



HAL
open science

Développement d'un endomicroscope multiphotonique à deux couleurs pour l'imagerie du métabolisme énergétique cellulaire

Pierre Leclerc

► **To cite this version:**

Pierre Leclerc. Développement d'un endomicroscope multiphotonique à deux couleurs pour l'imagerie du métabolisme énergétique cellulaire. Optique / photonique. Université de Limoges, 2017. Français. NNT : 2017LIMO0053 . tel-01698572

HAL Id: tel-01698572

<https://theses.hal.science/tel-01698572v1>

Submitted on 1 Feb 2018

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.

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Electronique des Hautes Fréquences, Photonique et Systèmes
Spécialité : Photonique
Présentée et soutenue par :
Pierre LECLERC

Le 28 septembre 2017

Développement d'un endomicroscope multiphotonique à deux couleurs pour l'imagerie du métabolisme énergétique cellulaire.

Thèse dirigée par Frédéric LOURADOUR

JURY :

Rapporteurs :

Mme. Alexandra FRAGOLA, Maître de conférences, Laboratoire Physique et Etude de Matériaux LPEM, UMR 8213, ESPCI, CNRS, Université Pierre et Marie Curie

M. Rodney P. O'CONNOR, Professeur associé, Département de Bioélectronique, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne

Examineurs :

M. François LACOMBE, Directeur scientifique, Mauna Kea Technologies

M. Vincent KERMENE, Directeur de recherche au CNRS, Institut XLIM – Photonique, Université de Limoges

M. Alexis DESMOULIERES, Professeur, Faculté de Médecine et de Pharmacie de l'Université de Limoges

M. Frédéric LOURADOUR, Professeur, Institut XLIM – Photonique, Université de Limoges



A ceux qui m'ont soutenu

«Facts do not cease to exist because they are ignored»

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Sommaire

Introduction	1
Chapitre I. Intérêt de l'imagerie non linéaire par fibre du métabolisme.....	2
I. Imagerie du métabolisme énergétique de la cellule par voie optique	2
II. Définition et intérêt de la fluorescence à deux photons pour le rapport d'oxydo-réduction optique	8
III. Etat de l'art des systèmes endomicroscopiques commerciaux pour des applications cliniques.....	13
IV. Endomicroscopie non linéaire fibrée.....	16
Chapitre II. Développement d'un système de déport par fibre optique d'impulsions femtosecondes accordable.....	20
I. Problématique liée au transport d'impulsions femtosecondes par fibre optique.....	20
II. Compensation de dispersion large bande à haute efficacité énergétique à l'aide d'un étireur à GRISM.....	26
Chapitre III. Adaptation de l'endomicroscope multiphotonique aux contraintes de la mesure du rapport d'oxydoréduction optique et du vivant.....	45
I. Endomicroscope non linéaire : état de l'art	45
II. Présentation du système endoscopique utilisé.....	50
Chapitre IV. Validations du rapport d'oxydo-réduction optique sur modèles biologiques.....	70
I. Validation sur cellules <i>in vitro</i>	70
II. Validation sur animal <i>in vivo, in situ</i>	80
Chapitre V. Imagerie non linéaire fibrée résolue en temps de vie du métabolisme	89
I. Intérêt de l'imagerie de fluorescence résolue en temps de vie du métabolisme cellulaire	89
II. Résultat préliminaire de mesure du temps de vie par fibre optique	91
III. Premières validations en microscopie du FLIM Phasor rapide	97
Conclusion	100
Références bibliographiques	102
Annexes	109

Introduction

L'imagerie médicale comprend tous les moyens d'acquisition d'image du corps humain. Ce très large domaine fait appel à de nombreux phénomènes physiques différents, qui fournissent des contrastes différents et complémentaires. Parmi ceux-ci on peut citer les rayons X (radiographie), la résonance magnétique (IRM), les ultrasons (échographie) et l'imagerie optique.

L'imagerie optique est un outil essentiel au secteur biomédical. En médecine les techniques de microscopie sont surtout utilisées en anatomopathologie, où elles sont l'un des principaux moyens d'étude des pathologies au niveau cellulaire ou tissulaire. Il est important de noter que ces cellules issues de biopsie sont mortes et ne permettent pas d'obtenir des informations physiologiques.

Historiquement ces techniques ont d'abord surtout été utilisées pour l'étude des structures. Cependant cette étude structurale ne suffit pas à comprendre toute la complexité de la biologie. Il est souvent nécessaire de passer à une imagerie fonctionnelle, qui rend compte du métabolisme de l'organisme.

Ce besoin est illustré par l'apparition de techniques nouvelles comme l'imagerie de résonance magnétique fonctionnelle (fMRI). Celle-ci permet de mesurer l'activité cérébrale en détectant les variations du flux sanguin dans le cerveau. Une autre technique permettant d'étudier des phénomènes physiologiques est la tomographie par émission de positron, ou PETscan, qui permet, par l'injection d'une molécule biologiquement active combinée à un traceur radioactif, de suivre des processus métaboliques associés à la molécule injectée.

Cependant ces techniques ne permettent de rendre compte du métabolisme qu'à l'échelle de l'organe, voire du tissu. Cela induit pour certaines maladies, comme le cancer, un dépistage tardif du fait de leur faible résolution. Afin d'obtenir un dépistage plus précoce, il est nécessaire de développer des moyens d'imagerie cellulaire du métabolisme.

L'imagerie optique permet de descendre à cette résolution, *in vivo*. Cette imagerie du métabolisme optique peut prendre différentes formes. Afin de pouvoir être appliquée sur l'homme cette imagerie doit préférentiellement ne pas utiliser de marquages, ceux-ci pouvant présenter un risque sanitaire. Un contraste reposant sur des réponses intrinsèques présentera moins de risques donc une utilisation sur l'homme facilitée.

Parmi les voies métaboliques possibles à étudier, une semble particulièrement pertinente : le métabolisme énergétique cellulaire. D'une part, un contraste qui rend compte de la production énergétique de la cellule permet d'obtenir une image de son activité. D'autre part, cette étude permet de mettre en évidence les mitochondries, organelles de production d'énergie cellulaire, qui sont impliquées dans diverses pathologies comme, entre autres, la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson.

Dans le cadre du travail présenté ici notre but est d'obtenir la signature du métabolisme énergétique cellulaire, sans marquage, par l'endomicroscopie non linéaire (ou EMMP, pour EndoMicroscope MultiPhotonique), qui est fréquemment recensée comme présentant un fort potentiel, mais à ce jour jamais obtenue avec un EMMP.

Chapitre I. Intérêt de l'imagerie non linéaire par fibre du métabolisme

I. Imagerie du métabolisme énergétique de la cellule par voie optique

Préambule :

On définit comme métabolisme l'ensemble des réactions chimiques qui ont lieu au sein d'un être vivant. Le métabolisme énergétique est donc l'ensemble des réactions chimiques liées à la création (i.e. respiration cellulaire), au transport et au stockage de l'énergie chez le vivant.

Notre étude porte sur la visualisation par voie optique de ce métabolisme énergétique qui est connu pour permettre la détection et le suivi de diverses pathologies dont principalement le cancer mais aussi l'athérosclérose, ou encore le diabète.

Nous définirons ici quels sont les signaux lumineux utiles pour cette étude, quelle est leur origine et comment ils sont traités afin de permettre une lecture du métabolisme. Plus exactement, nous introduirons une modalité de visualisation de l'évolution de la respiration cellulaire : le rapport optique d'oxydo-réduction ou ROOR (en anglais ORR Optical Redox Ratio).

Note : par souci de clarté les explications données dans la suite du chapitre sont simplifiées et le seul modèle considéré est la respiration de cellule de mammifère. En effet l'étude du métabolisme est une des branches de la biologie les plus difficiles à cause de la très grande complexité de la biochimie à laquelle il est relié. Le NADH, la molécule d'intérêt du paragraphe suivant, joue des rôles multiples. Le niveau d'autofluorescence de celui-ci et les mécanismes dans lesquels il est impliqué est un sujet de discussion encore ouvert.

1. Nature des fluorescences utiles au rapport optique d'oxydo-réduction

Le rapport optique d'oxydo-réduction est une méthode de visualisation optique de l'état du métabolisme énergétique d'une cellule, c'est-à-dire de la suite de réactions qui entraînent la dégradation du glucose par une chaîne réactionnelle complexe qui permet de distribuer l'énergie de manière contrôlée au sein de la cellule.

Cette méthode fait appel à la fluorescence d'une molécule particulière : le NADH (Nicotidamide Adénine Dinucléotide). Cette coenzyme est directement impliquée dans les mécanismes énergétiques cellulaires. Elle agit, entre autres, en tant que transporteur d'électrons via la phosphorylation oxydative. Elle existe donc dans une forme oxydée (NAD^+) ou réduite (NADH). Le NADH est intrinsèquement fluorescent et donc accessible aux techniques optiques contrairement à sa forme oxydée.

Le suivi des variations de la fluorescence du NADH, proposé pour la première fois par Britton Chance dans les années 60, peut être relié au métabolisme, et permettre le suivi de celui-ci (Chance B Estabrook R Ghosht A 1964; Scholz 1969). Il a été depuis démontré qu'il existe un lien direct entre la fluorescence du NADH et l'oxygénation d'une cellule (Balu et al. 2013; Mayevsky & Rogatsky 2007).

L'étude de la fluorescence de NADH permet donc d'étudier et de suivre le métabolisme énergétique d'une cellule. Cependant cette information permet surtout d'évaluer des variations spatiales ou temporelles relatives. Une approche plus absolue consisterait à étudier le rapport

d'oxydoréduction cellulaire c'est-à-dire le rapport entre NAD^+ et NADH . Cependant comme le NAD^+ n'est pas fluorescent, cette mesure est impossible directement par voie optique.

Il est possible cependant de s'affranchir de cette limitation. Un autre couple oxydant/réducteur, le FADH_2/FAD , aussi impliqué dans le métabolisme cellulaire, est lié de manière antagoniste au NADH par des réactions chimiques couplées dans la cellule. La forme oxydée de la flavine, le FAD , est fluorescente et peut donc être mesurée optiquement. De par le couplage des réactions chimiques, l'évolution des niveaux de FAD est analogue à celui du NAD^+ . (Scholz et al. 1969; Kuznetsov et al. 1998).

