

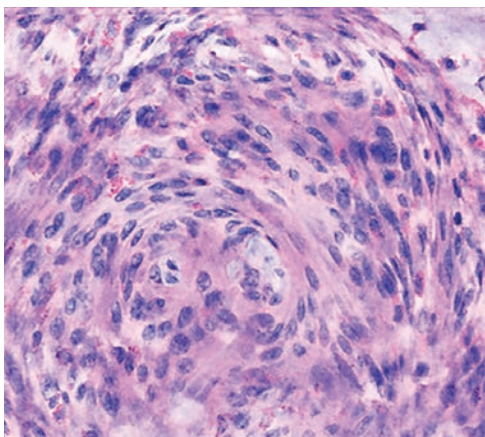
L'HISTOLOGIE RAMAN STIMULÉE

Hervé RIGNEAULT^{1,*} et Romain APPAY^{2,*}

¹ Aix Marseille Université, CNRS, Centrale Marseille, Institut Fresnel, Marseille, France

² Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille (APHM) et Aix-Marseille Université, Institut de Neurophysiologie, Marseille, France

*herve.rigneault@fresnel.fr - *romain.appay@ap-hm.fr



<https://doi.org/10.1051/photon/202312340>

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.

L'HISTOPATHOLOGIE

L'anatomopathologie, ou histopathologie, est une spécialité médicale qui s'attache à examiner la structure microscopique des tissus et des cellules qui les composent afin de repérer des anomalies liées à une situation pathologique. Elle est en particulier primordiale dans le domaine de l'oncologie avec pour objectif d'établir le diagnostic d'une tumeur ainsi que d'évaluer les principaux facteurs d'agressivité contribuant ainsi à la décision thérapeutique. Le protocole standard nécessite de prélever un échantillon de tissu (biopsie ou pièce opératoire) qui est fixé dans du formol puis inclus dans un bloc de paraffine afin de pouvoir réaliser une section de quelques micromètres d'épaisseur qui est déposée sur lame et verre avant d'être marquée par

L'anatomopathologie est une spécialité médicale qui s'attache à examiner la structure microscopique des tissus et des cellules qui les composent afin de repérer des anomalies liées à une situation pathologique. Cet examen nécessite de réaliser un prélèvement tissulaire à partir duquel est effectué une section de quelques micromètres d'épaisseur qui est déposée sur une lame de verre et colorée pour pouvoir être examinée au microscope. Ce processus nécessite que du matériel biologique soit consommé car déposé sur une lame de verre, prend de 20 minutes (en version accélérée) à 24h et nécessite un travail de préparation de l'échantillon (congélation ou inclusion en paraffine). Nous décrivons ici une alternative émergente, non destructive, utilisant la diffusion Raman cohérente et qui permet de générer des images de qualité histologique en temps réel et sans aucune préparation de l'échantillon.

des colorants ayant une affinité préférentielle pour les noyaux des cellules (l'hématoxyline - H), les corps cellulaires (l'éosine - E) ou le collagène (le safran). Le résultat est une coupe colorée (Figure 1) pouvant être directement observée au microscope par un anatomopathologiste qui pourra établir un diagnostic sur son caractère pathologique. Reconnue au niveau international comme le « gold standard » du diagnostic des cancers, cette discipline mobilise en France 1600 anatomopathologistes (chiffre 2021) épaulés de nombreux techniciens. Le protocole standard (fixation au formol et inclusion en paraffine) nécessite entre 12h et 24h de préparation pour obtenir une image de bonne qualité. Une version accélérée (congélation de l'échantillon) nécessite 20-40 minutes, et est appelée

'examen extemporané', car il s'agit d'une approche utilisée au cours de l'intervention chirurgicale pour faire un retour immédiat au chirurgien sur le caractère cancéreux d'un tissu fraîchement excisé. Elle donne cependant des coupes de qualité dégradées par rapport au protocole standard. Par ailleurs l'anatomopathologie est une technique fondamentalement consommatrice de matériel biologique car l'échantillon coloré sur lame de verre ne peut pas être réutilisé pour effectuer un traitement plus approfondi comme l'identification de modifications protéiques (par marquage immunologique) ou génétiques (par séquençage de l'ADN et de l'ARN). Développer une technique histologique alternative rapide et ne nécessitant ni préparation ni consommation d'un matériel

