

DE LA TOMOGRAPHIE OPTIQUE PAR COHÉRENCE PLEIN CHAMP (FFOCT) À LA TOMOGRAPHIE OPTIQUE PAR TRANSMISSION PLEIN CHAMP (FFOTT)

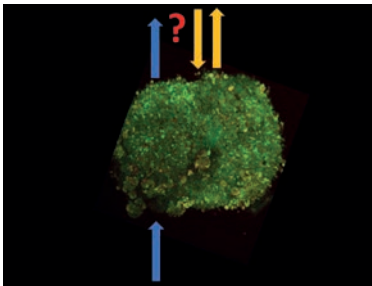
Viacheslav MAZLIN¹, Samer ALHADDAD¹, Martine BOCCARA², Thomas MALDINEY³, Olivier TOUVENIN¹ et Claude BOCCARA^{1,*}

¹ Institut Langevin ESPCI Université PSL, 1 rue Jussieu 75005 Paris

² ISYEB, Muséum National d'Histoire Naturelle, Sorbonne Université, 57 rue Cuvier, 75005 Paris

³ Service de Réanimation - Surveillance Continue, Centre Hospitalier William Morey, 4 rue Capitaine Drillien, 71100 Chalon-sur-Saône

*claud.boccara@espci.fr



La tomographie par cohérence optique ou OCT a révolutionné le diagnostic oculaire. Nous avons proposé une variante de l'OCT, dite « plein champ » (FFOCT) dont les principales applications se sont situées en cancérologie ex et in vivo. Nous souhaitons ici introduire une nouvelle méthode de tomographie plein champ par transmission (FFOTT) et comparer les avantages et inconvénients des deux méthodes.

<https://doi.org/10.1051/photon/202312331>

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.

PRINCIPE ET MONTAGE DE FFOCT ET FFOTT

La tomographie optique cohérente est une technique interférométrique mise au point en 1991 et qui a eu un impact majeur dans l'imagerie de l'œil en permettant l'observation des couches cellulaires de la rétine en coupe virtuelle (voir l'article publié dans Photoniques N95, [1]). Après plus de vingt ans d'utilisation de cette méthode de tomographie optique pour laquelle le « sectionnement optique » est obtenu par l'utilisation d'interférences avec des sources à spectres larges, nous avons récemment proposé une nouvelle méthode de tomographie optique par

transmission basée sur l'utilisation de la phase de Gouy.

Un montage permettant l'observation du même plan de sectionnement optique par les deux méthodes est représenté sur la figure 1. En suivant les chemins de la lumière nous nous proposons de décrire les deux méthodes que nous illustrerons par la suite.

Le but des deux méthodes de tomographie que nous décrivons ici est d'observer des échantillons dont les microstructures diffusent la lumière, comme les organelles des cellules, ou les fibres de collagène des tissus biologiques.

FFOCT est une technique interférométrique dans laquelle la lumière

rétrodiffusée par l'échantillon diffusant interfère avec le faisceau de référence réfléchi par un miroir (encadrement bleu de la figure 1). D'un autre côté, FFOTT est aussi une approche interférométrique opérant par transmission et utilisant un chemin optique commun : le faisceau lumineux incident se propage, en effet, le long du même chemin que le faisceau diffusé par l'échantillon (encadrement rouge de la figure 1). Bien que se propageant le long du même chemin, le faisceau d'éclairage et le faisceau échantillon interfèrent avec un déphasage qui varie entre $-\pi/2$ et $\pi/2$ autour du foyer de l'objectif de microscope sur une distance sensiblement égale à la profondeur ●●●

de champ de l'objectif du microscope et qui se nomme déphasage de Gouy.

Nous sommes tous familiers de l'utilisation l'interféromètre de Michelson et de sa variante Linnik (avec un objectif dans chacun des bras) que l'on voit sur la figure 1, dans ce cas le « sectionnement » optique dans le milieu diffusant et la sélection des photons balistiques rétrodiffusés (ceux qui ont échappé à la diffusion) sont en général imposés par la longueur de cohérence temporelle de la source (liée à sa largeur spectrale). Mais nous utilisons aussi des sources incohérentes spatialement comme les LEDs qui sont peu bruyantes et permettent une détection, avec des caméras, limitée par le bruit shot avec un rapport signal sur bruit de la centaine de dB pour une mesure moyennée sur une seconde (2).