On peut donc obtenir une image du rapport NAD^+/NADH en étudiant le ratio FAD/NADH . C'est ce rapport que l'on nomme rapport d'oxydo-réduction optique. Ce ratio permet non seulement d'obtenir une information plus quantitative et plus absolue, mais elle a aussi l'avantage d'augmenter la dynamique d'évolution du signal mesuré.

Les mécanismes par lesquels ces coenzymes peuvent être reliées au métabolisme cellulaire sont complexes et font toujours l'objet de recherche. La complexité de la biologie cellulaire ne permet pas de dégager des règles absolues. Dans les paragraphes suivant je m'attache à décrire ces mécanismes de façon simplifiée, afin de mettre en évidence comment le NADH et le FAD sont reliées au métabolisme énergétique cellulaire. Ainsi je ne détaille pas quels rôles jouent le NADH/FAD liées à une protéine ou libres, et je ne m'attarde pas sur les différences entre le NADH présent dans le cytosol ou dans la mitochondrie.

2. La respiration cellulaire

La respiration cellulaire est l'ensemble des réactions biochimiques qui ont lieu dans la cellule et les mitochondries et qui conduisent du glucose à la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP). Quelles que soient les conditions, l' ATP est la molécule universelle qui fournit l'énergie pour le fonctionnement cellulaire par une réaction exothermique d'hydrolyse en adénosine diphosphate (ADP)(Campbell 2012; WILSON John 2011).

Pour la fabrication de l' ATP à partir du glucose, on distingue deux cas: la respiration aérobie, en présence d'oxygène, et la fermentation, en l'absence d'oxygène. Le premier correspond au fonctionnement normal de la plupart des types cellulaires et le second un cas utilisé lors d'effort intense ou dans des cas pathologiques. Ces deux mécanismes mettent en jeu des molécules, des réactions et des rendements différents. Ce sont ces différences que l'on peut sonder avec le ROOR.

La respiration aérobie est la voie privilégiée de la respiration cellulaire, car elle présente le plus grand rendement (36 molécule d' ATP /molécule de glucose). Elle a lieu en présence d'oxygène et correspond à la dégradation du glucose dans le cytoplasme par la glycolyse, suivi d'une chaîne réactionnelle dans les mitochondries, la phosphorylation oxydative.

Au cours de la glycolyse, le rendement net est de deux molécules de NAD^+ réduites en NADH pour une molécule de glucose dégradée.

En présence d'oxygène le métabolisme énergétique se poursuit dans les mitochondries ou le produit de la glycolyse va être progressivement dégradé en CO_2 et H_2O . Au cours de cette dégradation les coenzymes NADH et FAD interviennent pour servir respectivement de donneur ou d'accepteur d'électron. Afin que les réactions se poursuivent, la mitochondrie régénère sa réserve de FAD en réduisant le NAD^+ en NADH .

Au travers de la glycolyse et du cycle de Krebs jusqu'à 10 molécules de NADH sont générées. Ces molécules de NADH vont alors perdre un proton H^+ , capté par l'oxygène, pour régénérer la réserve de NAD^+ . Au cours de ces réaction les protons H^+ sont pompés dans le milieu entre les deux membranes de la mitochondrie, créant un gradient qui sert alors à alimenter le complexe protéique ATP synthétase, qui à son tour produit l'ATP.

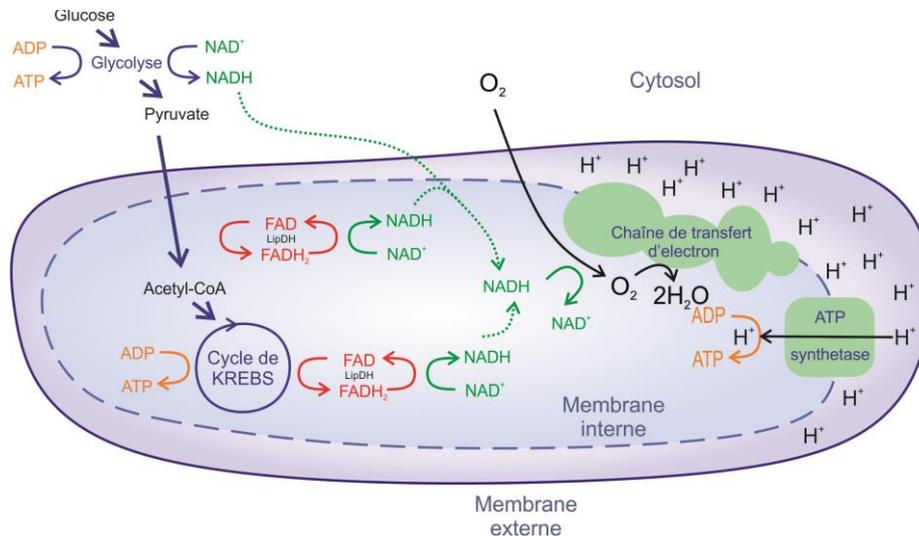


Figure I-1 : Représentation schématique d'une mitochondrie et des processus liés au NADH et FAD au cours de la respiration aérobie. Inspiré de (Quinn et al. 2012)

Il a été montré que ce fonctionnement entraîne une concentration en NADH modérée et de ce fait à un ratio redox faible (Mayevsky & Rogatsky 2007; Georgakoudi & Quinn 2012).

En condition anaérobie, l'oxygène n'étant plus l'accepteur final des protons, le NADH s'accumule et n'est plus oxydé en NAD^+ . Afin de continuer la production d'ATP, la cellule procède alors par glycolyse dans le cytosol, qui mène aussi à la synthèse de NADH qui s'accumule alors dans le cytosol. Afin de produire du NAD^+ en l'absence d'oxygène, la cellule va oxyder une partie du NADH en générant de l'acide lactique.

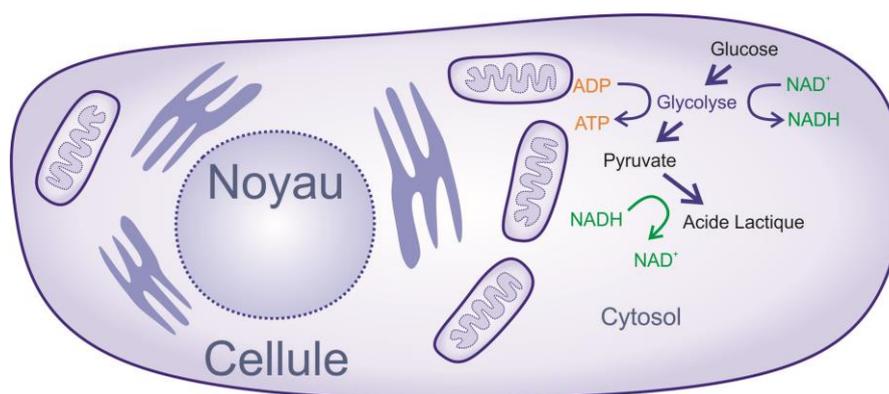


Figure I-2 : Représentation schématique des processus liée au NADH et FAD au cours de la fermentation lactique.

Cette voie rapide est extrêmement peu rentable (4 molécules d'ATP/molécule de glucose) pour la cellule et est utilisée dans de très rare cas, comme lors d'un effort intense dans les cellules musculaires, ainsi que dans certains cas pathologiques. Il s'agit notablement de la voie privilégiée des cellules cancéreuses pour produire de l'énergie indépendamment des conditions d'oxygénation.

Il a été montré que ce fonctionnement entraîne une forte concentration en NADH et de ce fait à un ratio redox élevé (Mayevsky & Rogatsky 2007; Georgakoudi & Quinn 2012).

Cette description simple montre que le NADH est un intermédiaire réactionnel indispensable à la synthèse de l'ATP et donc fortement corrélé à la production énergétique de la cellule. La même observation peut être faite pour le FAD. Cependant, ce lien entre production d'énergie et NADH et FAD dans les mitochondries ou le cytosol est complexe. En effet ces molécules interviennent dans plusieurs autres réactions chimiques. Ces réactions étant couplées entre elles, certaines vont produire du NADH ou du FAD quand d'autres, ayant des vitesses réactionnelles différentes, tendent à les consommer.

Malgré la complexité de ce problème, il a été montré que se dégagent certaines tendances qui ont permis de relier, *a minima* de manière qualitative, le rapport optique d'oxydo-réduction à un état cellulaire donné et par voie de conséquence à un état pathologique particulier.

3. Signification physiologique du rapport d'oxydo-réduction optique

Le rapport d'oxydo-réduction optique ou ROOR est ainsi une mesure optique du potentiel d'oxydo-réduction de la cellule par la mesure du rapport de fluorescence entre NADH et FAD. Celui-ci a été pour la première fois proposé par Britton Chance dans les années 60 (Chance B Estabrook R Ghosht A 1964; Scholz 1969). Il peut être obtenu simplement, grâce à la division pour chaque pixel de l'image finale des intensités de fluorescence du NADH et du FAD soit :

$$ROOR = \frac{[FAD]}{[NADH]}$$

Ce rapport peut aussi être compris comme le rapport de la phosphorylation oxydative sur le métabolisme glycolytique. En ce sens il compare deux phénomènes liés, l'oxygénation et la production d'énergie d'une cellule (Figure I-3).

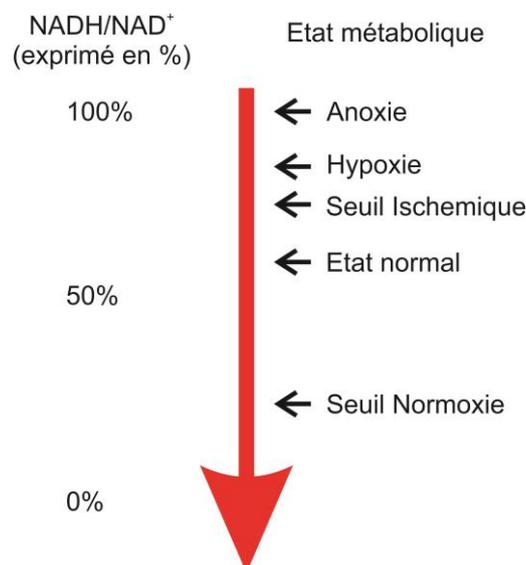


Figure I-3 : Niveau de concentration du NADH intramitochondrial en fonction de l'oxygénation des cellules. Inspiré de (Mayevsky & Rogatsky 2007)

L'intérêt de mesurer la consommation en énergie des cellules est multiple. On peut citer le suivi de la division cellulaire, de la différenciation de cellules souches, ou encore la présence de cellules cancéreuses.