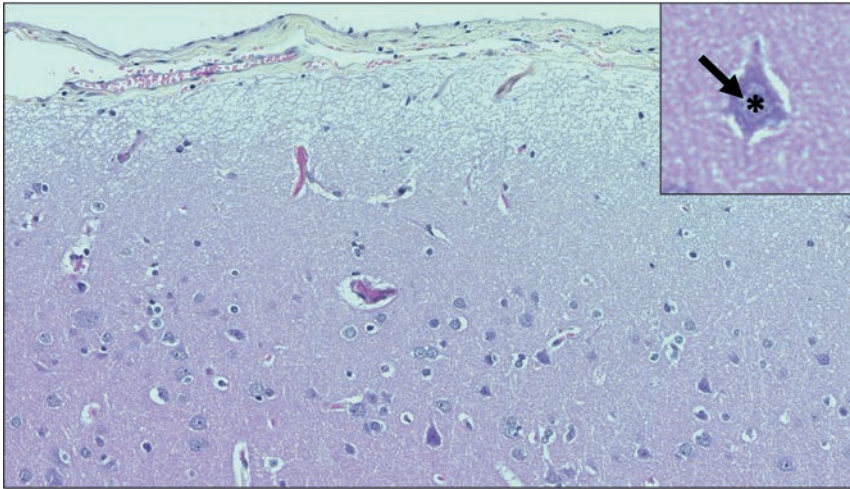


Figure 1. Coloration standard HES (Hématoxyline-Eosine-Safran) d'une section de cortex cérébral normal. L'hématoxyline est un colorant basique bleu ayant une affinité pour les éléments cellulaires chargés négativement comme les noyaux (*). L'éosine est un colorant acide rose ayant une affinité pour les éléments chargés positivement comme les cytoplasmes (flèche). Le safran colore le tissu conjonctif (visualisé en surface au niveau de la méninge).

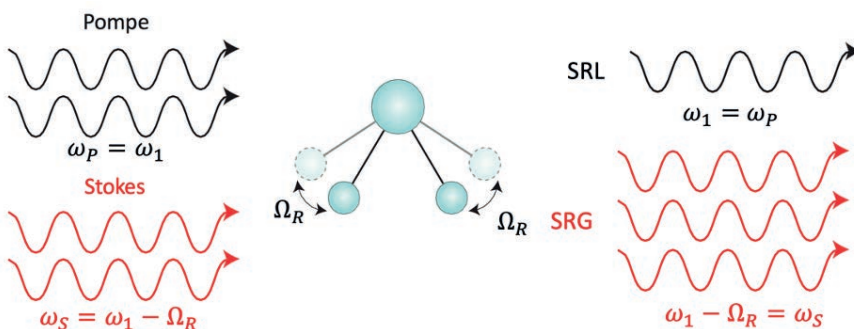
biologique précieux serait un réel progrès dont tireraient profils patients, chirurgiens et praticiens hospitaliers.

LE PROCESSUS RAMAN STIMULÉ

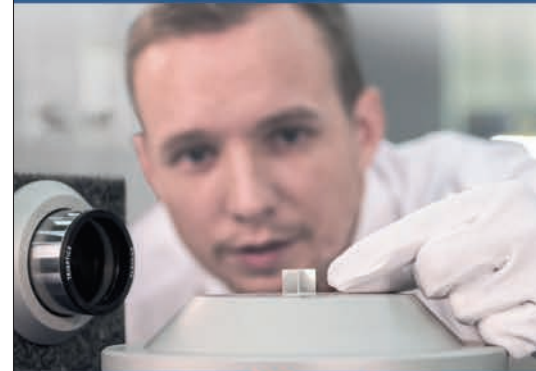
Contrairement à l'absorption infra-rouge qui permet d'adresser directement les niveaux vibratoires des molécules par absorption direct de rayonnement dans la gamme de longueurs d'ondes $50\mu\text{m} - 3\mu\text{m}$ [300cm^{-1} , 3000cm^{-1}], le processus Raman stimulé utilise la différence de fréquence entre deux ondes optiques moyen infra-rouge pour entrer en résonance avec les

