Microscopie à fluorescence et tomographie par cohérence optique en plein champ

Houssine Makhlouf, Karen Perronet, Guillaume Dupuis, Sandrine Leveque-Fort, Arnaud Dubois

▶ **To cite this version:**

Houssine Makhlouf, Karen Perronet, Guillaume Dupuis, Sandrine Leveque-Fort, Arnaud Dubois. Microscopie à fluorescence et tomographie par cohérence optique en plein champ. OptDiag 2012 Diagnostic et Imagerie Optique en Médecine et Biologie Biophotonique, May 2012, Paris, France. pp.000. hal-00702695

HAL Id: hal-00702695

https://hal-iogs.archives-ouvertes.fr/hal-00702695

Submitted on 31 May 2012

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.

Microscopie à fluorescence et tomographie par cohérence optique en plein champ

Houssine Makhlouf[1], Karen Perronet[1], Guillaume Dupuis[2], Sandrine Lévêque-Fort[2], Arnaud Dubois[1,2]

[1]Laboratoire Charles Fabry, CNRS UMR 8501, Institut d'Optique Graduate School, Université Paris Sud, 2 avenue Augustin Fresnel, 91127 Palaiseau Cedex, France
[2]Centre de Photonique Biomédicale (CLUPS) – Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay, Université Paris Sud, 91405 Orsay

arnaud.dubois@institutoptique.fr

***Abstract** (Simultaneous optically-sectioned fluorescence and optical coherence microscopy with full-field illumination)*

Full-field optical coherence microscopy (FF-OCM) and optically-sectioned fluorescence microscopy are implemented simultaneously in a dual modality imaging system. Both modalities use a broad field illumination and acquire the entire field of view without raster scanning. Optical sectioning is achieved owing to the coherence gating property of light for FF-OCM, and structured illumination for fluorescence microscopy. The dual modality system provides complementary images in the context of biological tissue screening. FF-OCM shows the tissue micro-architecture, while fluorescence microscopy highlights specific tissue features with cellular-level resolution by using targeting contrast agents. Complementary tissue morphology and biochemical features could potentially improve the understanding of cellular functions and disease diagnosis.

1. Introduction

La tomographie par cohérence optique (OCT) est une technique d'imagerie à balayage basée sur la détection des interférences de la lumière rétrodiffusée par un échantillon avec la lumière réfléchie par une surface dite de référence (1). Cette technique est utilisée pour des applications biomédicales afin d'imager l'architecture de tissus biologiques avec une résolution spatiale micrométrique. Selon le mode de balayage du faisceau, les images peuvent correspondre à des coupes transverses ou *en face*. Dans ce dernier cas, on parle spécifiquement de microscopie par cohérence optique (OCM) (2). La microscopie à fluorescence est une autre technique d'imagerie qui fournit des informations sur les propriétés biochimiques des tissus par le biais de fluorophores endogènes (3) ou exogènes (4). Les techniques d'OCT et d'OCM ont été combinées à la microscopie à fluorescence pour obtenir simultanément des informations morphologiques et fonctionnelles (5, 6). Cependant, le balayage du faisceau en OCT ou OCM ne permet pas une intégration complète avec la microscopie à fluorescence conventionnelle où tout le champ est illuminé sans balayage.

Ici, nous présentons un système hybride d'OCM et d'imagerie à fluorescence en utilisant une approche alternative à l'OCM standard : la microscopie par cohérence optique en plein champ (OCM plein champ) (7, 8). Dans cette technique, tout le champ de vue est éclairé et les images tomographiques *en face* sont obtenues sans balayage. Le principe de l'imagerie plein champ est commun à l'OCM plein champ et à la microscopie à fluorescence classique. De ce fait, il est pertinent de combiner ces deux techniques en un unique instrument.

2. Expérience

Le schéma du montage combinant l'OCM plein champ et la microscopie à fluorescence est représenté sur la figure 1. Des images tomographiques d'OCM plein champ et de fluorescence d'un même échantillon peuvent être obtenues simultanément.