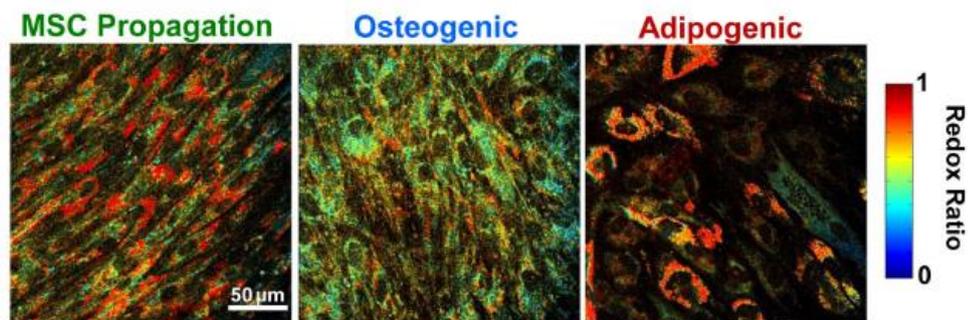


Figure I-4 : Exemple d'utilisation du ROOR pour le suivi de la différenciation de cellules souches. De gauche à droite : cellule indifférenciée, cellules osseuses et cellules de tissus adipeux (Quinn et al. 2013). Ici le ratio est présenté sous la forme $\frac{[FAD]}{[NADH]+[FAD]}$.

Les cellules cancéreuses, suivent des cycles intenses de prolifération anarchique, qui nécessitent une consommation d'ATP importante. Mais aussi et surtout, ces cellules délaissent la respiration aérobie au profit de la fermentation quelles que soient les conditions d'oxygénation. Cette adaptation du métabolisme porte le nom d'effet Warburg, d'après le prix Nobel Otto Warburg qui l'a mis en évidence (Warburg 1956). Ce phénomène est donc mesurable par la mesure du ROOR.

Celui-ci permet donc de différencier les cellules quiescentes et les cellules actives ainsi que les cellules saines et cancéreuses (Skala et al. 2007; Georgakoudi & Quinn 2012; Levitt et al. 2011). Plus encore, d'autres études montrent qu'avec une lecture de ce ratio redox il est même possible de discerner les différents stades d'évolution de cellules cancéreuses (Skala et al. 2007).

Il est généralement observé les évolutions suivantes de ce rapport en fonction d'évolutions d'états métaboliques :

- En régime plutôt anaérobie, la concentration en NADH libre augmente (Kuznetsov et al. 1998). On assiste ainsi à une diminution du ROOR.
- En régime plutôt aérobie, la concentration en NADH libre diminue (Kuznetsov et al. 1998). On assiste ainsi à une augmentation du ROOR.
- Il faut également considérer la mort cellulaire, qui arrive dans les parties centrales des tumeurs, qui se retrouvent en manque d'oxygène et de nutriments. Dans ce cas le ratio redox va plutôt diminuer avec le temps (baisse du NADH par dégradation). Il faut ainsi étudier un environnement complet (bords et centre) afin de le différencier d'un tissu sain.

L'utilisation du ratio redox pose cependant quelques difficultés. Il repose sur l'utilisation de molécules faiblement fluorescentes dans un milieu complexe. De plus son interprétation nécessite souvent d'être à même de détecter des variations de signal d'une dizaine de pourcents (Kuznetsov et al. 1998). Il est donc nécessaire pour l'utiliser de disposer d'un dispositif avec un fort pouvoir discriminant et donc d'un bon rapport signal à bruit.

4. Fluorescence du NADH et du FAD

Le NADH (réduit) et le FAD (oxydé), sont les molécules d'intérêt pour la mesure du ROOR car ce sont les seules molécules fluorescentes de la chaîne de production d'ATP. En effet, en fonction de l'activité de la cellule à un instant donné, sa production d'ATP varie, ce qui se traduit par un changement dans la concentration de ces coenzymes, suivant les mécanismes décrits ci-dessus. Suivant ce même phénomène ces molécules peuvent nous renseigner sur l'état d'oxygénation d'une cellule, si elle est impliquée dans un processus cancéreux, inflammatoire... La fluorescence collectée va donc varier à son tour, offrant une image du métabolisme (Kuznetsov et al. 1998).

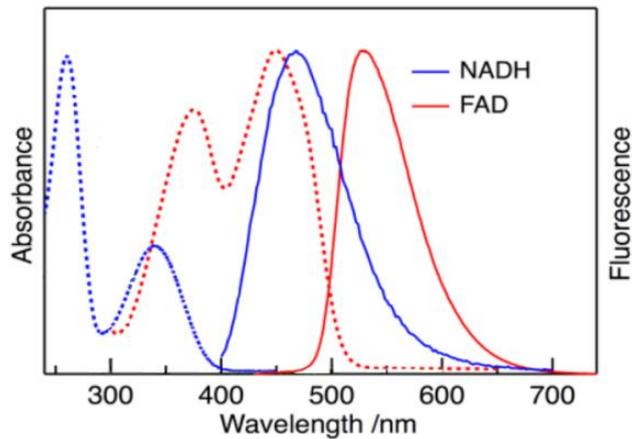


Figure I-5. Spectre d'absorption (en pointillé) et d'émission (ligne pleine) du NADH (Bleu) et FAD (rouge).

La mesure du ROOR est rendue possible par le fait que le NADH et le FAD ont des propriétés spectroscopiques différentes. Les pics d'émissions étant partiellement distincts, il suffit d'utiliser 2 canaux de détections adaptés pour obtenir les intensités des fluorescences relatives à chaque molécule. Cependant cette détection n'est pas aisée. D'une part le NADH et le FAD sont présents dans la cellule en petite quantité : de l'ordre de la centaine de micromolaire pour le NADH et de quelques dizaines de micromolaires pour le FAD.

On a ainsi :

- $C_{\text{NADH}} = \{100-500\} \mu\text{mol/L}$ (ou μM);
- $C_{\text{FAD}} = \{1-10\} \mu\text{mol/L}$ (ou μM);

D'autre part nous verrons que leurs sections efficaces d'absorption et leurs rendements quantiques sont eux aussi faibles. Enfin il faut limiter les intervalles spectraux de détection pour éviter le recouvrement des spectres d'émission (Figure I-5) lors d'une excitation concomitante des deux molécules. Ce problème peut être résolu simplement par l'utilisation d'une excitation sélective du FAD seul.

Une autre problématique pour les imager est due à leurs excitations, optimales pour des longueurs d'ondes différentes. Il est ainsi nécessaire de recourir à une excitation bicolore ce qui complexifie le système expérimental. Cette nécessité est particulièrement vraie en endoscopie où les ouvertures numériques limitées et l'utilisation de fibres va réduire l'efficacité de collection et où une excitation en dehors des maxima d'absorption est d'autant plus pénalisante.

II. Définition et intérêt de la fluorescence à deux photons pour le rapport d'oxydo-réduction optique

Le ROOR permet donc une lecture du métabolisme énergétique de la cellule grâce à la fluorescence intrinsèque du NADH et du FAD. Cela nécessite un rapport signal sur bruit important.

De plus, l'étude de ce rapport en profondeur dans les tissus est riche en information. Il est en effet connu que les carcinomes, les cancers développés à partir d'un tissu épithélial, migrent de l'épithélium vers le stroma lors de leurs développements. Il est donc nécessaire, afin de pouvoir les détecter précocement de disposer d'un outil à même de sonder en profondeur la matière biologique. C'est pourquoi ce rapport connaît depuis quelques années un renouveau grâce à de la microscopie multiphotonique.

Cette technique permet de sonder les matières en utilisant un rayonnement proche infrarouge, moins sensible que l'ultraviolet à la diffusion et à l'absorption dans les tissus et autorise donc une profondeur de pénétration accrue dans la matière. Celui-ci dispose en effet d'une profondeur de pénétration de quelques centaines de microns et permet donc réaliser la tomographie d'un épithélium d'épaisseur typique de 50 à 200 μm .

1. Fluorescence à deux photons

La microscopie multiphotonique repose sur l'utilisation de la réponse optique non linéaire de la matière exposée à un intense rayonnement lumineux. On distingue plusieurs types de réponses possibles en fonction de la nature de l'interaction onde-matière. Dans ce paragraphe, je m'attache à présenter la nature des signaux utiles dans le cas de notre étude : la fluorescence par excitation à deux photons (Two-Photon Excited Fluorescence (2PEF)).

Lorsqu'un matériau est soumis à un champ électrique \vec{E} intense, ce matériau peut modifier ses propriétés optiques. Cette modification est à l'origine des différents effets dits « non-linéaires ». D'un point de vue quantique, ils peuvent être traduits par l'absorption simultanée de plusieurs photons par les constituants atomiques et moléculaires du matériau et ont été prédits en 1931 par Maria Goeppert-Mayer (M. Goppert-Mayer 1931) puis mis en évidence en 1961 par Kaiser et Garret (Garrett et al. 1961). Ce phénomène trouve sa place en microscopie en 1990 quand Winfried Denk développe le tout premier microscope multiphotonique (Denk et al. 1990).

La fluorescence par excitation à deux photons repose sur l'absorption simultanée de deux photons identiques par une molécule fluorescente. Les énergies des deux photons s'additionnent et permettent alors à la molécule d'atteindre un état excité. Cette excitation est assimilable à une excitation à une longueur d'onde moitié du point de vue électromagnétique. Ce phénomène est fonction de la partie imaginaire du tenseur de susceptibilité non-linéaire optique d'ordre 3 $\chi^{(3)}$ de la matière irradiée (Boyd 2003).

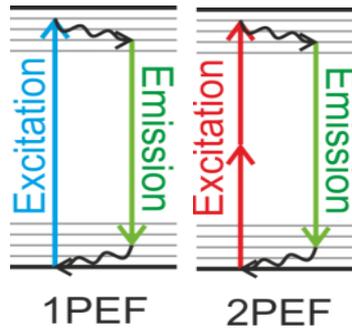


Figure I-6 : Diagramme de Jablonski présentant la fluorescence par excitation à un et deux photons.