modes vibratoires des molécules. La figure 2 précise la situation expérimentale ou deux ondes optiques sont incidentes sur une molécule dont le mode vibratoire est Ω_R . La première onde, dite pompe, de fréquence interagit avec la deuxième onde, dite Stokes, dont la fréquence vérifie $\omega_S = \omega_1 - \Omega_R$; de telle sorte que la différence de fréquence entre les ondes pompe et Stokes soit égale au mode vibratoire moléculaire, $\omega_P - \omega_S = \Omega_R$. Cette condition de résonance est nécessaire pour activer un ensemble de mélanges à quatre ondes faisant intervenir la matière par l'intermédiaire de la ●●●

Figure 2. Le processus Raman stimulé : deux ondes incidentes dites pompe et Stokes, dont la différence de fréquence optiques est Ω_R , interagissent par 'mélange à quatre ondes' avec une liaison chimique de fréquence vibrationnelle Ω_R et donnent naissance aux processus SRG (stimulated Raman gain) et SRL (stimulated Raman loss) Le processus SRG crée du gain sur le faisceau Stokes alors que le processus SRL crée des pertes sur le faisceau pompe.



Instrumentation de test optique



Mesure de la plupart des paramètres optiques

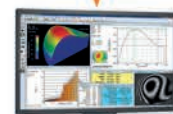
FTM, EFL, BFL, centrage, alignement front d'onde

Applications en R&D et production



Banc de FTM UV, VIS, IR

Interféromètre "µPhase"