Sans doute sommes-nous moins familiers de « la phase de Gouy » découverte par ce très talentueux physicien lyonnais il y a plus d'un siècle. Le déphasage de Gouy est un déphasage de π qui se produit lorsqu'une onde convergente passe par son centre, il s'agit d'une propriété générale de toutes les ondes (électromagnétiques, acoustiques, etc.). Le déphasage de π est associé à une structure d'onde à 3 dimensions (comme celle d'une onde optique issue d'un objectif de microscope) et il est différent ($\pi/2$) pour une onde à 2 dimensions (comme une onde acoustique issue d'une barrette ultrasonore).

Pour se donner une idée de la PSF axiale que l'on obtient en FFOTT, nous utilisons l'approximation gaussienne du faisceau issu de la diffusion de la lumière par une particule afin de disposer d'une expression analytique simple (3) : un objet de très petite taille éclairé par une onde incidente diffuse une onde quasi-sphérique dont l'ouverture angulaire est limitée par celle de l'objectif de microscope. Les ondes incidentes et diffusées interfèrent, et sur la caméra on observe alors une image limitée par la diffraction avec une intensité plus faible ou plus forte que le fond

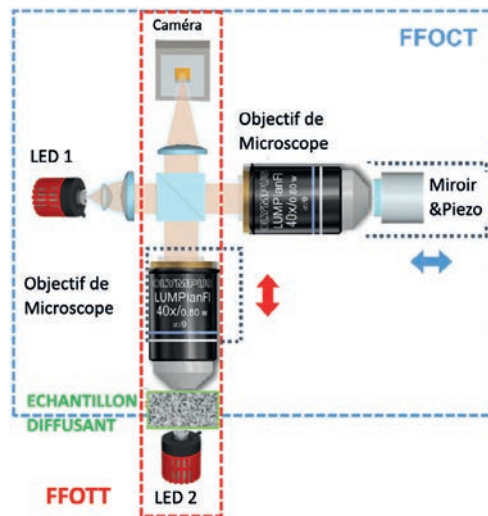


Figure 1. Montage permettant l'observation d'une même "tranche" d'un échantillon diffusant par FFOCT (encadrement bleu) et FFOTT (encadrement rouge). Figure adaptée de la référence (3).

selon que l'objet se trouve avant ou après le foyer (interférence constructive ou destructive).

MÉRITES ET LIMITES DE FFOCT ET FFOTT

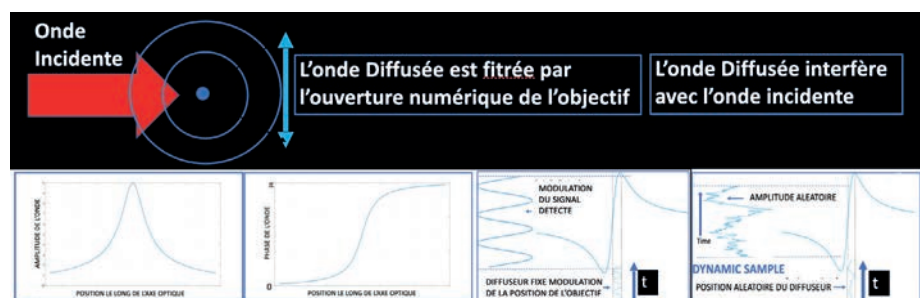
On peut voir sur la figure 1 à quel point le montage de FFOTT est simple, cependant la première limite qu'il est aisé de se représenter est que, à la différence de FFOCT qui utilise un faisceau de référence qui n'a pas été dégradé au cours de sa propagation, FFOTT utilise un faisceau de référence qui sera perturbé par la

traversée de l'échantillon (aberrations, diffusion). Pour un échantillon dont l'épaisseur est supérieure à la longueur de transport, longueur au bout de laquelle les photons incidents ont perdu la direction de leur vecteur d'onde initiale (typiquement 1 mm dans les tissus biologiques), la perte de cohérence spatiale annihilera le signal d'interférence. FFOCT sera donc principalement limité aux échantillons optiquement peu épais ou transparents.

