

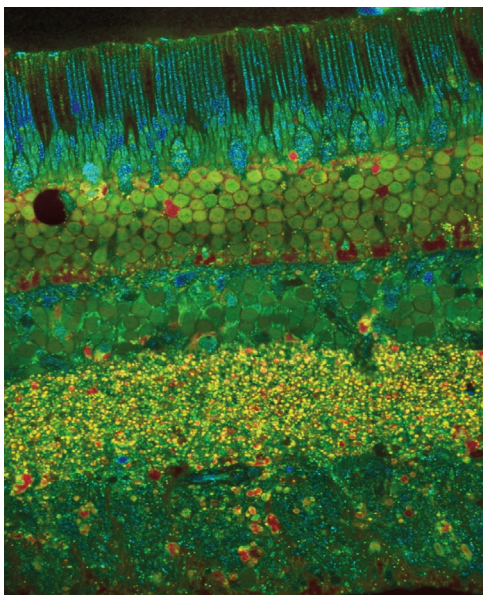
IMAGERIE 3D EN DIRECT : LA TOMOGRAPHIE PAR COHÉRENCE OPTIQUE DYNAMIQUE

Tual MONFORT¹, Salvatore AZZOLLINI¹, Nathaniel NORBERG¹, Olivier THOUVENIN², Kate GRIEVE^{1*}

¹ Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, 17 rue Moreau, et CHNO des Quinze-Vingts, INSERM-DGOS CIC 1423, 28 rue de Charenton, F-75012 Paris, France.

² Institut Langevin, ESPCI Paris, Université PSL, 1 rue Jussieu, 75005 Paris, France.

*kate.grieve@inserm.fr



Pour accompagner la révolution des cultures cellulaires dérivées de cellules souches pluripotentes humaines, qui permettent la modélisation de maladies, le développement de thérapies et la médecine personnalisée sans recourir à des modèles animaux, les outils d'imagerie adaptés font défaut. La tomographie par cohérence optique plein champ dynamique offre un contraste métabolique pour une imagerie haute résolution non invasive, sans marquage, et en direct dans les cultures 2D et 3D, pour l'étude longitudinale de cellules et d'échantillons humains.

<https://doi.org/10.1051/photon/202412737>

Article publié en accès libre sous les conditions définies par la licence Creative Commons Attribution License CC-BY (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), qui autorise sans restrictions l'utilisation, la diffusion, et la reproduction sur quelque support que ce soit, sous réserve de citation correcte de la publication originale.

Les progrès récents des techniques de culture cellulaire ont conduit à l'utilisation croissante de cultures cellulaires 2D dérivées de cellules souches, et d'organoides qui sont les structures cellulaires 3D équivalentes et s'approchant de tissus humains cultivés in vitro. Pour quantifier la toxicité et l'efficacité des médicaments sur les organoides dérivés des patients avec une préparation minimale et sans les détruire au cours du processus, les outils d'imagerie

commerciaux font actuellement défaut. La tomographie dynamique par cohérence optique plein champ (DFFOCT), développée par notre groupe à Paris, offre une solution susceptible de répondre aux besoins des communautés de la recherche et de l'industrie pharmaceutique [1].

ORIGINES DE LA SOLUTION TECHNOLOGIQUE

La tomographie par cohérence optique (OCT) est souvent décrite comme l'équivalent optique de l'imagerie échographique, car elle

s'appuie sur la mesure des échos lumineux pour étudier les tissus en couches de manière non invasive [2]. Ces mesures sont réalisées par interférométrie optique puisqu'aucun dispositif électronique n'est capable de résoudre temporellement les échos provenant de structures espacées de seulement quelques microns. Le faisceau provenant d'une source lumineuse à faible cohérence temporelle est divisé en deux parties, une partie allant au bras d'échantillon où il est rétrodiffusé depuis les structures d'échantillon internes situées ●●●