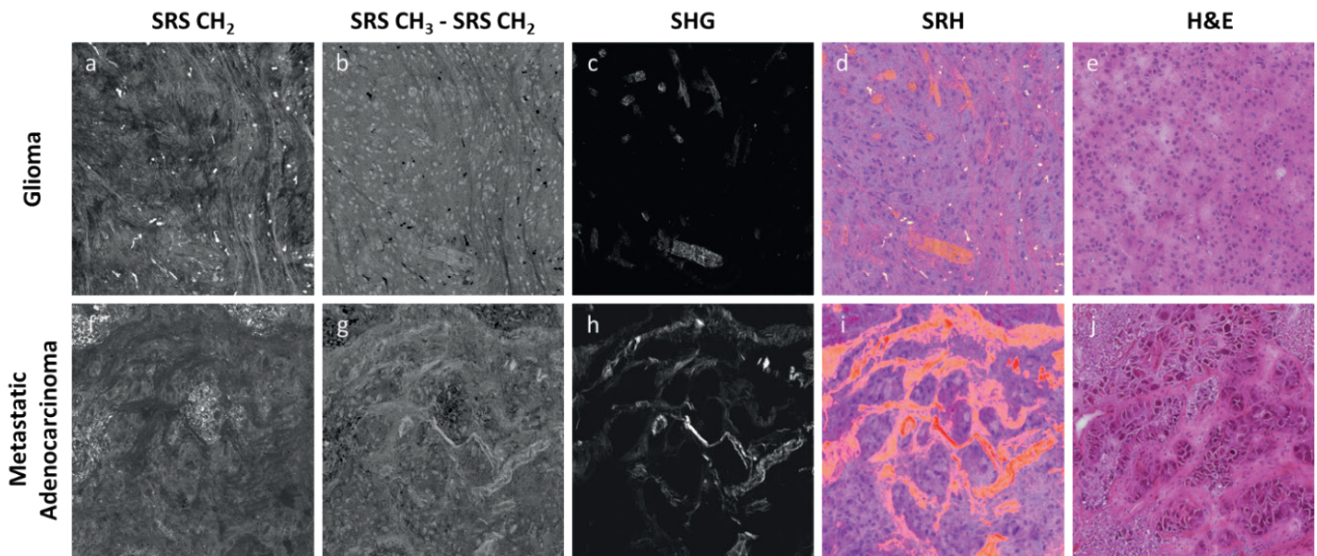


Station de centrage optique



TRIOPTICS France

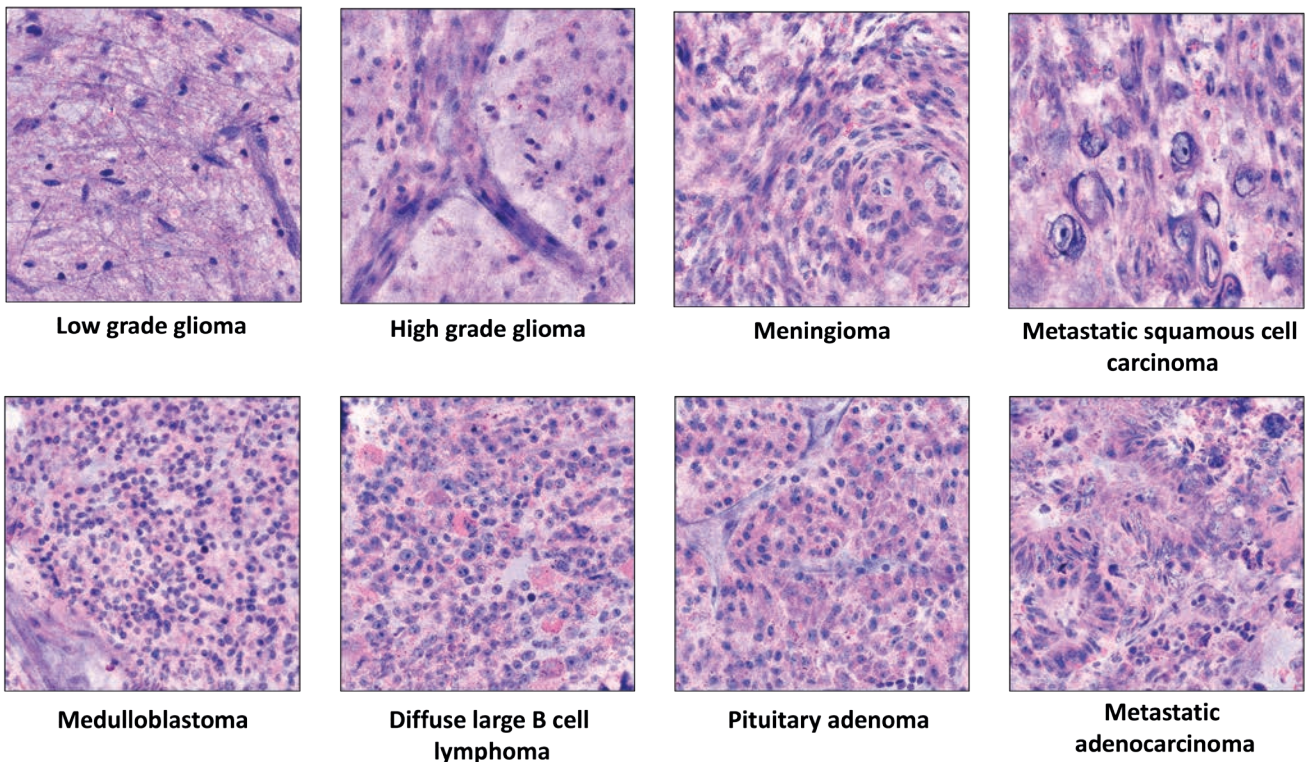
76 rue d'Alsace
69100 Villeurbanne
Tel. +33 (0)4 72 44 02 03
www.trioptics.fr



susceptibilité non linéaire d'ordre trois $\chi^{(3)}$ [1]. Le processus qui nous intéresse ici est le Raman stimulé, ou SRS pour 'stimulated Raman scattering' qui affecte les ondes incidentes pompe et Stokes en modifiant leur intensité. Le processus SRG, pour 'stimulated Raman gain' active la polarisation non linéaire $\vec{P}^{(3)}(\omega_{SRG}) = \chi^{(3)}(\omega_{SRG}; \omega_p, -\omega_s, \omega_s); \vec{E}_p \vec{E}_s \vec{E}_p^*$ qui rayonne à $\omega_s = \omega_p - \omega_p + \omega_p$. On peut montrer que le champ SRG rayonné interfère constructivement avec le champ Stokes incident