La molécule va alors subir des transitions internes non radiatives vers un niveau vibrationnel plus bas puis une désexcitation radiative menant à la génération d'un photon de fluorescence. Les transitions internes abaissent l'énergie du photon émis par rapport à la somme des énergies des deux photons absorbés, la différence de ces énergies étant appelée « décalage de Stokes ».

Sans stimulation de l'émission cette désexcitation est spontanée et isotrope. Le temps au bout duquel elle se produit dépend notamment de l'environnement de la molécule et est appelé « temps de vie de fluorescence ». Ce temps de vie offre ainsi une information complémentaire. Des développements dans ce sens ont été effectués et seront abordés en dernière partie de ce manuscrit.

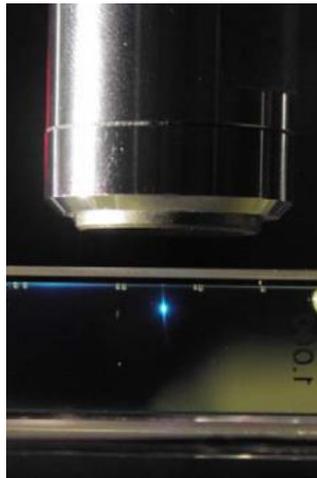


Figure I-7 Localisation spatiale de la fluorescence à deux photons (extrait de (Lelek 2006)).

Dans le cas d'un échantillon homogène et d'un faisceau excitateur focalisé de profil transverse gaussien on peut montrer que l'émission de fluorescence est proportionnelle au carré de la puissance moyenne excitatrice (Hopt & Neher 2001; Xu & Webb 1996):

$$F_{2PEF} = \alpha \langle P(t) \rangle^2$$

Avec :

$$\alpha = \frac{1}{2} \Phi \eta(\lambda) C \delta \frac{G}{f \tau} \frac{8n}{\pi \lambda}$$

- F_{2PEF} : Flux de photon moyen de fluorescence à 2 photons collecté.
- $\langle P(t) \rangle$: Puissance moyenne de l'excitation Infrarouge (IR).
- Φ : Section efficace d'absorption à 2 photons de la molécule.

- $\eta(\lambda)$: Efficacité quantique de fluorescence de la molécule excitée.
- C : Concentration de la molécule excitée.
- δ : Efficacité de collection du système optique considéré.
- G : Coefficient sans dimension rendant compte de la forme des impulsions excitatrices.
- f : Fréquence de répétition des impulsions excitatrices.
- τ : Durée à mi-hauteur en intensité des impulsions.
- n : Indice de réfraction du milieu.
- λ : Longueur d'onde d'excitation.

Afin d'obtenir un signal important il faut maximiser la probabilité d'obtention d'interactions non linéaires. Cela se traduit par l'utilisation d'impulsions laser ultra-brèves, de l'ordre de 100 femtosecondes, confinées spatialement par focalisation du faisceau sur l'échantillon. La densité de puissance requise n'étant disponible qu'au point focal, cette technique induit une confocalité naturelle qui confère à la microscopie multiphotonique des avantages indéniables. Notamment un meilleur rapport signal à bruit, la possibilité de sectionnement optique ainsi qu'un photoblanchiment réduit par rapport à la microscopie confocale mais aussi la détection de structures non centro-symétriques (cristallines), via la génération de seconde harmonique.

Enfin, le domaine spectral de travail typique (700-950 nm) permis par les lasers de type titane : saphir permet d'observer sélectivement les fluorescences endogènes et exogènes usuelles en microscopie linéaire.

Grâce à ces propriétés, la microscopie multiphotonique est un outil puissant pour sonder les fluorescences intrinsèques de la matière biologique. Ce qui se révèle essentiel pour des applications cliniques où l'utilisation de produits de contraste, souvent cancérigènes, est restreinte.

2. Excitation du NADH et des FAD à deux photons

Nous avons vu que le NADH et le FAD s'excitent sur des intervalles spectraux différents et qu'ils sont présents à de faibles concentrations dans la cellule. De plus leurs sections efficaces d'absorption et leurs rendements quantiques sont eux aussi assez faibles, ce qui induit une fluorescence faible (Kuznetsov et al. 1998; Xu & Webb 1996)(voir Figure I-8).

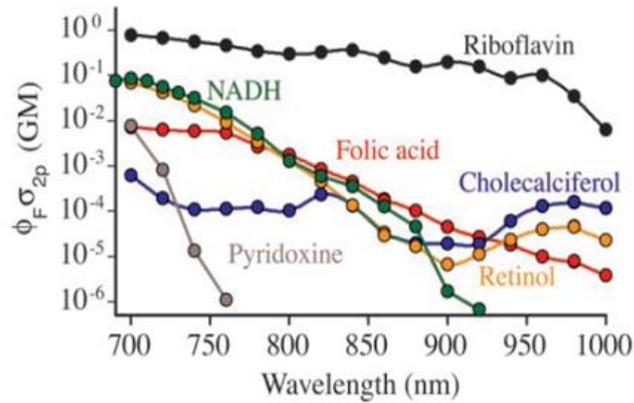


Figure I-8 : Section efficace de fluorescence à deux photons associée à différentes molécules fluorescentes, incluant NADH et flavines (Zipfel et al. 2003)

On a donc une section efficace de fluorescence à deux photons de :

- $\phi_{\text{NADH}} = 0.1 \text{ GM}$ (Zipfel et al. 2003) (rappel $C_{\text{NADH}} = \{100-500\} \mu\text{M}$;
- $\phi_{\text{FAD}} = 1 \text{ GM}$ (Huhner et al. 2015) (rappel $C_{\text{FAD}} = \{1-10\} \mu\text{M}$;

Il est à noter que ces sections efficaces sont de l'ordre de 10 à 100 fois plus faibles que celles de fluorophores exogènes usuels. Il est donc nécessaire d'exciter ces molécules autour de leurs pics d'absorption afin de maximiser le signal. On a ainsi différentes configurations possibles dans la littérature (à deux photons), d'où nous avons déterminé les valeurs que nous utiliserons par la suite:

	λ excitation NADH	λ excitation FAD	Bande de détection NADH	Miroir Dichroïque	Bande de détection FAD
(Skala et al. 2007)	800 nm	890 nm	Passe bas 700nm	non	400 - 600 nm
(Quinn et al. 2013)	755 nm	860 nm	440 - 480 nm	495 nm	500 – 550 nm
(Rice et al. 2010)	755 nm	860 nm	420 - 490 nm	495 nm	500 – 550 nm
Ce que nous utiliserons	760 nm	860 nm	420 - 500 nm	495 nm	518 – 558 nm

3. Application du rapport d'oxydo-réduction optique à deux photons, *in vivo*.

Le rapport d'oxydo-réduction optique est surtout utilisé en recherche biomédicale. Les applications possibles varient de la recherche fondamentale, comme le suivi de la différenciation de cellules souches, à des sujets de médecine appliquée. Parmi celles-ci, la détection et le suivi de cancer sont particulièrement pertinentes pour notre étude.

En effet en 2007, Melissa C. Skala démontre qu'il est possible d'étudier la carcinogénèse, *in vivo*, à l'aide du rapport d'oxydo-réduction à deux photons. Plus encore elle montre que si le ratio redox présente quelques limitations, qui seront détaillées lors du dernier chapitre de cette thèse, les informations spatiales obtenues en microscopie à deux photons permettent un apport essentiel à cette étude.

Celle-ci porte sur l'évolution de cellules cancéreuses se situant au niveau des joues d'un hamster, à l'intérieur de la cavité orale. Cette étude propose d'étudier l'évolution de cellules cancéreuses au moyen du ROOR à deux photons, en temps de vie (qui sera abordé au chapitre V de ce manuscrit) et au moyen du rapport nucléo-cytoplasmique (RNC), c'est-à-dire l'évolution du rapport de la taille du noyau sur la taille de la cellule.

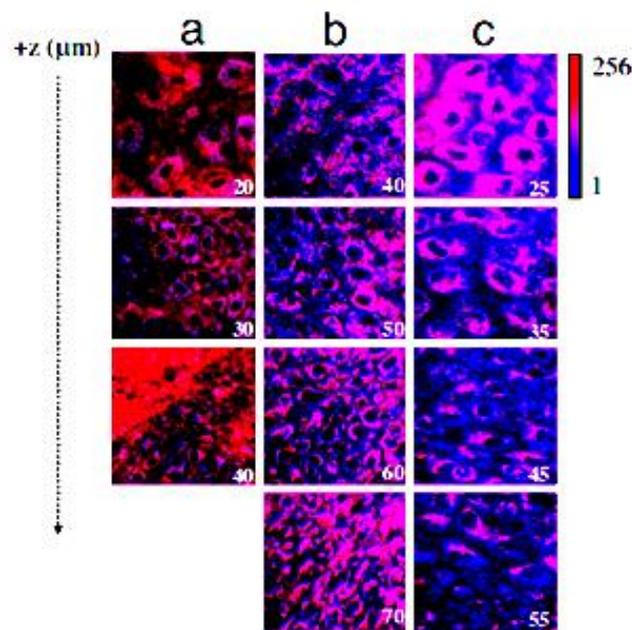


Figure I-9 : Exemple d'utilisation du rapport d'oxydo-réduction à deux photons : le suivi de cellules cancéreuses. De gauche à droite : a : cellules saines, b : cellules précancéreuses à un stade précoce, c : cellules précancéreuses à un stade avancé. De haut en bas, profondeur à l'intérieur du tissu (Skala et al. 2007).

On constate que la fluorescence du NADH et des FAD est très largement présente dans le cytosol et pas dans le noyau des cellules. Il en résulte que l'on image le cytoplasme ainsi qu'un fantôme de noyau qui permet de calculer le RNC, et ainsi de corrélérer les résultats du ROOR.

Les résultats permettent en particulier de mettre en évidence deux phénomènes. D'une part le ratio redox diminue avec l'avancement du cancer. Ce phénomène, lié à l'effet Warburg, est celui décrit plus haut. On constate qu'il y a une différence évidente entre les cellules saines et cancéreuses, liée à leurs métabolismes différents. Ainsi plus la cellule cancéreuse évolue, plus elle privilégie la voie métabolique anaérobie, ce qui se traduit par un rapport plus faible (Warburg 1956).