à différentes profondeurs, tandis que l'autre partie est réfléchi par un miroir de référence placé à une distance qui correspond aux temps de propagation des deux faisceaux, afin qu'ils puissent interférer une fois recombines. La quantité de lumière rétrodiffusée dépend des différences dans la distribution de l'indice de réfraction à partir d'un emplacement confiné à l'intérieur de l'échantillon. Grâce à la faible cohérence, l'OCT ne détecte que la lumière rétrodiffusée depuis un plan de cohérence dont la localisation en profondeur est choisie en ajustant la longueur du bras de référence, conduisant à une capacité de sectionnement qui dépend de la bande passante de la source, et est donc découplée de la résolution latérale. La résolution axiale de l'OCT peut donc dépasser la limite théorique de diffraction axiale contraignant les microscopies à grand champ et confocales. Grâce à ces attributs, l'OCT a été largement utilisée depuis son invention, notamment pour le diagnostic médical, où un large champ de vue mais également une imagerie haute résolution sont souhaitables. Jusqu'à présent, l'OCT a principalement été utilisée pour fournir des informations morphologiques basées sur la lumière rétrodiffusée provenant de structures présentant différents indices

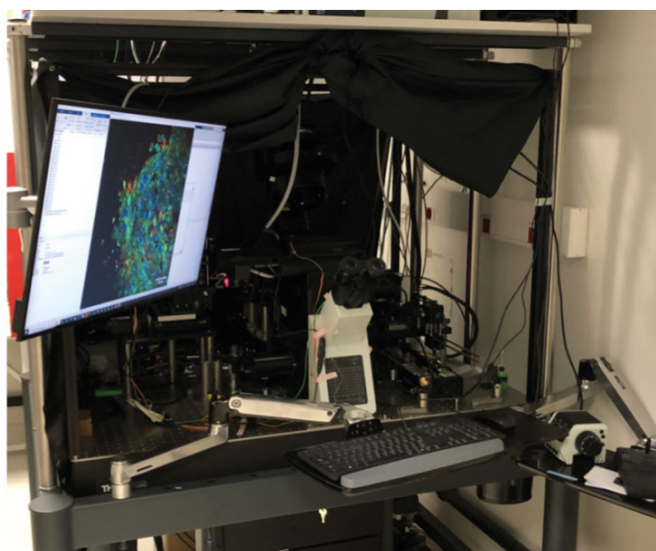
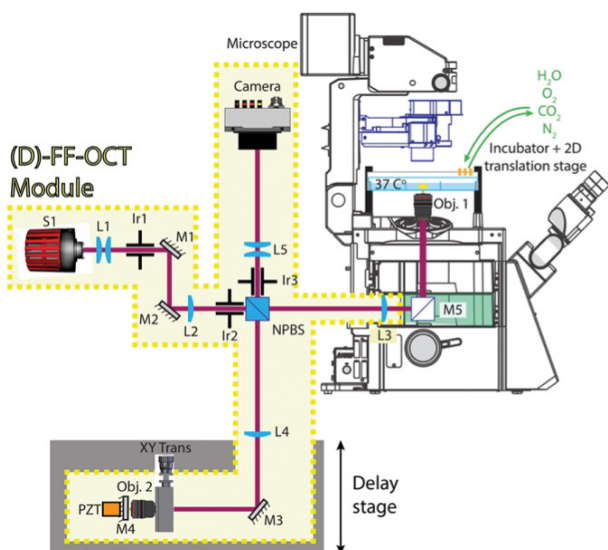
de réfraction à l'intérieur des tissus, comme l'observation des couches rétiniennes ou l'organisation de la matrice extracellulaire. Néanmoins, grâce à sa vitesse d'imagerie et à ses capacités de sensibilité, l'étude des variations temporelles du signal OCT permet de quantifier la façon dont une grande variété de structures biologiques se déplacent, se développent ou se remodelent au fil du temps, ajoutant potentiellement un niveau de caractérisation plus élevé pouvant être utilisé pour augmenter la spécificité de l'OCT.