Figure 3. Histologie Raman stimulée (SRH) d'échantillons de gliome et d'adénocarcinome métastatique du cerveau. En SRH l'acquisition simultanée des images correspondants aux liaisons chimiques CH_2 (a-f), CH_3 ainsi que (SHG – second harmonic generation) (c-h) (révélant le collagène) sont colorées virtuellement pour générer des images SRH (d-i) qui rapportent des informations très similaires à l'histologie standard (e-j) utilisant l'hématoxyline et l'éosine. La force de l'image SRH provient de l'aptitude de la différence des images CH_3-CH_2 (b-g) à révéler les noyaux des cellules (b-g). Taille des images $200\mu m \times 200\mu m$.

Figure 4. L'imagerie SRH permet d'identifier les principaux types de tumeurs cérébrales. Barre d'échelle : $50\mu m$



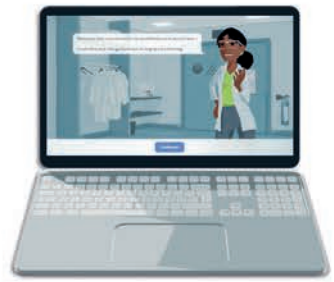
pour en augmenter son intensité, d'où la terminologie 'stimulated Raman gain'. Le processus SRL, pour 'stimulated Raman loss' est symétrique du processus SRG, il active la polarisation $\vec{P}^{(3)}(\omega_{SRL}) = \chi^{(3)}(\omega_{SRL}; \omega_S, -\omega_S, \omega_p); \vec{E}_S \vec{E}_p \vec{E}_S^*$ qui rayonne à $\omega_p = \omega_S - \omega_S + \omega_p$. On peut montrer que le champ SRL rayonné interfère destructivement avec le champ pompe incident pour en

diminuer son intensité, d'où la terminologie 'stimulated Raman loss' (voir Fig. 1 b). Le lecteur trouvera une présentation plus complète dans [2].

L'HISTOLOGIE RAMAN STIMULÉE

L'histologie Raman stimulée, ou SRH pour 'stimulated Raman histology' consiste à imager les liaisons chimiques CH₂ et CH₃

Nouvel e-Learning
Sensibilisation à la Sécurité Laser



Grâce à l'e-learning, vos collaborateurs explorent en toute autonomie les pratiques essentielles leur permettant de travailler en sécurité dans une zone de danger laser.

En savoir plus :



<https://pyla-formation.com/>

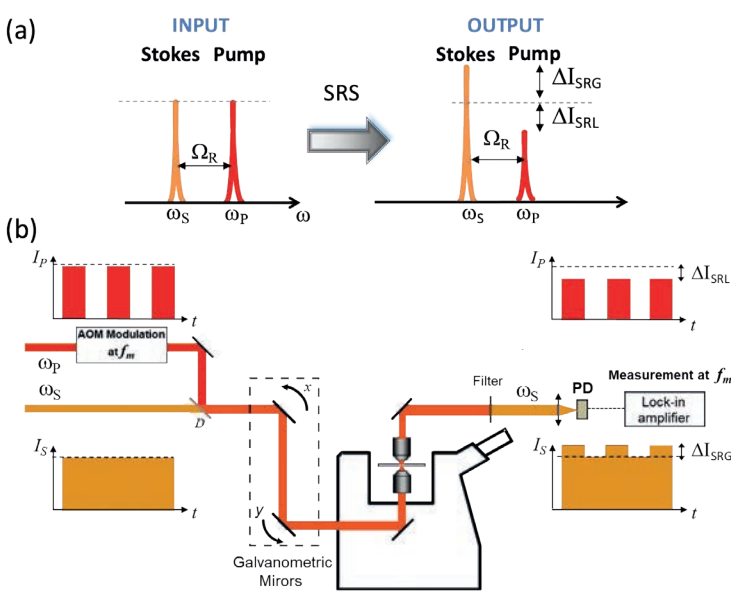
Nos formations en sécurité laser en présentiel restent également disponibles :