D'autre part, afin de distinguer entre les cellules précancéreuses précoces et avancées, il est nécessaire de pouvoir imaginer en profondeur. En effet comme ces cellules migrent de l'épithélium vers le stroma au cours du temps, afin de classer les stades d'avancement du cancer, il faut pouvoir

résoudre la fluorescence au sein même des tissus. Le rapport d'oxydo-réduction en surface ne permet donc pas d'accéder à toute l'information *in vivo*. C'est ce que l'on constate sur la Figure I-9 entre les cellules cancéreuses précoces et avancées : c'est en profondeur, dans les tissus, que la différence est nettement marquée.

En conclusion le 2P-ROOR présente un très fort potentiel pour le diagnostic et le suivi en cancérologie. Cependant pour des applications *in vivo*, il est, pour le moment, limité à des cibles facilement accessibles comme la peau ou la joue (Skala et al. 2007; Balu et al. 2013). Cette limitation est due à l'encombrement important des microscopes multiphotoniques de table.

Notre but est de proposer cette modalité en déportant et miniaturisant la partie distale d'un microscope grâce à une fibre optique. Nous souhaitons ainsi permettre l'utilisation de ce contraste, au sein même d'un organisme, en profondeur, pour une utilisation endoscopique en clinique.

III. Etat de l'art des systèmes endomicroscopiques commerciaux pour des applications cliniques

Afin d'étudier les pathologies cellulaires ou tissulaires, les chirurgiens ont recouru à la biopsie, c'est-à-dire à un prélèvement *in situ* d'un échantillon. Cet échantillon est ensuite étudié par un anatomopathologiste grâce à des techniques d'imagerie classiques, à l'aide de marqueurs comme la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E). Cette observation peut se faire lors de l'opération (on parle alors d'observation extemporanée) ou plus tard. Il en résulte que :

- La biopsie est un acte chirurgical traumatique non bénin. Le prélèvement du tissu peut induire des lésions à même de favoriser la prolifération de cellules cancéreuses. Il peut aussi produire une hémorragie, qui entraîne une lésion des tissus ou organes environnants. Cela peut aussi entraîner la dissémination des cellules cancéreuses, et donc un risque métastatique important.
- L'étude en anatomopathologie demande du temps (découpe en lame, marquage, analyse...). Dans l'analyse des marges chirurgicales par exemple (le tissu sacrificiel retiré autour d'une tumeur pour éviter de laisser des cellules cancéreuses et donc prévenir la régénération de la tumeur) ce délai à l'analyse, qui peut se chiffrer en jours, peut entraîner une nouvelle opération du patient. Il y a alors d'une part un risque sanitaire accru pour le patient mais aussi d'autre part un coût des soins supplémentaires important.
- Enfin cette analyse nécessite des techniques de marquage et de fixation qui peuvent altérer de façon significative l'échantillon et ainsi biaiser l'analyse effectuée.

L'endomicroscopie est une technique pensée pour répondre à toutes ces limites. Elle permet une analyse *in vivo in situ*, sans marquage et permet donc d'éviter au maximum les biais. Cette analyse ne requiert pas de prélèvement, puisque l'analyse en profondeur est permise *in situ* par la pénétration optique.

L'objectif de mon travail est ainsi de proposer un endomicroscope capable de suppléer à la biopsie pour le dépistage des carcinomes. Celui-ci devra être à même de pouvoir établir une image ROOR résolue en profondeur dans les tissus biologiques, *in vivo, in situ*. Il devra donc :

- Etre en mesure d'exciter et collecter la fluorescence du NADH et des FAD, avec un bon rapport signal à bruit.
- Etre capable d'obtenir ce signal dans et au travers d'un épithélium, afin de pouvoir suivre la progression d'un cancer.
- Avoir une résolution suffisante pour pouvoir établir le rapport nucléo-cytoplasmique.

Il existe aujourd'hui diverses solutions commerciales d'endomicroscopie. Nous allons voir qu'aucune de celles-ci ne répond complètement aux besoins définis ci-dessus.

La solution microendoscopique optique la mieux implémentée en médecine est la tomographie en cohérence optique, ou OCT. L'OCT, technique inventée par J.Fujimoto (Fujimoto 1991) consiste en un équivalent optique de l'échographie. Un interféromètre à faible cohérence est utilisé pour produire une image 3D de la réflectance optique des microstructures dans les tissus biologiques. L'OCT propose donc une image morphologique via l'analyse des changements d'indice de réfraction optique. Elle n'est donc pas utilisable pour la lecture du métabolisme. Elle peut par contre être associée à la microscopie de fluorescence et apporter un surcroît d'information. Cet appareil est notamment utilisé pour la détection de l'athérosclérose (Hamidi et al. 2016). Cependant cette solution est sous optimale, car sa résolution limitée (30 μm) ne permet pas d'imager les cellules et ne permet donc pas de répondre aux fortes contraintes du ROOR.

1. Endomicroscope de fluorescence

Laura Marcu de l'Université de Davis aux Etats-Unis propose un appareil de mesure à fibre qui mesure le temps de vie de fluorescence moyen de plusieurs intervalles spectraux sur une zone sous investigation. Assisté par une visualisation par caméra, le chirurgien balaye la sonde sur un tissu. Il voit alors, en direct, l'information de fluorescence s'afficher en surimpression sur l'image de la caméra, lui permettant de distinguer les zones saines des zones atteintes (Gorpas et al. 2016). Ce système, encore très amont et qui est au stade de développement préclinique, répond cependant à certains de nos besoins pour la lecture du ROOR. En effet l'excitation est réalisée par un laser déclenché émettant à 355nm et assure l'excitation simultanée du NADH et du FAD. Parmi les quatre canaux spectraux de détection proposés, deux correspondent à la détection du NADH (446-486 nm) et du FAD (517-567 nm). Cet appareil se prête donc à la lecture du ROOR, dans des conditions sous-optimales car il ne permet pas de discriminer nettement les deux molécules.

En effet, cette excitation à 355 nm induit aussi la fluorescence d'autres constituants comme le collagène ce qui va induire un bruit sur la mesure. Ce bruit produit une image difficile à analyser, qui permet cependant de discriminer des cas pathologiques qualitativement, mais pas d'obtenir un contraste quantitatif biochimique. De plus l'utilisation de sources UV en clinique n'est pas souhaitable à cause des photodommages importants qu'elles induisent.

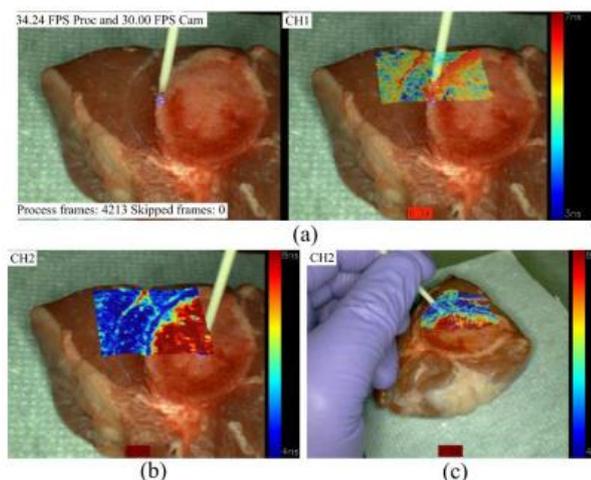


Figure I-10 : Exemple d'utilisation du FLIM en réalité augmentée sur un tissu (Gorpas et al. 2016)

Il faut souligner que l'information qui est mesurée ici est le temps de vie de fluorescence. Comme nous le verrons, ce contraste, qui est l'objet du dernier chapitre de ce manuscrit, peut être avantageux pour l'étude du métabolisme (Georgakoudi & Quinn 2012).

Cette méthode ne permet pas l'étude du ratio redox ni d'imager en profondeur. Elle n'assure pas non plus un bon rapport signal sur bruit et ajoute des fluorescences parasites. Enfin la résolution de 0.5 mm ne permet pas de distinguer les cellules entre elles. Pour toutes ces raisons, elle ne correspond pas aux spécifications que nous nous sommes fixées. Il existe par contre des solutions commerciales d'endomicroscopie confocale à haute résolution qui répondent à certaines de ces limitations.

2. La microscopie confocale

Les solutions d'endomicroscopie confocale (CLE) sont aujourd'hui de plus en plus utilisées en pratique dans les blocs opératoires.

Deux appareils commerciaux distincts sont utilisés. Le premier est commercialisé sous le nom de Viewnivo de la société Optiscan. Il s'agit d'un scanner miniaturisé en bout d'une fibre optique monomode couplée à un système de balayage résolu en profondeur. La fibre assure la collection du signal et l'excitation à un photon des fluorophores.

La seconde est le Cellvizio de la société française Mauna Kea technologies. Celui-ci utilise un guide d'image, ou faisceau fait de quelques dizaines de milliers de fibres optiques, qui joue le rôle de prolongateur d'un microscope confocal placé en amont. Le Cellvizio est traditionnellement introduit dans le canal opérateur d'un endoscope chirurgical traditionnel. Chaque fibre du faisceau est associée à un pixel. On reconstruit ainsi une image au bout de l'endomicroscope, par la mesure de la fluorescence à 1 photon transmise par chaque cœur.

Dans le cadre de la lecture du rapport d'oxydo-réduction optique, ces solutions ne sont pas pertinentes. En effet celles-ci présentent un rapport signal à bruit trop faible pour la détection de faibles fluorescences intrinsèques. Elles sont souvent associées à des marqueurs fluorescents exogènes non spécifiques comme la fluorescéine pour pallier à ce problème. La détection de fluorescence intrinsèque faiblement fluorescente y est donc très difficile, ce qui est contraire à nos attentes.

L'architecture se basant sur l'utilisation du faisceau de fibres présente un problème supplémentaire. L'excitation du NADH, optimale vers 360 nm, va induire l'autofluorescence et le noircissement du germanium dopant la fibre (Udovich et al. 2008). De plus ce type de fibre ne se prête pas à l'optique non linéaire, comme nous le verrons plus tard.

Pour conclure, il n'existe pas à l'heure actuelle de dispositif commercial ou préclinique qui répond aux critères de l'endomicroscopie du ROOR.