Les points qui sont, par contre, à l'avantage de l'OTT se trouvent dans le niveau des signaux détectés. En effet les objets qui diffusent la lumière, dès qu'ils possèdent une taille supérieure au quart de la longueur d'onde λ de l'éclairage, le font préférentiellement vers l'avant : par exemple pour un objet de taille $\lambda/2$ un calcul de diffusion de Mie montre que la section efficace de diffusion est mille fois plus grande vers l'avant (ici transmission) que vers l'arrière (rétrodiffusion).

Le choix de l'ouverture numérique d'éclairage (ON_e) en transmission est aussi critique : si l'échantillon est constitué de structures de tailles $\ll \lambda$, les angles de diffusion couvriront l' ON_o de l'objectif quel que soit ON_e et on atteindra la résolution, donc la profondeur de champ de l'objectif. Si la diffusion est très anisotrope, il faudra augmenter ON_e sans toutefois atteindre ON_o , ce qui risquerait de trop réduire la cohérence spatiale (Théorème de Van Cittert Zernike).

Figure 2. La partie supérieure de la figure schématise le principe de l'OTT. En dessous les images représentent, autour du foyer, l'amplitude du champ diffusé (A), sa phase (B), la forme du signal d'interférence pour une modulation périodique (C) ou aléatoire (D) de la distance particule/ objectif.



GUIDES DE LUMIÈRE
EN FIBRE DE VERRE

Reprise de l'activité

Corning SAS



FIBRES SOUPLES

Embouts spécifiques
compatibles aux
systèmes d'éclairage



BARREAUX RIGIDES

Transmission lumineuse exceptionnelle
ON > 0,37



CONÇUS À FAÇON

ULTRA RÉSISTANTS

- + Autoclave, substances chimiques
- + Analyse médicale
- + Pièces à mains dentaires
- + Aéronautique
- + Contrôle de processus
- + Mesures industrielles
- + Détection
- + Industrie nucléaire

info@idil.fr

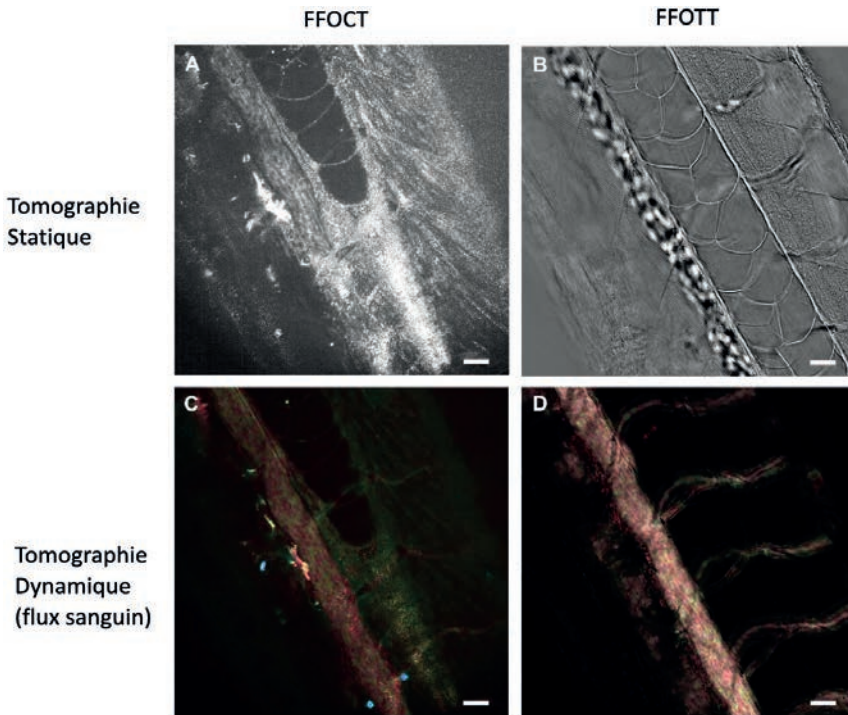


Figure 3. Tomographie statique et dynamique du flux sanguin en FFOCT et OTT chez l'embryon de poisson zèbre. Barres d'échelle : 20 µm. Figure adaptée de la référence (4).

