acini parfaitement différenciés ; en revanche, des cellules provenant de lignées tumorales forment des sphéroïdes ayant perdu toute capacité à s'organiser de la sorte. C'est en comparant la signature optique de ces 2 types de structures à l'aide de l'imagerie sans lentille (cf. figure 5) qu'il est devenu possible de discriminer et de dénombrer acini et sphéroïdes sur un large champ de vue. L'organisation spatiale des cellules RWPE-1 a également été étudiée au cours du temps. La figure 6 montre le développement d'un acinus sur une période de 72 heures.

## CONCLUSIONS

Nous avons validé la vidéo-microscopie sans lentille comme étant une méthode d'imagerie simple et fiable pour l'observation à grande échelle et sur de larges périodes de temps de la vie cellulaire en cultures 2D et 3D dans l'incubateur, et ce sans nécessiter de marquage. Notre vidéo-microscope lève de nombreux verrous de la microscopie conventionnelle en termes de champ de vue et de suivi temps réel des phénomènes biologiques, et ce à bien moindre coût. Nous avons pu observer un vaste éventail de phénotypes cellulaires en utilisant de nombreuses lignées cellulaires différentes, explorant ainsi une partie de la diversité cellulaire de l'être humain. Basé sur un montage d'holographie en ligne, nous avons accès par reconstruction à l'image de la cellule unique avec une résolution autour de 2µm sur un champ de vue de 24µm<sup>2</sup>. Avec la possibilité d'observer une culture cellulaire en 3D, l'imagerie sans lentille s'avère donc être un outil d'un très grand intérêt pour la compréhension des nouveaux modèles d'étude cellulaires toujours plus proches de la réalité physiologique des tissus.

## REFERENCES

- [1] Gabor, D. (1948). A new microscopic principle. *Nature*, **161**, 777-778.
- [2] Repetto, L., Piano, E., & Pontiggia, C. (2004). Lensless digital holographic microscope with light-emitting diode illumination. *Optic Letters*, **29(10)**, 1132-1134.
- [3] Su, T. W., Seo, S., Erlinger, A., & Ozcan, A. (2009). High-throughput lensfree imaging and characterization of a heterogeneous cell solution on a chip. *Biotechnology and bioengineering*, **102(3)**, 856-868.
- [4] Isikman, S. O., Bishara, W., Mavandadi, S., Yu, F. W., Feng, S., Lau, R., & Ozcan, A. (2011). Lens-free optical tomographic microscope with a large imaging volume on a chip. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108(18)**, 7296-301.
- [5] Isikman, S. O., Greenbaum, A., Luo, W., Coskun, A. F., & Ozcan, A. (2012). Giga-pixel lensfree holographic microscopy and tomography using color image sensors. *PloS one*, **7(9)**, e45044.
- [6] Greenbaum, A., Luo, W., Su, T. W., Göröcs, Z., Xue, L., Isikman, S. O. et al. (2012). Imaging without lenses: achievements and remaining challenges of wide-field on-chip microscopy. *Nature Methods*, **9(9)**, 889-895.
- [7] Fienup, J.R. (1982). Phase retrieval algorithms: a comparison. *Applied Optics*, **21(15)**, 2758-69.
- [8] Denis, L., Fournier, C., Fournel, T. & Ducottet, C. (2005). Twin-image noise reduction by phase retrieval in in-line digital holography. *Proceedings SPIE*, **5914**, Wavelets XI, 59140J.
- [9] Kesavan, S. V., Momey, F., Cioni, O., David-Watine, B., Dubrulle, N., Shorte, S., Sulpice, É., Freida, D., Chalmond, B., Dinten, J.-M., Gidrol, X., & Allier, C. (2014). High-throughput monitoring of major cell functions by means of lensfree video microscopy. *Nature Scientific Reports*, **4**, n°5942.
- [10] Dolega, M.E., Allier, C., Kesavan, S. V., Gerbaud, S., Kermarrec, F., Marcoux, P., Dinten, J.-M., Gidrol, X., Picollet-D'hahan, N. (2013). Label-free analysis of prostate acini-like 3D structures by lensfree imaging. *Biosensor and Bioelectronics*, **49**, 176-183.
- [11] Allier, C., Kesavan, S. V., Coutard, J.-G., Cioni, O., Momey, F., Navarro, F., Menneteau, M., Chalmond, B., Obeid, P., Haguët, V., David-Watine, B., Shorte, S., Van Der Sanden, B., Di Natale, C., Hamard, L., Wion, D., Dolega, M.E., Picollet-D'hahan, N., Gidrol, X., Dinten, J.-M. (2014). Video lensfree microscopy 2D and 3D culture of cells. *Proceedings SPIE*, **8947**, Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues XII, 89471H.