IV. Endomicroscopie non linéaire fibré.

L'endomicroscope multiphotonique présente potentiellement un grand intérêt pour la pratique clinique comme la possibilité de détecter des fluorescences intrinsèques avec un meilleur rapport signal à bruit. Comme nous l'avons vu, cette caractéristique est essentielle pour le ROOR. On peut ajouter qu'elle est essentielle pour l'application clinique de l'endomicroscopie, car elle permet de s'affranchir des agents de contraste. Ceux-ci sont souvent cancérigènes et leur usage est extrêmement limité en pratique clinique.

Ils offrent en outre, grâce à la génération de seconde harmonique (SHG), la possibilité d'imager la matrice extracellulaire notamment grâce à de l'imagerie du collagène de type I. Il est en effet connu que lors d'un cancer cette matrice se structure différemment. Enfin, au travers de la résolution subcellulaire offerte par ce type d'appareil, on peut sonder la matière cellule à cellule avec précision.

Mon travail à Xlim prend la suite de la thèse de Guillaume Ducourthial (Ducourthial et al. 2015) qui a mis au point une première version d'EMMP. Ce premier prototype présente des performances de premier plan et répond à un cahier des charges précis et strict :

- Une durée d'impulsion IR de durée inférieure à 100 femtosecondes autour de 800 nm.
- Une fibre optique d'au moins 5 mètres de long, afin d'assurer une maniabilité maximale du dispositif.
- Une détection des réponses 2PEF intrinsèque et SHG en simultané (2 canaux).
- Un champ de vue important : 250 μm .
- Une résolution submicronique.
- Un nombre d'images important (images/s), afin de pouvoir imager des cibles mobiles
- Une partie distale miniaturisée de diamètre externe de 2.2 mm. Cette condition permet d'assurer le passage du dispositif dans le canal opérateur d'un endoscope.
- Un poids inférieur à 2 g, afin d'être applicable à l'imagerie du petit animal.

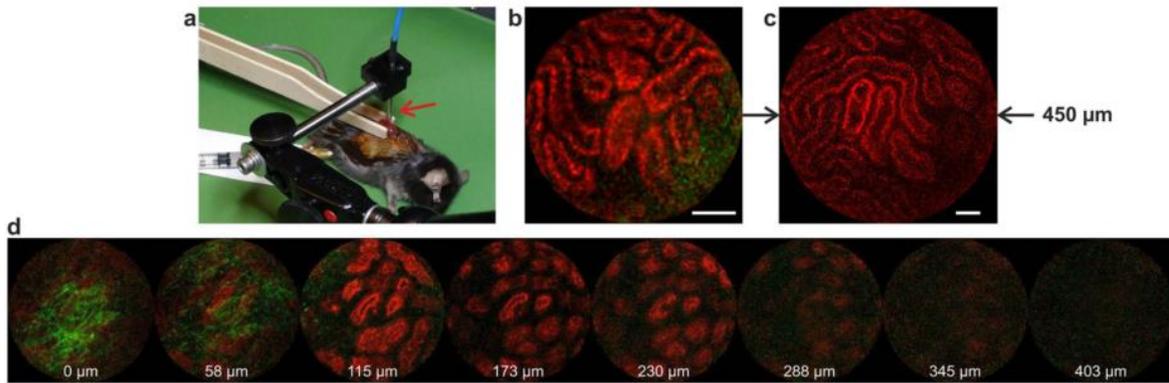


Figure I-11 : Imagerie in vivo, sans marquage sur rein de souris. (a) souris anesthésiée sous la sonde multiphotonique (flèche rouge). (b-c) En vert SHG de la capsule rénale et fluorescence des tubules b : champ de 250 μm , c : champ de 450 μm . (d) Section optique du rein fibrotique de la souris, on observe une fluorescence jusqu'à 350-400 μm de profondeur. (Ducourthial et al. 2015)

Cet appareil, qui sera présenté en détail dans le chapitre 3, a été conçu pour la visualisation des cellules et tissus non marqués et des structures de la matrice extracellulaire. Un exemple d'application ciblé par ce premier prototype est le diagnostic du carcinome pulmonaire par la visualisation de l'élastine et du collagène des bronches. Cet endomicroscope a permis d'imager, *in vivo*, pour la première fois, la SHG de la capsule rénale, une enveloppe de collagène de faible épaisseur (5 μm), ainsi que la restructuration et l'épaississement de celle-ci dans un cas de fibrose rénale. Il a en outre démontré sa capacité à sonder les fluorescences intrinsèques du rein, excité à 800 nm, jusqu'à 350 μm de profondeur à 8 images par seconde. Ce prototype doit cependant évoluer afin de permettre l'imagerie du métabolisme et atteindre son plein potentiel.

Ce prototype a été conçu pour fonctionner efficacement dans la bande spectrale qui s'étend de 790 à 830 nm. En dehors de cet intervalle, la puissance moyenne disponible sur l'échantillon chute drastiquement pour des raisons qui seront abordées lors du chapitre 2. Or, comme nous l'avons vu, afin d'imager le NADH il faut pouvoir descendre la longueur d'onde centrale d'excitation jusqu'à 760 nm au moins. Inversement, le FAD nécessite de pouvoir acheminer des impulsions centrées autour de 860 nm. Il est donc essentiel, pour accéder à l'imagerie du métabolisme, d'augmenter la bande spectrale accessible de l'EMMP afin de pouvoir imager ces fluorophores. D'autre part il est nécessaire d'utiliser une excitation bicolore.

De la même façon nous avons vu que le NADH et le FAD, de par leur faible concentration dans la cellule et leurs sections efficaces d'absorption réduites, sont difficilement excitables. Pour les imager, et à plus forte raison, pour les imager en profondeur dans un tissu biologique, nous avons besoin de disposer de réserve en puissance. Le prototype qui a été présenté possède des pertes importantes qui limitent la puissance moyenne. De plus les longueurs d'onde d'excitation retenues pour le ROOR imposent d'utiliser les lasers titane : saphir quasiment en bord de bande, ce qui limite la puissance disponible. Il sera donc indispensable de réduire significativement ces pertes.

Enfin, afin d'éviter tout recouvrement entre fluorescences du NADH et du FAD, il faut mettre en place une excitation alternée des deux constituants. Pour cela on va imager l'échantillon successivement avec l'une ou l'autre des voies. Cela entraîne une contrainte sur la cadence d'imagerie de l'appareil, qui est divisée par deux pour obtenir l'information du ROOR.

Mon but est de dépasser ces limitations et donc de permettre la visualisation du métabolisme cellulaire par le ROOR, en temps réel et sans marquage, au moyen d'un endomicroscope multiphotonique. Pour ce faire le cahier des charges de l'endomicroscope doit évoluer suivant ces critères :

- Deux voies d'excitations de longueurs d'onde centrales 760 et 860 nm, utilisables de manière séquentielle, en conservant des impulsions inférieures à 100 femtosecondes. Celles-ci doivent exciter respectivement le NADH et le FAD.
- Une puissance moyenne entre 50 et 100 mW pour chaque voie. Le photoendommagement est évité par la focalisation moindre qu'en microscopie.
- Une vitesse d'imagerie à cadence vidéo (25 images/seconde)

En conclusion de ce chapitre nous avons donc vu que :

- Le suivi du métabolisme cellulaire est un outil pertinent pour la détection d'états pathologiques
- Il peut être assuré par l'imagerie, *in vivo in situ* et de manière peu invasive, des fluorescences de métabolites tels que le NADH et le FAD.
- Ce contraste présente un fort potentiel clinique pour la détection précoce des cancers.
- Pour le suivi des carcinogénèses, ce contraste associé aux qualités de l'imagerie multiphotonique présente une forte synergie. En particulier, ces cancers se développent en migrant des strates superficielles d'un épithélium vers les couches basales, l'imagerie 3D permise par le sectionnement optique est donc indispensable.
- Pour utiliser pleinement ce contraste, il faut pouvoir accéder au tissu et donc imager sans la contrainte et l'encombrement d'un microscope de table. Il faut donc utiliser un endomicroscope.
- Les endomicroscopes commerciaux ne permettent pas ce type d'imagerie. De plus, compte tenu de la synergie de la technique avec la microscopie multiphotonique, il est nécessaire de développer un endomicroscope non linéaire capable d'exciter et de détecter les fluorescences cellulaires intrinsèques
- Nous disposons d'un prototype d'EMMP qui présente des performances de premier plan. Cet endomicroscope doit évoluer pour répondre aux demandes de l'imagerie métabolique. En particulier celui-ci doit être accordable en longueur d'onde sur une large plage spectrale (760-860 nm) et disposer d'une réserve en puissance plus importante.

Chapitre II. Développement d'un système de déport par fibre optique d'impulsions femtosecondes accordable

I. Problématique liée au transport d'impulsions femtosecondes par fibre optique

Nous avons vu dans le chapitre précédent que notre but est de faire évoluer un endomicroscope conçu précédemment afin qu'il devienne capable d'imager le métabolisme cellulaire, ce qui nécessite de disposer de deux voies d'excitation à 760 et 860 nm. Cet endomicroscope se base sur une architecture qui comprend un laser femtoseconde, suivi d'un système étireur-compresseur. Dans ce chapitre, je présente dans un premier temps pourquoi l'architecture étireur-compresseur est utilisée. Puis je décris plus en détails quelle stratégie a été mise en place lors de travaux précédant ma thèse. Nous verrons que l'étireur qui a été précédemment utilisé limite la bande spectrale accessible et l'efficacité énergétique en dehors de la longueur d'onde prévue de 800 nm. Cette limitation nous empêche par conséquent d'exciter efficacement le NADH (760 nm) ou le FAD (860 nm). Je présente comment j'y ai répondu avec l'utilisation d'un nouvel étireur. Enfin je présente l'ensemble du travail de simulation et de caractérisation de ce nouvel élément.

1. Dispersion chromatique de la fibre optique

La dispersion chromatique est une conséquence de la variation à l'ordre 2 de l'indice effectif n de la fibre optique en fonction de la longueur d'onde. Chaque paquet de fréquences d'une impulsion se propage à une vitesse de groupe différente, ce qui conduit à un étalement temporel de l'impulsion et qui va conduire à diminuer l'énergie crête de l'impulsion et donc sa capacité à produire un signal non linéaire. En pratique, pour une impulsion centrée à 800 nm se propageant dans une fibre optique à dispersion dite « normale », les paquets de grandes longueurs d'onde (« rouges ») vont se propager plus vite que les paquets de courtes longueurs d'onde (« bleues »).