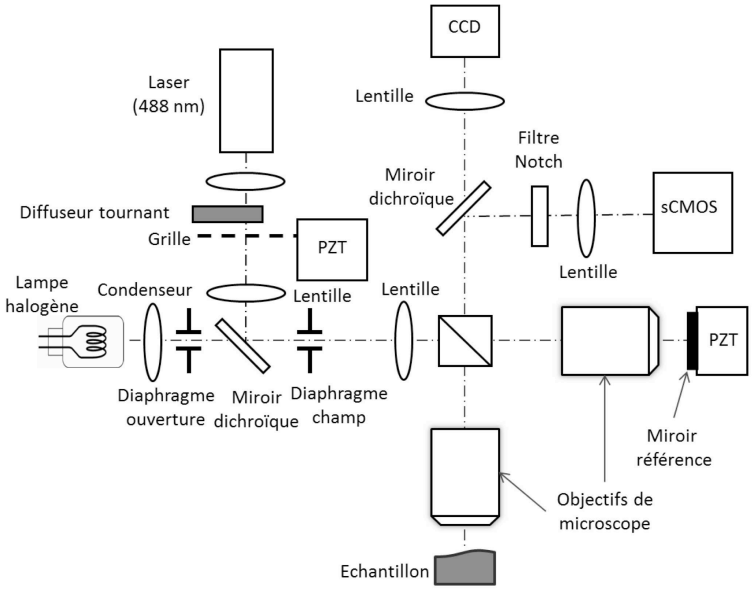

Figure 1 : Schéma du dispositif expérimental combinant OCM plein champ et microscopie à fluorescence par illumination structurée.

2.1 Partie du dispositif dédiée à l'OCM plein champ

La partie OCM plein champ du dispositif expérimental est basé sur le système décrit dans (9). La source lumineuse de faibles cohérences temporelle et spatiale est une lampe halogène. Un dispositif de Köhler permet de réaliser une illumination uniforme de l'échantillon. Le filament de la lampe est imagé dans le plan du diaphragme d'ouverture par un condenseur. Une lentille (focale = 150 mm) renvoie cette image dans le plan focal arrière de deux objectifs de microscope à immersion dans l'eau de grandissement 20 et d'ouverture numérique 0.5.

L'image du filament est ensuite projetée à l'infini dans l'espace objet des objectifs. Un cube séparateur de faisceau divise le faisceau lumineux en deux faisceaux de même intensité, l'un envoyé dans le bras de référence et l'autre dans le bras de l'échantillon d'un interféromètre de type Linnik, correspondant à un interféromètre de Michelson avec un objectif de microscope inséré dans chacun des deux chaque bras. Un miroir de référence (coefficient de réflexion ~ 2%) et un échantillon sont placés dans les plans focaux des objectifs. La longueur du bras de référence est ajustable grâce à une platine de translation motorisée (non représentée sur le schéma), afin de régler la profondeur d'imagerie dans l'échantillon. L'objectif de microscope dans le bras de l'échantillon est monté sur une autre platine motorisée (non représentée sur le schéma) afin d'ajuster la mise au point. La lumière infra-rouge (λ > 700 nm) à la sortie de l'interféromètre est transmise par un miroir dichroïque et focalisée par un doublet achromatique (focale = 300 mm) sur une caméra à capteur CCD (Dalsa, Dalstar 1M15, 1024×1024 pixels). Le miroir de référence est déplacé axialement au moyen d'un transducteur piézo-électrique (PZT). Plusieurs images interférométriques décalées en phase sont enregistrées pour différentes positions du miroir de référence. Une combinaison mathématique de ces images permet de reconstruire l'image tomographique. Nous avons utilisé ici un algorithme basé sur l'acquisition de seulement deux images interférométriques (9).

2.2 Partie du dispositif dédiée à la microscopie de fluorescence

Pour la microscopie à fluorescence, la source de lumière est un laser émettant en continu à la longueur d'onde de 488 nm (Coherent, 488-200 CRDM). La puissance maximale du laser est de 200 mW. Le faisceau laser est injecté dans le système d'imagerie au moyen d'un miroir dichroïque qui réfléchit la lumière visible (λ < 700 nm) et transmet la lumière infra-rouge (λ > 700 nm). Une lame de verre dépolie tournante est placée sur le trajet du faisceau pour supprimer les tavelures (« speckle ») dans les images. Une lentille (focale = 100 mm) permet d'élargir le faisceau afin d'obtenir une surface d'illumination plus grande au niveau de l'échantillon. Un système optique image la surface du verre dépoli dans le plan focal arrière de l'objectif de microscope du bras contenant l'échantillon. Ainsi, le verre dépoli n'est pas visible dans l'image de l'échantillon. Avant d'être imagé, l'échantillon est marqué avec un fluorophore spécifique. Le signal de fluorescence collecté par l'objectif est réfléchi par un miroir dichroïque et focalisé sur une caméra à capteur CCD (Photometrics, CoolSnap HQ, 1392×1040 pixels) par un doublet achromatique (focale = 300 mm). Un filtre coupe-bande « Notch » (Semrock, NF-488) permet de supprimer la lumière d'excitation. Une grille de 20 paires de lignes par millimètre est placée sur le trajet du laser. Elle est imagée dans le plan du diaphragme de champ, conjugué du plan de l'échantillon. Un système optique formé d'une paire de doublets achromatiques (chacun de focale f = 60 mm) réalise une imagerie 1:1. La grille est montée sur un transducteur piézo-électrique qui contrôle son positionnement transverse. Trois images de l'échantillon sont enregistrées pour trois positions de la grille, chacune décalée d'un tiers de la période de la grille par rapport à la position précédente. Ces images sont ensuite combinées pour éliminer le motif de la grille et obtenir l'image de fluorescence tomographique selon la technique dite de microscopie par illumination structurée (10).