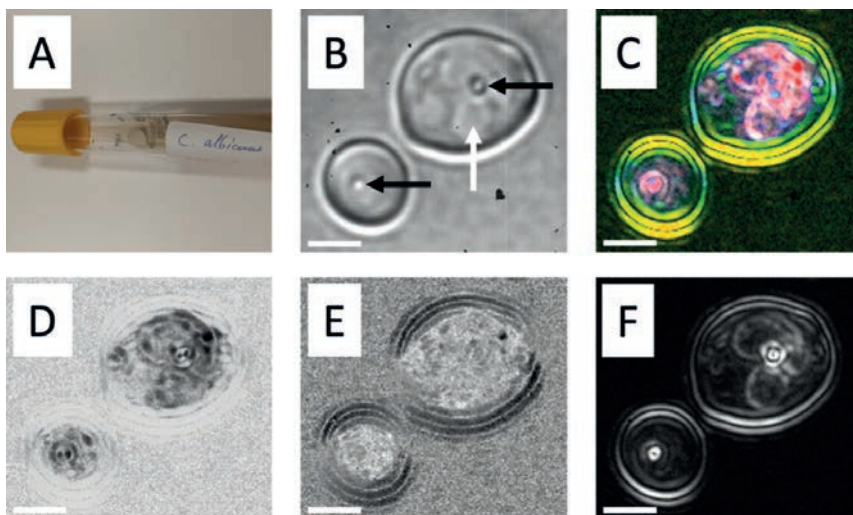
DOMAINES APPLICATIFS

Domaine biomédical

A l'aide du montage de la figure 1 nous pouvons comparer les images des mêmes

champs obtenus par FFOCT et FFOTT. Les résultats obtenus sur l'embryon de poisson zèbre sont représentés sur la figure 3. Ces dernières années, ●●●

Figure 4. FFOTT encytologie dynamique en mycologie médicale. A : Vue macroscopique d'une culture solide de *Candida albicans*. B : FFOTT statique de *Candida albicans* (100×). C : Examen direct obtenu en FFOTT dynamique (100×). D : Composante moyenne du signal obtenu en FFOTT dynamique et largeur spectrale associés et F : Composante liée à la variation d'amplitude du signal obtenu en OTT dynamique (100×). Barre d'échelle = 3 µm. Les flèches noires pointent le noyau des levures, la flèche blanche pointe les vacuoles des levures.



les embryons de poisson zèbre ont été utilisés comme modèles pour le développement précoce de nouveaux médicaments dans les domaines de la toxicologie, du cancer, de la génomique humaine, de la biologie du développement et pour d'autres recherches du domaine biomédical.

Sur ces images plusieurs points sont à noter ; si on peut distinguer des structures identiques sans ambiguïté d'autres semblent se présenter de façon très différentes. Faute d'une biopsie de la zone observée nous nous limiterons à souligner que les images FFOTT ne présentent pas le niveau de speckle élevé des images FFOCT. Cela est dû au fait que la phase de Gouy varie de π dans la zone sectionnée alors qu'en FFOCT cette zone comprend plusieurs longueurs d'onde donc plusieurs fois 2π .