Mathématiquement, les effets de la dispersion sont pris en compte en décomposant en série de Taylor la constante de propagation β autour de la pulsation centrale ω_0 (Agrawal 2006) :

$$\beta(\omega) = n(\omega) \frac{\omega}{c} = \beta_0 + \beta_1(\omega - \omega_0) + \frac{1}{2}\beta_2(\omega - \omega_0)^2 + \frac{1}{6}\beta_3(\omega - \omega_0)^3 \dots$$
 (c : vitesse de la lumière dans le vide)

Cela se traduit par une modulation de phase des composantes spectrales, dépendant de la pulsation ω , de l'indice effectif de la fibre $n(\omega)$ et de la distance parcourue z dans la fibre :

$$\varphi(\omega) = -\beta(\omega)z = -n(\omega) \frac{\omega}{c} z = \varphi_0 + \varphi_1(\omega - \omega_0) + \frac{1}{2}\varphi_2(\omega - \omega_0)^2 + \frac{1}{6}\varphi_3(\omega - \omega_0)^3 \dots$$

β_1 et φ_1 représentent respectivement le temps de groupe par unité de longueur et l'opposé du temps de groupe de l'impulsion

$$\beta_1 = \frac{1}{v_g} = \frac{n_g}{c} (>0) \quad ; \quad \varphi_1 = -\frac{z}{v_g} = -T_g (<0)$$

- avec v_g , la vitesse de groupe :

$$v_g = \frac{c}{n_g(\omega)}$$

- T_g le temps de groupe,
- et n_g , l'indice de groupe :

$$n_g(\omega) = n(\omega) + \omega \frac{dn}{d\omega}$$

Les termes quadratiques β_2 et φ_2 correspondent respectivement à la dispersion de temps de groupe par unité de longueur et à la dispersion de vitesse de groupe. Pour β_2 on parle de second ordre de dispersion (SOD) (Figure II-1). Dans le cas de la propagation dans une fibre optique on utilise aussi usuellement le coefficient de dispersion D exprimé en $\text{ps.nm}^{-1}.\text{km}^{-1}$ tel que,

$$D(\lambda) = -\frac{d\beta_1}{d\lambda} = \frac{2\pi c}{\lambda_0^2} \beta_2 = -\frac{2\pi c}{\lambda_0^2 L} \varphi_2 = \frac{\lambda}{c} \frac{d^2 n}{d\lambda^2}, \text{ dans la convention de l'optique visible}$$

On parle de dispersion « normale » lorsque $D > 0$, c'est-à-dire, dans cette convention, que les longueurs d'onde plus importantes se propagent plus vite que les longueurs d'onde plus faibles. Dans le cas contraire on parle de dispersion anormale.

Pour une impulsion avec une porteuse initialement sans phase, de largeur spectrale à mi-hauteur en intensité (LMHI) $\Delta\lambda$, se propageant sur une longueur $L > L_D$ dans une fibre, on a ainsi la relation (Agrawal 2006) qui donne la durée en sortie de l'impulsion Δt :

$$\Delta t \approx L * \Delta\lambda * D$$

où L_D est la longueur de dispersion, qui, par définition, représente la longueur de fibre qui induit un allongement de l'impulsion de largeur temporelle initiale Δt_0 d'un facteur $\sqrt{2}$:

$$L_D = \frac{\pi c}{2 \ln(2) \lambda^2 D} \Delta t_0$$

En considérant une impulsion gaussienne de largeur à mi-hauteur en intensité de 100 fs, centrée autour de 800 nm, pour une fibre monomode standard ($D \approx 120 \text{ fs}/(\text{nm.m})$), on obtient une longueur de dispersion de 9 cm. Pour les besoins de l'application, les fibres endoscopiques sont souvent de plusieurs mètres et nécessitent par conséquent de prendre en compte cette dispersion.

Les termes cubiques β_3 et φ_3 correspondent au troisième ordre de dispersion (TOD) (Figure II-1).

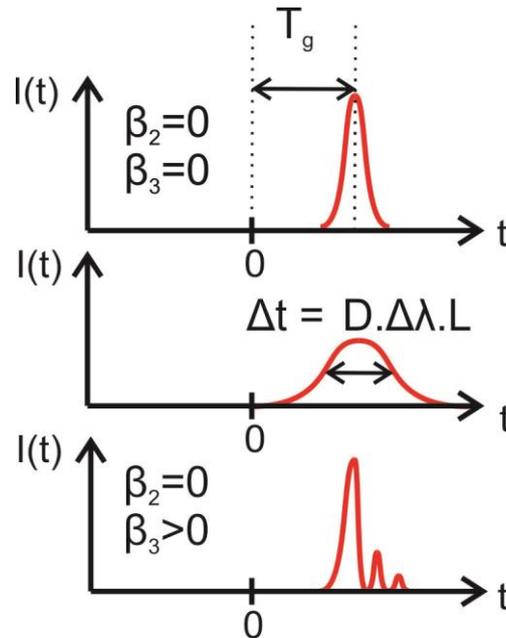


Figure II-1 : Effet des différents ordres de dispersion sur une impulsion. De haut en bas les effets des ordres 1 à 3.

Enfin les termes quartiques β_4 et φ_4 correspondent au quatrième ordre de dispersion (FOD). Son effet est similaire au SOD mais est significatif quand β_2 et β_3 sont compensés et pour des largeurs spectrales importantes.

2. Gestion de la dispersion

a. Fibres à dispersion annulée

Il existe des solutions qui permettent de s'affranchir des problèmes imposés par la dispersion, la première étant de choisir un guide d'onde à dispersion annulée, comme les fibres à cœur creux. Parmi ces fibres on peut citer les fibres à gaine à bande interdite photonique (Cregan 1999). Celles-ci présentent néanmoins des inconvénients majeurs comme une forte atténuation, une taille de cœur importante ou une accordabilité quasi nulle, qui ne répondent pas à nos besoins. Un nouveau type de fibre à cœur creux, les fibres à gaine Kagomé (Russell et al. 2014) répondent à certains de ces problèmes et permettent la réalisation de micro-endoscopes performants (Lombardini 2016). Elles permettent d'allier les avantages des fibres creuses, mais avec une transmission supérieure, sur une bande plus large. Elles présentent en revanche une taille de cœur toujours importante (quelque dizaines de microns). Or, la taille du cœur de la fibre optique est un facteur important pour le développement d'un endomicroscope. Celle-ci va conditionner la taille du mode en sortie de fibre. Par conséquent les cœurs larges des fibres creuses imposent d'utiliser une optique distale qui possède un rapport de grandissement très faible afin de ré-imager le cœur sur les cibles et obtenir un système à même de résoudre des structures subcellulaires. Ce grandissement, associé à un besoin d'encombrement axial réduit compte tenu de la nécessité de miniaturisation des endoscopes conduit à des distances focales faibles. Très récemment, la thèse d'A.Lombardini (Lombardini 2016), dans le cadre de l'endomicroscopie Raman stimulée, présente comment l'introduction en bout de fibre Kagomé d'une bille de silice de très courte focale (quelque dizaines de μm), qui agit comme une première lentille permet de s'affranchir de cette limitation .

Cette solution innovante n'a pas été envisagée dans le cadre de ce travail, car la technique dite du « nanojet photonique » (Ferrand et al. 2008) employée n'était pas mature au début de mon travail de thèse. Celle-ci représente néanmoins une solution pertinente et pourrait être utilisée à l'avenir, en particulier avec les nouvelles générations de fibres à cœur creux qui réduisent encore la taille de la microstructure nécessaire au guidage, comme les fibres à anneau unique à maille tubulaire (Debord et al. 2016).

b. Architecture étireur-compresseur

J'utilise donc une fibre microstructurée à cœur plein en silice pure dont le guidage est assuré par réflexion totale par la diminution de l'indice effectif de la gaine induit par des trous d'air. Elle sera présentée en détail au cours du chapitre III. Son diamètre de mode est égal à $3,5 \mu\text{m}$ ce qui assure une bonne résolution d'imagerie pour l'endomicroscope, même couplé à des optiques standard. Cette fibre a été conçue dans le cadre de la thèse de Guillaume Ducourthial, en partenariat avec Alexandre Kudlinski (PhLAM UMR CNRS 8523), qui assure aussi sa réalisation.

Le choix d'utiliser une fibre à cœur plein impose par conséquent de compenser la forte dispersion de la fibre. Dans une fibre à dispersion « normale » ($D > 0$) les groupes de longueurs d'onde élevées (« rouge ») se propagent plus vite que les basses longueurs d'onde (« bleue »). Afin de synchroniser ces paquets de fréquences en sortie de la fibre on va imposer un retard aux paquets les plus rapides et donc étirer l'impulsion en la pré-dispersant afin que chaque paquet de fréquence arrive de manière synchrone en bout de fibre. On parle alors d'un système-compresseur (Figure II-2).

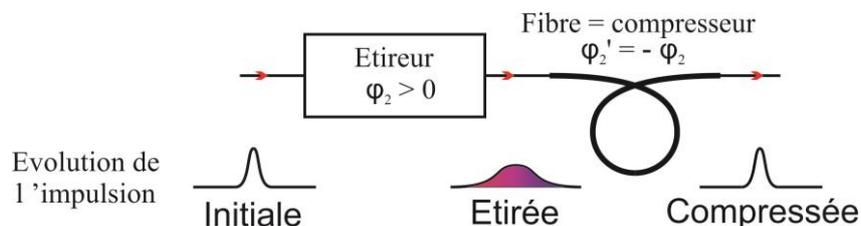


Figure II-2 : Schéma d'un système étireur-compresseur. La fibre endoscopique sert ici de compresseur

Je présente dans la suite de ce chapitre deux des approches utilisées en endomicroscopie multiphotonique.

i. Étireur à fibre à dispersion négative

Une première approche consiste à utiliser pour étireur une fibre optique dont la dispersion est anormale (Y. Wu et al. 2009). Si l'on veut compenser une longueur L_e de fibre endoscopique de dispersion D_e tel que $D_e > 0$ alors on lui ajoute une longueur L_c d'une fibre compensatrice de dispersion $D_c < 0$ tel que :

$$L_e * D_e + L_c * D_c = 0$$

Cette approche présente l'avantage d'être entièrement fibrée et donc robuste et compacte. Cependant elle souffre de plusieurs inconvénients majeurs comme le manque d'accordabilité : cette relation n'étant vraie que pour une seule longueur d'onde. Si l'on change cette longueur d'onde il faut alors travailler avec une longueur de fibre différente. De plus si l'ordre 2 est parfaitement compensé, les ordres supérieurs ne le sont pas forcément. Il en résulte que l'impulsion présente des déformations qui vont réduire sa capacité à produire un signal non linéaire. Dans la publication de (Y.