Tirer parti de ce comportement temporel, à différentes échelles de temps, a permis aux chercheurs d'avoir un aperçu plus approfondi des mécanismes cellulaires et subcellulaires, conduisant progressivement à la mise en place d'une technique d'imagerie fonctionnelle non invasive sans marquage appelée OCT dynamique (D-OCT). [2]. L'idée principale est de collecter le signal provenant de la même zone d'imagerie au fil du temps afin de générer une série de trames qui contiendront l'évolution temporelle du signal d'interférences. Les fluctuations temporelles rapides

(0,1 à 20 Hz) du signal OCT dans les échantillons vivants reposent généralement sur un transport actif à l'intérieur des cellules, nécessitant donc des cellules vivantes produisant et consommant de l'énergie (typiquement sous forme d'ATP) et une organisation fonctionnelle du cytosquelette [2]. Dans certaines cellules, y compris les cellules épithéliales pigmentées de la rétine, il a été démontré que le signal D-OCT provenait principalement du transport mitochondrial [3].

Comme le confirme l'histologie corrélative et/ou la microscopie à fluorescence, le D-OCT permet la visualisation de cellules spécifiques et de leurs noyaux, permettant ainsi l'identification de l'état mitotique des cellules [1], tandis que les fluctuations temporelles peuvent être stimulées par une motilité cellulaire accrue ou des fluctuations membranaires, comme dans les leucocytes, les lymphocytes et les globules rouges, démontrant ainsi le potentiel d'identifier spécifiquement certains types de cellules. En conséquence, grâce à la grande variété de structures qu'il peut identifier, le D-OCT évite le besoin de marqueurs fluorescents, surmontant ainsi les inconvénients liés à la phototoxicité et aux biais introduits par ces outils. Cela permet également de s'affranchir de la plupart des étapes de préparation des échantillons.

Figure 1. Schéma de configuration du D-FFOCT et photographie du microscope à l'Institut de la Vision à Paris.



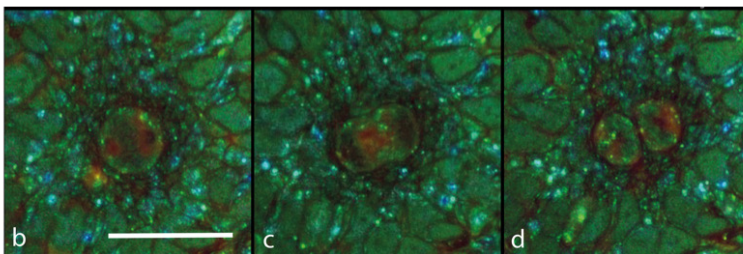
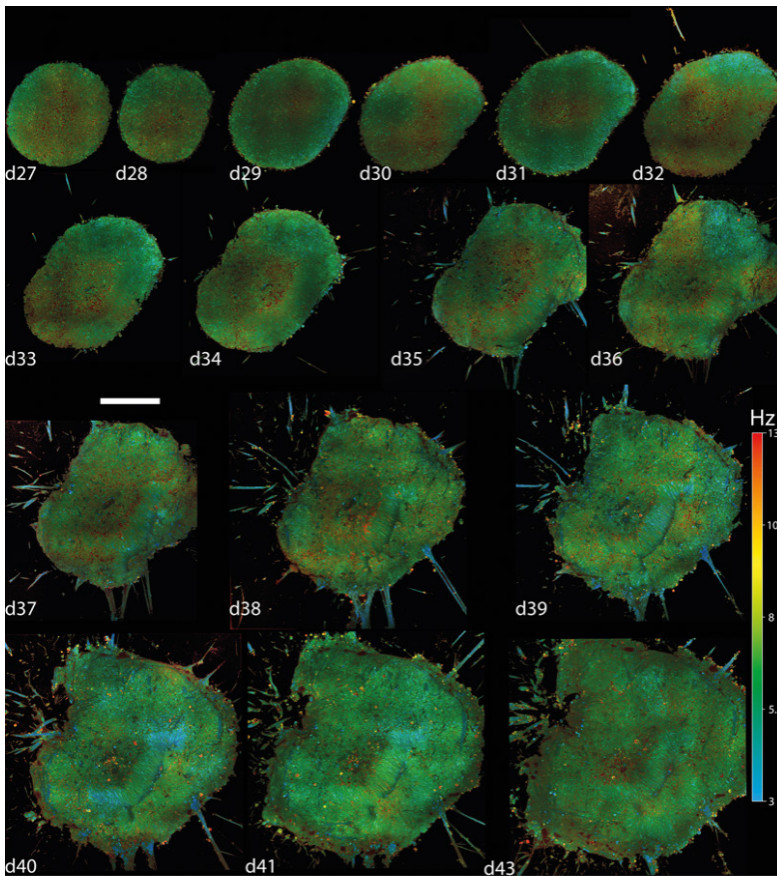