Plus près de l'hôpital et des maladies fongiques, la figure 4 présente un exemple d'application de FFOTT pour la réalisation d'un examen de cytologie dynamique en mycologie médicale avec l'observation d'une suspension de levures obtenue à partir d'une culture solide de *Candida albicans* (A). La Figure B présente l'image obtenue par FFOTT standard au grandissement maximal (100X), confirmant la visualisation aisée des différentes structures d'intérêt et caractéristiques de la morphologie de ce type de levures (noyaux pointés par les flèches noires, vacuole pointée par la flèche blanche, membrane délimitant les contours de chaque cellule fongique). L'image obtenue en FFOTT dynamique est présentée en C, avec ses différentes composantes (fréquence centrale, largeur spectrale, amplitude de variation :D-E). Elle confirme l'intérêt du signal dynamique pour une analyse comparée des différents compartiments de *Candida albicans*, avec des signaux très différents entre la membrane (signal jaune / vert), les vacuoles et le noyau (signal rose / violet) de chaque cellule fongique, témoignant de possibles activités métaboliques très différentes.

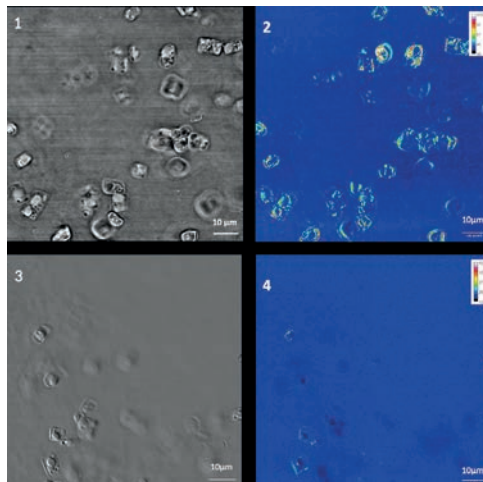


Figure 5. FFOTT de l'algue *Fragilariopsis* en différentes conditions d'éclairage tomographie statique (1) et dynamique (2) à la lumière et après deux mois d'obscurité (3 et 4). (collaboration Nathalie Joli).

Ces résultats permettent d'envisager des applications potentielles en mycologie médicale, aussi plus largement en microbiologie médicale, pour la réalisation d'examens de cytologies dynamiques ultra-rapide, avec l'idée d'obtenir de nouvelles informations métaboliques susceptibles de servir la réalisation d'examens routiniers au laboratoire de biologie médicale.

De la santé humaine à celle de l'environnement : les algues

Les arbres ne sont pas les seuls à absorber du gaz carbonique à travers la photosynthèse atmosphérique grâce

à la photosynthèse. Les algues jouent également un rôle prépondérant dans la fixation du carbone. De ce fait surveiller la santé des océans (acidité de l'eau, équilibre phytoplancton-microbes...) est d'importance. Les diatomées se retrouvent dans tous les océans et même dans les eaux douces, suivre leur métabolisme et leur évolution constitue un biomarqueur. Parmi elles *Fragilariopsis cylindrus* vit dans les zones polaires et subit la nuit polaire pendant plusieurs mois avec un fort éclairage lors du retour à la lumière. Nous avons analysé par FFOTT *Fragilariopsis* en condition d'éclairage et après une obscurité de deux mois (figure 5 et référence 5), on peut noter la très forte réduction de l'activité métabolique dans ce dernier cas.

CONCLUSION

Nous avons introduit un montage interférométrique tomographique des objets biologiques, montage simple, performant et peu coûteux capable de révéler un contraste morphologique aussi bien que métabolique à l'échelle subcellulaire. Ce montage de FFOTT, du fait des trajets communs des ondes référence et objet, est très stable et ne nécessite pas les précautions que l'on prend avec FFOCT. Cependant cette approche par transmission nous limite à l'étude des échantillons peu épais optiquement. FFOTT nous semble cependant pouvoir jouer un rôle en tant que nouveau biomarqueur sans agent de contraste (label free). ●

RÉFÉRENCES

- [1] A. Dubois et C. Boccara, *Photoniques* **95**, 39 (2019)
- [2] F. Harms et C. Boccara. Chapter 25 of W. Drexler and J. G. Fujimoto, eds., *Optical Coherence Tomography* (Springer International Publishing, 2015).
- [3] V. Mazlin, O. Thouvenin, S. Alhaddad, M. Boccara, and C. Boccara, *Biomed. Opt. Express* **13**, 4190 (2022).
- [4] S. Alhaddad, O. Thouvenin, M. Boccara, C. Boccara and V. Mazlin, *Biomed. Opt. Express* **14**, 4845 (2023)
- [5] Nathalie Joli et al. accepted to *New phytologist* 2023