2.3 Combinaison des images d'OCM plein champ et de fluorescence

Les images d'OCM plein champ d'une part et de fluorescence d'autre part peuvent être présentées séparément ou être superposées pour mettre en évidence des informations complémentaires. Les capteurs utilisés pour chaque type d'imagerie ont des tailles et un nombre de « pixels » différents. Il est nécessaire de rogner et d'interpoler l'image initiale d'OCM plein champ pour que son champ de vue corresponde à celui de l'image en fluorescence et que les deux images comportent le même nombre de points.

3. Résultats et performances du système

3.1 Résolutions spatiale et temporelle

La fonction de cohérence temporelle associée à la lampe halogène a été déterminée expérimentalement. Sa largeur à mi-hauteur donne la résolution axiale de l'imagerie par OCM plein champ. Nous avons mesuré 1,5 µm dans l'air (1,1 µm dans un tissu biologique en supposant que l'indice de réfraction vaut 1,4). La résolution transverse théorique est de 0,9 µm pour un spectre effectif centré autour de 800 nm. Typiquement, 10 images d'OCM sont moyennées afin d'augmenter la plage dynamique et donc le rapport signal à bruit. Nous avons mesuré alors une sensibilité de détection de 89 dB.

Nous avons mesuré la réponse impulsionnelle (« point-spread function ») du système d'imagerie par fluorescence à l'aide de billes fluorescentes. Nous avons mesuré une résolution transverse de 0,7 µm avec des billes de 0,5 µm de diamètre, ce qui est comparable à la valeur théorique de 0,6 µm à la longueur d'onde de 520 nm (longueur d'onde centrale du spectre d'émission des billes excitées à 488 nm). En enregistrant un empilement d'images acquises à différentes profondeurs de billes de diamètre 1 µm, nous avons pu mesurer une résolution axiale de 6,0 µm, à comparer à la valeur théorique de 4,5 µm calculée sur la base de la largeur à mi-hauteur de la réponse impulsionnelle axiale comme indiqué dans (10). Nous attribuons la différence entre les valeurs expérimentale et théorique à la présence d'aberrations optiques, en particulier les aberrations du système d'imagerie de la grille sur l'échantillon.

L'acquisition simultanée d'une image de fluorescence tomographique et d'une image d'OCM plein champ (moyenne de 10 images) dure 2,7 s. Il est possible d'accumuler moins d'images afin d'accélérer la cadence d'acquisition, au détriment toutefois de la sensibilité de détection. Ce compromis peut être intéressant lorsque l'objet à imager n'est pas stable dans le temps.

3.2 Exemples d'images de tissus biologiques

Des échantillons provenant de tissus de souris excisés ont été colorés localement avec de l'acridine orange (AO), et placés entre lame et lamelle. L'AO est un marqueur spécifique des acides nucléiques présentant deux longueurs d'onde d'émission maximales. La première, située autour de 520 nm, est caractéristique d'une liaison à l'ADN et celle autour de 650 nm

d'une liaison à l'ARN. Une goutte d'eau distillée déposée sur la lamelle sert de milieu d'immersion pour l'objectif de microscope. Les images obtenues à partir d'échantillons de langue et de côlon sont présentées sur les figures 2 et 3, respectivement. Les figures 2 (a) et 2 (b) montrent respectivement l'image de fluorescence classique et l'image de fluorescence tomographique. Dans cette seconde image, la majorité de la lumière provenant de réflexions hors du plan de mise au point est rejetée. La structure générale de l'échantillon de langue est révélée par l'image d'OCM plein champ présentée sur la figure 2 (c). L'image de fluorescence et l'image d'OCM plein champ sont colorées en vert et rouge respectivement ; la superposition de ces deux images, sur la figure 2 (d), permet une comparaison directe. Les structures fluorescentes nucléiques délimitent le bord des papilles. La figure 3 correspond à l'échantillon de colon. Les figures 3 (a) et 3 (b) montrent respectivement l'image de fluorescence tomographique et l'image d'OCM plein champ, tandis que la figure 3 (c) montre leur superposition en fausses couleurs. L'image de fluorescence fournit une information sur la position des noyaux des cellules individuelles, tandis que les données d'OCM plein champ montrent l'organisation fibreuse du tissu conjonctif. D'autres images obtenues avec ce dispositif sont publiées dans (11).