Figure 2. Adapté de [4]. Organoïde suivi pendant 17 jours en culture (barre échelle 50µm) et zoom sur un événement de mitose se produisant sur une échelle de temps de quelques minutes (panels temps T0, T0+8 minutes, T0+16 minutes ; barre échelle 20 µm).

Les images d'OCT dynamiques n'utilisent aucun marquage fluorescent. Au lieu de cela, les images couleur sont construites en attribuant une carte de couleurs qui reflète le niveau d'activité intracellulaire, avec des couleurs vives et chaudes indiquant un comportement métabolique distinct, élevé et rapide. Ainsi, les cellules rouge brillant sont très actives avec des mouvements d'organelles rapides à une fréquence particulière, tandis que les cellules bleu terne sont lentes et à large contenu fréquentiel. Les cellules deviennent rouge vif avant un événement de mitose par exemple.

PRO-LITE
TECHNOLOGY

Métrieologie AR/VR

La réalité augmentée et la réalité virtuelle sont souvent basées sur l'utilisation d'écrans miniatures, les NED (Near-Eye Displays).



PUBLI-RÉDACTIONNEL

L'AR-VR touche aujourd'hui un nombre d'applications croissant : la défense, le médical, l'éducation, le divertissement, le tourisme, le sport, l'ingénierie...

Pour répondre au mieux aux différents besoins et garantir la meilleure expérience utilisateur, les fabricants et intégrateurs de NED travaillent à augmenter les performances de leurs produits : la résolution, la netteté, le contraste, les couleurs...



Pour caractériser ces différents paramètres, ainsi que pour répondre aux enjeux liés à la sécurité/santé des utilisateurs (du fait de la proximité de l'œil avec les écrans), Pro-Lite Technology propose des vidéophotomètres et vidéocolorimètres équipés de lentilles spéciales, conçus par Westboro Photonics pour s'adapter aux configurations NED.

Les systèmes de Westboro fournissent des images étalonnées en luminance et couleur. Le logiciel permet leur traitement, afin d'obtenir les valeurs d'uniformité, de contraste, mais aussi de détecter des défauts tels que les pixels morts, pixels brillants, bulles, lignes... ●

CONTACT

Nicolas Marlet,
nicolas.marlet@pro-lite.fr
+33 (0)5 47 48 90 70

TOMOGRAPHIE DYNAMIQUE PAR COHÉRENCE OPTIQUE PLEIN CHAMP: CONFIGURATION OPTIQUE, VISUALISATION D'IMAGES, ET QUANTIFICATION

Nous avons développé une variante de D-OCT appelé OCT plein champ dynamique (D-FFOCT) qui utilise une caméra 2D pour capturer des images plan par plan dans la profondeur de l'échantillon. Un module D-FFOCT a été conçu par l'équipe pouvant s'interfacer avec un microscope conventionnel (Figure 1) afin que les utilisateurs biologistes puissent facilement adopter cette nouvelle modalité d'imagerie et valider leurs résultats par comparaison avec des images de microscopie standard. Les échantillons 3D tels que les organoïdes rétiniens [4] et les échantillons 2D tels que les fibroblastes [5] peuvent être imagés.

Les échantillons sont contenus dans un micro-incubateur (de platine) qui les maintient dans des conditions de culture tout au long de la procédure d'imagerie, ce qui signifie qu'ils peuvent être suivis sur des périodes de quelques secondes, heures, jours, voire mois, sans endommager l'échantillon. L'utilisation d'une faible puissance d'illumination couplée aux longueurs d'onde infrarouges utilisées (810 nm $\pm$ 25 nm) permet de n'observer aucune phototoxicité. Des images en volume à travers la profondeur de l'échantillon peuvent être acquises, ou un plan de profondeur fixe peut être choisi si nous souhaitons suivre la croissance et les modifications de l'échantillon au fil du temps.