ALPHANOV, AU CŒUR DE VOS INNOVATIONS PHOTONIQUES POUR LA SANTÉ

Le nombre de dispositifs médicaux qui intègrent des solutions photoniques ne cesse de croître. Longtemps limités à des applications en ophtalmologie pour la chirurgie réfractive cornéenne (Laser excimer), en esthétique pour l'épilation, le détatouage ou le traitement des maladies de peau, ou plus récemment pour le traitement de la cataracte avec des lasers femtoseconde pour le LASIK ou le capsulorhexis, les lasers sont devenus de véritables outils chirurgicaux, des moyens de détection de tumeurs ou même encore d'identification et de tris de nano-vésicules.

En utilisant ses moyens techniques, ses plateformes et les expertises acquises depuis plus de quinze ans, le centre technologique Optique et Lasers ALPhANOV ne cesse d'accompagner des projets en vue de développer de nouveaux dispositifs médicaux et d'avoir la capacité d'accélérer la mise sur le marché de ces innovations.

Grâce à ses plateformes d'intégration et de pilotage agiles, ALPhANOV accompagne le développement de sources lasers spécifiques allant du régime continu au régime impulsif femtoseconde sur une gamme spectrale allant du proche infrarouge (780 nm - Erbium doublé) au moyen infrarouge (2000 nm- Thulium).

Le centre collabore avec la société CERTIS Therapeutics pour le développement d'une solution de thérapie interstitielle par laser LITT guidée par IRM. Les tumeurs ayant rarement une forme parfaitement sphérique, ALPhANOV développe des diffuseurs optiques polyvalents qui permettent un dépôt de dose optique conformationnel, capable de s'adapter aux géométries complexes des tumeurs.



1. Prototype XPulse, 2. Rack développé en collaboration avec Certis, 3. Microscope ALPhANOV, 4. Laser MIR PULS

Dans le domaine de l'imagerie non-linéaire à deux et trois photons, ALPhANOV propose une nouvelle source laser agile spectralement dans la gamme 1700 nm - 2000 nm (MIR_PULS)

ALPhANOV développe également une expertise forte dans le domaine des procédés laser appliqués à la santé. Au-delà de l'application en ophtalmologie décrite précédemment, les lasers femtosecondes deviennent aussi un véritable scalpel chirurgical pour la découpe de tissus mous mais également durs. Une plateforme robotisée intégrant un laser femtoseconde fibré est en cours de développement dans le cadre d'un projet collaboratif associant de nombreux partenaires Néo-Aquitains (Tecnalia, CRITT informatique, PPrime, CHU de Bordeaux). Il vise à adresser la chirurgie maxillo-faciale. Associé à un monitoring en ligne de type OCT, ce scalpel de nouvelle génération permettra de réaliser des coupes chirurgicales d'une très grande précision, sur des trajectoires complexes et surtout sans contact et en limitant le traumatisme pour le patient.

Les lasers femtosecondes se veulent de plus en plus puissants et énergétiques afin d'améliorer le taux de productivité de nombreuses applications industrielles mais pas seulement. Cette augmentation des performances permet également le développement de nouvelles sources secondaires de rayons X générés par laser. Cette typologie de sources à haute brillance ouvrant la voie au développement de nouvelles modalités d'imagerie comme l'imagerie X 3D à contraste de phase. Le projet XPulse porté et coordonné par ALPhANOV a pour ambition de développer un système de mammographie nouvelle génération dédié à la détection précoce du cancer du sein. Ce système intégrera une source de rayons X générés par laser et fournira des images 3D du sein à haute résolution et contraste tout en minimisant la dose de rayonnement administrée à la patiente.

L'avancée des connaissances d'ALPhANOV et les multiples innovations qui se succèdent révèlent chaque jour un peu plus le potentiel de la photonique pour des applications médicales. ●