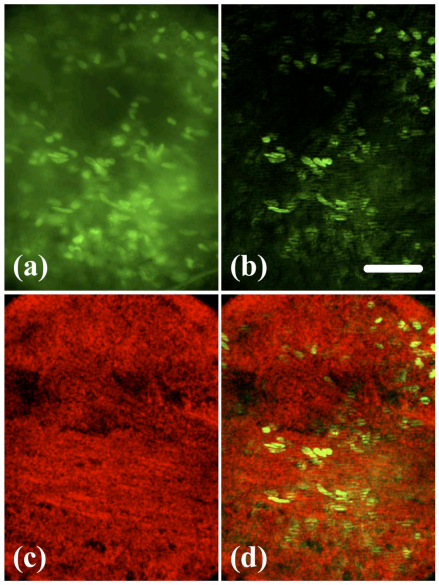

Figure 2 : Images de fluorescence conventionelle (a), de fluorescence tomographique (b) et d'OCM plein champ (c) en fausses couleurs, de côlon de souris marquée à l'acridine orange. (d) : superposition de (b) et (c). La barre blanche représente 50 µm.

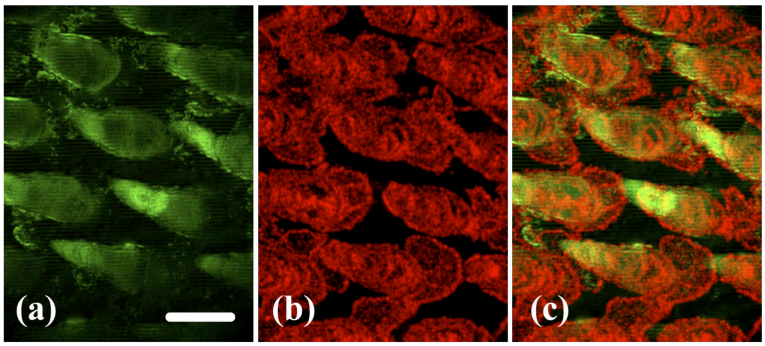

Figure 3 : Images de fluorescence tomographique (a) et d'OCM plein champ (b) en fausses couleurs, de langue de souris marquée à l'acridine orange. (c) : superposition de (a) et (b). La barre blanche représente 50 µm.

4. Discussion

Les images de microscopie à fluorescence et d'OCM plein champ fournissent des informations morphologiques différentes. Les images de microscopie à fluorescence pourraient aussi apporter des informations sur des processus biochimiques cellulaires. Un système intégré capable de combiner microscopie à fluorescence tomographique et OCM plein champ présente donc un intérêt potentiel important pour des applications biomédicales, en fournissant des informations complémentaires lors de l'investigation optique des propriétés biologiques des tissus. Ce système pourrait contribuer à une meilleure compréhension de certaines fonctions cellulaires, améliorer la capacité à détecter des pathologies en mesurant simultanément des changements morphologiques et biochimiques au sein des tissus. Par exemple, ce système d'imagerie pourrait être utilisé lors pour des examens d'anatomopathologie. Des échantillons de tissus excisés pourraient être explorés avec un minimum de préparation, contrairement aux méthodes standard d'histopathologie.

La nouveauté du système combinant microscopie à fluorescence et OCM plein champ réside dans le fait que tout le champ de vue est imagé sans avoir à balayer un faisceau sur l'échantillon. De plus, le système d'imagerie de fluorescence décrit ici est basé sur une technique d'illumination structurée. Ce système présente une grande flexibilité dans le choix des marqueurs fluorescents. La seule limitation concerne le spectre d'émission du marqueur qui doit être en deçà de 700 nm. Le laser d'excitation peut toutefois être changé en fonction du choix du marqueur. Des objectifs de microscope de plus grande ouverture numérique peuvent aussi être utilisés pour améliorer la résolution transverse des deux systèmes d'imagerie et la résolution axiale de l'image de fluorescence tomographique. L'acquisition simultanée des deux images permet la visualisation de la même zone de l'échantillon sans être gêné par un déplacement éventuel de l'échantillon, qui doit être cependant négligeable durant la durée de l'acquisition.