Les images d'OCT dynamiques sont calculées dans l'espace colorimétrique Teinte-Saturation-Luminosité (Hue-Saturation-Brightness, HSB). La teinte est calculée avec la fréquence moyenne, du bleu (basses fréquences temporelles) au rouge (hautes fréquences temporelles). La saturation est calculée comme l'inverse de la bande passante de fréquence ; par conséquent, un signal avec une bande passante plus large (par exemple, un bruit blanc) semble terne, alors qu'un

signal avec une bande passante étroite semble vif. La luminosité est calculée comme l'écart type courant.

Les travaux futurs comprennent la quantification des images acquises pour tendre vers des informations spécifiques. Nous travaillons actuellement sur des outils basés sur l'IA pour automatiser la segmentation cellulaire et l'analyse des caractéristiques cellulaires et subcellulaires dans le but d'aider le biologiste à évaluer la morphologie, l'état métabolique, la croissance, la dégénérescence ou l'effet thérapeutique de son échantillon.

APPLICATIONS : IMAGERIE D'ORGANOÏDES RÉTINIENS

Le D-FFOCT a été utilisé dans divers échantillons biologiques, depuis les organoïdes intestinaux jusqu'au poisson zèbre vivant. Ici, nous soulignons l'imagerie des organoïdes rétiniens [1, 4].

La figure 2 montre un organoïde rétinien au cours du développement, suivi pendant 17 jours dans des conditions de culture. Zoomer sur l'ensemble de données permet d'identifier des événements biologiques tels que la mitose, montrée dans la rangée inférieure de la figure 2.

Les organoïdes peuvent être utilisés dans la modélisation de maladies, où les cellules de patients peuvent être cultivées pour reproduire une maladie génétique, par exemple, ce qui peut conduire à la dégénérescence de l'organoïde. L'imagerie en direct avec le D-FFOCT permet donc le

suivi des mêmes organoïdes pendant la croissance et la dégénérescence pour aider à mieux comprendre l'origine de la maladie et à identifier les cibles thérapeutiques. Les effets d'éventuelles thérapies peuvent également être suivis par imagerie, ce qui promet des applications futures en médecine personnalisée.

Les images dynamiques n'utilisent aucun marquage d'OCT fluorescent. Au lieu de cela, les images couleur sont construites en attribuant une carte de couleurs qui reflète le niveau d'activité intracellulaire, avec des couleurs vives et chaudes indiquant un comportement métabolique distinct, élevé et rapide. Ainsi, les cellules rouge brillant sont très actives avec des mouvements d'organelles rapides à une fréquence particulière, tandis que les cellules bleu terne sont lentes. Les cellules deviennent rouge vif avant un événement de mitose par exemple (figure 2).

CONCLUSION

En conclusion, le D-FFOCT est une technique prometteuse d'imagerie en 3D, en direct, et non invasive d'échantillons pouvant être utilisée dans des contextes médicaux. Aucun marqueur fluorescent n'est nécessaire car la carte des couleurs illustre l'activité subcellulaire naturelle de l'échantillon. Nous avons développé une solution modulaire D-FFOCT intégrable dans les microscopes standards. Nous prévoyons son utilisation croissante pour accompagner le marché croissant des organoïdes dérivés de patients. ●

RÉFÉRENCES

- [1] J. Scholler, K. Groux, O. Goureau, *et al.*, *Light Sci. Appl.* **17**, 9:140 (2020)
- [2] S. Azzollini, T. Monfort, O. Thouvenin, K. Grieve, *Biomed. Opt. Express* **14**, 3362 (2023)
- [3] K. Groux, A. Verschuere, C. Nanteau *et al.*, *Commun. Biol.* **5**, 575 (2022)
- [4] T. Monfort, S. Azzollini, J. Brogard *et al.*, *Commun. Biol.* **6**, 992 (2023)
- [5] T. Monfort, S. Azzollini, T. Ben Yacoub, *Biomed. Opt. Express* **14**, 3491 (2023)