- PISL : Personne Informée à la Sécurité Laser
- PERL : Personne Exposée au Risque Laser
- PCSL : Personne Compétente en Sécurité Laser



MICROSCOPIE SRS (STIMULATED RAMAN SCATTERING)

La détection SRS est très différente d'une détection de fluorescence. Il s'agit de détecter le gain ΔI_{SRG} ou perte ΔI_{SRL} des faisceaux pompes et Stokes après l'interaction SRS avec l'échantillon (Figure (a)). En pratique ces gains et pertes différentiels sont très faibles $\left| \frac{\Delta I_{SRG}}{I_S} \right| \approx \left| \frac{\Delta I_{SRL}}{I_p} \right| \approx 10^{-4}, 10^{-6}$. Pour atteindre une telle sensibilité on module un des faisceaux en amplitude à une radio fréquence f_m suffisamment grande pour s'affranchir des bruits mécaniques, typiquement $f_m > 1Mhz$. Dans la figure (b) on a choisi d'illustrer le cas où c'est le faisceau pompe qui est modulé à la fréquence f_m , la microscopie SRS consiste à focaliser les faisceaux pompe et Stokes sur l'échantillon et à détecter le transfert de modulation du faisceau pompe modulé vers le faisceau Stokes non modulé. Pour cela on utilise une photodiode et un amplificateur à détection synchrone et on détecte ΔI_{SRG} à la fréquence f_m . L'image SRS est reconstruite en mesurant ΔI_{SRG} par balayage spatial des faisceaux pompe et Stokes sur l'échantillon à l'aide de miroir galvanométriques [3].



dans les tissus par SRS (le principe de la détection SRS est précisé dans l'encart 1). Les liaisons CH_2 se localisent plutôt dans les cytoplasmes cellulaires et dans les amas lipidiques tandis que les liaisons CH_3 sont présentes dans les fibres, dans la matrice extracellulaire et plus particulièrement dans les noyaux cellulaires. C'est cette diversité de localisations des différentes liaisons chimiques qui va permettre *in fine* de réaliser une image informative avec des noyaux, des cytoplasmes et fibres qui vont pouvoir être différenciés. Le microscope SRH n'est autre qu'un microscope SRS qui peut imager simultanément les liaisons chimiques CH_2 et CH_3 [3]. Il est possible d'enrichir l'image SRH en lui adjoignant l'information contenue dans l'image de génération du second harmonique (SHG pour second harmonic generation) qui révèle la présence des fibres de collagène. Une fois les images CH_2 (Fig. 3 a,b), CH_3 (et éventuellement SHG- Fig 3 c,h) acquises, on procède à une coloration virtuelle dans les tons de rose-violet des images CH_2 et CH_3 - CH_2 (Fig. 3 b,g). Cette dernière différence d'image (CH_3 - CH_2) a la particularité de révéler les noyaux cellulaires qui est un élément clé de l'analyse histopathologique (Fig. 3 b,g). La figure 3 présente les images brutes CH_2 , CH_3 - CH_2 et SHG ainsi que les images SRH obtenues (Fig. 3 d,i) et leur comparaison avec les images histologiques standards (H&E) pour deux échantillons de tumeurs cérébrales (un gliome et un adénocarcinome métastatique).

On peut apprécier la concordance qu'il existe entre les images SRH et les images H&E. L'image SRH utilisant le SHG révèle la présence du collagène (en orange sur les Fig. 3 d,i) qui n'est pas présent sur l'image classique H&E.