La profondeur d'imagerie est limitée par l'absorption et surtout la diffusion de la lumière dans les tissus. C'est l'imagerie par fluorescence qui fixe la profondeur limite accessible. Ceci est dû au fait que, dans les tissus biologiques, la lumière visible est davantage diffusée que la

lumière infra-rouge (12) et que les techniques basées sur la détection d'intensité sont moins sensibles que les méthodes interférométriques (13).

5. Conclusion

Nous avons présenté un nouveau système d'imagerie combinant deux techniques complémentaires. Ce système peut fournir des images en coupe à haute résolution obtenues simultanément par OCM plein champ et par microscopie à fluorescence. Le sectionnement optique pour l'OCM plein champ est obtenu grâce aux propriétés de cohérence temporelle de la source d'éclairage. Pour les images de fluorescence, le sectionnement optique provient de la technique d'illumination structurée. La géométrie du système permet d'obtenir des images plein champ sans balayer l'échantillon. Les deux techniques d'imagerie permettent de différentier des structures dans les échantillons biologiques. La combinaison des deux types de données obtenues fournit des informations complémentaires et pourrait servir d'outil de diagnostic ou pour étudier des fonctions cellulaires en se basant sur l'étude de la morphologie des tissus et de leurs propriétés biochimiques.

Remerciements

Les auteurs remercient le Réseau Thématique de Recherche Avancée, pour avoir financé ces travaux. Ils sont reconnaissants envers C. Martin et F. Pain qui ont fourni les tissus animaux. L'Institut d'Optique *Graduate School* est membre du réseau européen Photonics4Life.

Bibliographie

1. Hariri LP, Bonnema GT, Schmidt K, Winkler AM, Korde V, Hatch KD, et al. Laparoscopic optical coherence tomography imaging of human ovarian cancer. Gynecologic Oncology. 2009;114(2):188-94. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.05.014.
2. Izatt JA, Hee MR, Owen GM, Swanson EA, Fujimoto JG. OPTICAL COHERENCE MICROSCOPY IN SCATTERING MEDIA. Optics Letters. 1994;19(8):590-2. doi: 10.1364/ol.19.000590.
3. Pavlova I, Williams M, El-Naggar A, Richards-Kortum R, Gillenwater A. Understanding the biological basis of autofluorescence imaging for oral cancer detection: High-resolution fluorescence microscopy in viable tissue. Clinical Cancer Research. 2008;14(8):2396-404. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-07-1609.
4. Muldoon TJ, Pierce MC, Nida DL, Williams MD, Gillenwater A, Richards-Kortum R. Subcellular-resolution molecular imaging within living tissue by fiber microendoscopy. Optics Express. 2007;15(25):16413-23. doi: 10.1364/oe.15.016413.
5. Rosen RB, Hathaway M, Rogers J, Pedro J, Garcia P, Laissue P, et al. Multidimensional en-Face OCT imaging of the retina. Optics Express. 2009;17(5):4112-33.
6. Yuan SA, Li Q, Jiang J, Cable A, Chen Y. Three-dimensional coregistered optical coherence tomography and line-scanning fluorescence laminar optical tomography. Optics Letters. 2009;34(11):1615-7.
7. Vabre L, Dubois A, Boccara AC. Thermal-light full-field optical coherence tomography. Optics Letters. 2002;27(7):530-2. doi: 10.1364/ol.27.000530.

8. Dubois A, Grieve K, Moneron G, Lecaque R, Vabre L, Boccara C. Ultrahigh-resolution full-field optical coherence tomography. Applied Optics. 2004;43(14):2874-83. doi: 10.1364/ao.43.002874.
9. Dubois A, Moneron G, Grieve K, Boccara AC. Three-dimensional cellular-level imaging using full-field optical coherence tomography. Physics in Medicine and Biology. 2004;49(7):1227-34. doi: 10.1088/0031-9155/49/7/010.
10. Neil MAA, Juskaitis R, Wilson T. Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope. Optics Letters. 1997;22(24):1905-7. doi: 10.1364/ol.22.001905.
11. Makhlouf H, Perronet K, Dupuis G, Lévêque-Fort S, Dubois A. Simultaneous optically sectionned fluorescence and optical coherence microscopy with full-field illumination. Optics Letters. 2012;37. doi: 10.1364/OL.37.001613.
12. Taroni P, Pifferi A, Torricelli A, Comelli D, Cubeddu R. In vivo absorption and scattering spectroscopy of biological tissues. Photochemical & Photobiological Sciences. 2003;2(2):124-9. doi: 10.1039/b209651j.
13. Beaurepaire E, Moreaux L, Amblard F, Mertz J. Combined scanning optical coherence and two-photon-excited fluorescence microscopy. Optics Letters. 1999;24(14):969-71. doi: 10.1364/ol.24.000969.