Il est important de noter qu'une image SRH sur un champ de vue de $300\mu\text{m} \times 300\mu\text{m}$ peut être obtenue en quelques secondes et une image sur un champ de $1\text{mm} \times 1\text{mm}$ en quelques minutes [4]. Cela est significativement plus rapide que l'examen anatomopathologique extemporané (20-40 minutes).

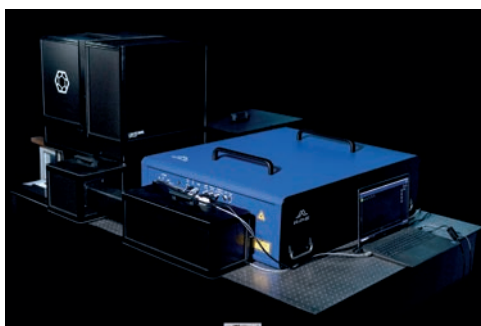


Figure 5. Vue d'un microscope SRS commercial permettant de réaliser des images SRH mais aussi d'acquérir des images dans la zone spectrale du fingerprint (système BondXplorer de la société Lightcore Technologies - <https://lightcore.tech/>).

Nous avons pu utiliser l'imagerie SRH pour imager les principaux types de tumeurs cérébrales [4]. Pour cela des prélèvements réalisés au cours de l'intervention chirurgicale ont suivi deux voies. La première consistait à imager l'échantillon en SRH puis à utiliser l'échantillon imagé pour réaliser des analyses complémentaires d'immunohistochimie et de biologie moléculaire. La deuxième voie est le protocole classique qui utilisait une partie du matériel pour réaliser des coupes histologiques H&E et une autre partie du matériel pour réaliser les études complémentaires.

Nous avons pu montrer que les images SRH permettent de diagnostiquer sans hésitation les principaux types de tumeurs cérébrales (Figure 4) et que l'image SRH n'altère en rien des résultats des analyses immunohistochimiques et de biologie moléculaire complémentaires [4]. Il s'agit d'un résultat important qui indique que l'imagerie SRH permet de

réduire la consommation de matériel biologique, ceci est particulièrement pertinent dans le cas de prélèvements stéréotaxiques chez l'enfant ou le volume des biopsies cérébrales est très limitée. Réaliser l'histologie et les analyses moléculaires sur un même échantillon est une rupture par rapport au protocole établi.

LE SRH POUR ALLER PLUS LOIN QUE LA MORPHOLOGIE

Bien que l'imagerie SRH soit déjà très intéressante pour révéler l'architecture des tissus (Figure 4) il est également intéressant de s'intéresser à d'autres liaisons chimiques (que les liaisons CH_2 et CH_3) pour apporter d'autres informations moléculaires ou métaboliques sur les tissus. Le domaine spectral des vibrations situées entre 500cm^{-1} et 1800cm^{-1} et dit du 'fingerprint - empreinte en français' a été abondamment renseigné dans la littérature par la communauté Raman spontanée comme portant des signatures moléculaires associées aux tumeurs et à d'autres pathologies. Associé à l'image CH_2/CH_3 histologique, ces images acquises dans la zone du 'fingerprint' doivent étendre la portée des images SRH. Il faut pour cela changer la différence de fréquence $\omega_p - \omega_s = \Omega_R$ ce qui est réalisé en pratique avec un oscillateur paramétrique optique (OPO) [3]. La figure 5 présente un exemple de microscope SRS commercial utilisant une source OPO et qui peut réaliser des images SRH dans toutes les zones du spectre vibrationnel. Il y a ainsi espoir d'aller plus loin que l'histologie morphologique avec l'imagerie SRH. ●

RÉFÉRENCES

- [1] H. Rigneault, *Photoniques* **121**, 56 (2023)
- [2] H. Rigneault *et al.*, *APL Photonics* **3**, 091101 (2018)
- [3] S. Heuke *et al.*, *Biomed. Opt. Express* **12**, 7780 (2021)
- [4] R. Appay *et al.*, *J. Phys. Chem* **127**, 3624 (2023)