Wu et al. 2009) la durée de l'impulsion à la sortie du compresseur est ainsi de 160 fs contre 60 fs en sortie de laser.

Les fibres compensatrices à cœur plein vers 800 nm sont extrêmement non linéaires car elles présentent un cœur de très petite taille. Il y a alors un risque de fragmentation spectro-temporelle de l'impulsion par effet d'autofocalisation temporelle (i.e. fragmentation en une multitude de solitons). En conséquence, il est nécessaire de limiter l'énergie qui se propage dans ces fibres, ce qui les rend peu adaptées pour les applications de microscopie multiphotonique.

La fibre compensatrice peut aussi être à cœur creux. Il n'y a alors plus de problème de non linéarité mais cela se fait au prix d'une transmission fortement réduite ce qui va limiter les performances globales du système. La publication (Y. Wu et al. 2009) qui met en œuvre cette solution, la fibre endoscopique est ainsi réduite à un tronçon de 76 cm.

ii. Étireur à réseaux de diffraction de type Treacy

L'élément le plus utilisé est l'étireur à réseaux de diffraction. Celui-ci comprend deux réseaux identiques disposés parallèlement. Le premier réseau disperse angulairement les composantes spectrales du faisceau incident avant que celles-ci soient recollimatées par le second réseau. Un miroir placé après le deuxième réseau, permet au faisceau résultant de parcourir le chemin inverse, afin de reconstituer un faisceau sans dispersion spatiale (Figure II-3).

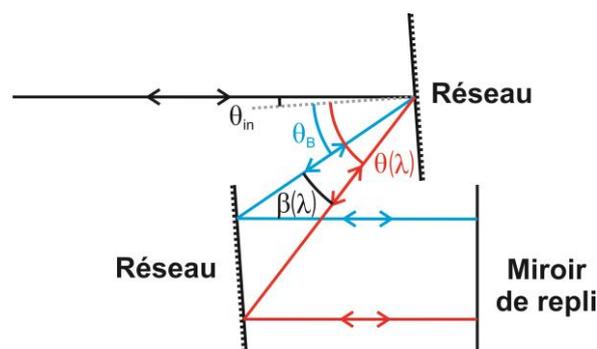


Figure II-3 : Schéma de principe d'une ligne Treacy.

A la sortie de l'étireur, une modulation de phase spectrale a été imposée au spectre de l'impulsion en fonction des grandeurs opto-géométriques de l'étireur, notamment de la distance entre les deux réseaux. Cette solution est donc accordable. Pour cette raison cet étireur a été utilisé dans de nombreux endomicroscopes multiphotoniques (Gu et al. 2014; Lelek 2006; Zhang et al. 2012; Zhao et al. 2010). Il possède en outre d'une bonne efficacité énergétique (>50%).

En contrepartie cet étireur induit une dispersion d'ordre 3 non ajustable importante et positive (Lelek 2006). Pour cette raison et compte tenu de la stratégie de compensation des effets non linéaires qui s'avère nécessaire comme nous allons le voir par la suite, cette limitation ne permet pas d'obtenir des impulsions compressées de manière optimale.

3. Non linéarité de la fibre optique

A la dispersion s'ajoute la non linéarité optique de la fibre ce qui accroît les contraintes comme nous allons le voir. Dans une architecture étireur-compresseur lorsque les impulsions vont se propager en bout de fibre qui sert de compresseur, l'intensité va induire des effets non linéaires

parasites, comme l'automodulation de phase de type effet Kerr (« self phase modulation » en anglais, SPM), qui va conduire à une variation instantanée de l'indice effectif $n(t)$ en fonction de l'intensité instantanée de l'impulsion (Agrawal 2006).

$$n(t) = n + n_2 I(t)$$

Où n_2 est coefficient d'indice non linéaire tel que :

$$n_2 = \frac{3}{8n} \text{Re}(\chi^{(3)})$$

Sa valeur pour une fibre en silice pure est de $n_2 = 3,2 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2 \cdot \text{W}^{-1}$. Pour une impulsion de 100 mW de puissance moyenne et 100 fs issue d'un titane : saphir de fréquence de répétition 80MHz se propageant dans une fibre de silice standard de rayon en $1/e$ en champs $3.3 \mu\text{m}$ on obtient une intensité d'environ $10^{15} \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$. La modification instantanée de l'indice (10^{-4} , 10^{-5}) peut paraître faible mais est suffisante pour modifier les propriétés de l'impulsion comme nous allons le voir

Ceci se traduit par une automodulation de la phase temporelle de l'impulsion :

$$\varphi_{NL}(t) = \frac{-2\pi}{\lambda} n_2 I(t) L$$

Cette automodulation de phase entraîne une variation de la fréquence instantanée autour de sa fréquence centrale f_0 :

$$f(t) - f_0 = \frac{1}{2\pi} \frac{\partial \varphi_{NL}(t)}{\partial t} = -\frac{n_2}{\lambda} L \frac{dI(t)}{dt}$$

Ce phénomène provoque le décalage de la porteuse se situant sur le front avant de l'impulsion vers les longueurs d'onde élevées et du front arrière vers les longueurs d'ondes courtes. Ainsi pour une impulsion qui ne présente pas de modulation de phase préalable, la SPM provoque un élargissement spectral.

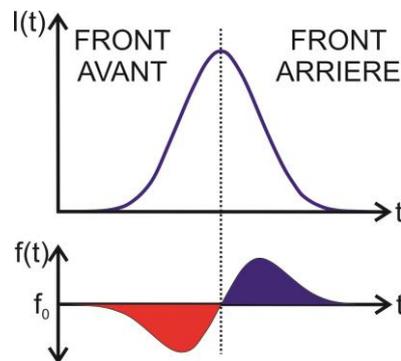


Figure II-4 : Automodulation de la fréquence par effet Kerr en l'absence de dispersion.

Dans le cas d'une impulsion initialement dispersée anormalement comme dans le cas d'un système étireur-compresseur, des paquets de fréquence « bleue » étant présents sur le front avant de l'impulsion, l'effet de l'automodulation de phase provoque leur décalage vers la fréquence centrale. De même, les paquets de fréquence « rouge » étant présents en aval de l'impulsion, l'automodulation de phase provoque leur décalage vers la fréquence centrale. Ce phénomène entraîne un transfert de l'énergie vers la fréquence centrale. On parle alors de compression spectrale.

Comme nous utilisons un système étireur-compresseur, où la fibre endoscopique joue le rôle de compresseur, les impulsions dispersées anormalement se propageant dans celle-ci vont donc subir un effet de compression spectrale.

Cette compression spectrale implique que même pour une compensation de dispersion parfaite il va exister un allongement temporel des impulsions en limite de Fourier. En conséquence, les impulsions compensées en sortie de compresseur seront plus longues, ce qui va réduire notre capacité à exciter efficacement la matière de l'échantillon. Il est donc nécessaire d'éviter ou de compenser cet effet de SPM.

Une solution pour diminuer la SPM serait d'utiliser une fibre à large aire modale (LMA), afin d'augmenter l'aire effective de la fibre et par conséquent d'augmenter le seuil d'apparition de ces effets non linéaires. Mais comme nous l'avons vu précédemment les cœurs de tailles importantes imposent des contraintes sur l'architecture globale. Cette possibilité ne convient donc pas.

La solution retenue (figure II-5) tire parti de ces effets de la SPM. En amont du système étireur-compresseur on place une fibre monomode standard. Comme l'impulsion n'est pas préalablement dispersée en amont de cette fibre il se produit donc un élargissement spectral par SPM. Cet élargissement va venir compenser la compression spectrale qui a lieu plus tard dans la fibre endoscopique.

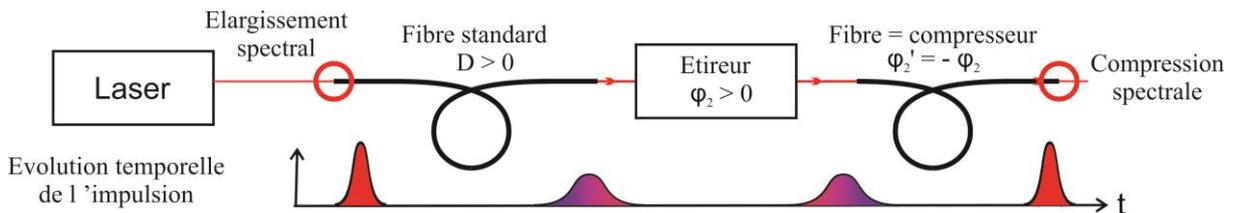


Figure II-5 : Schéma de principe de stratégie de compensation de la dispersion et des effets non linéaires.

Cette solution augmente les contraintes sur l'étireur qui doit compenser la dispersion induite par les deux fibres sur un spectre large (Lelek 2006), ce qui entraîne une sensibilité accrue du système aux ordres de dispersion supérieurs.

II. Compensation de dispersion large bande à haute efficacité énergétique à l'aide d'un étireur à GRISM

1. Compensation de dispersion jusqu'à l'ordre 3 à l'aide d'un étireur à GRISM en réflexion

La stratégie de compensation des effets non linéaires qui vient d'être présentée impose en sortie de première fibre un spectre large (60 nm). Afin de compenser correctement la dispersion d'un spectre aussi large il est nécessaire de pouvoir contrôler l'ordre 2 mais aussi l'ordre 3 de dispersion. L'étireur à réseaux de diffraction qui a été décrit plus haut n'est donc pas utilisable car il ajoute une importante dispersion non contrôlable d'ordre 3 du même signe que les fibres. Il est donc nécessaire d'utiliser une stratégie différente. La thèse de C. Lefort (Lefort 2012; Kalashyan et al. 2012) introduit pour la première fois en endomicroscopie non linéaire l'utilisation d'un étireur qui permet de s'affranchir de ces limites, dont l'élément de base est le GRISM (contraction de GRating et de prISM),

constitué d'un réseau de diffraction accolé à un prisme. L'étireur est composé de deux GRISMs en réflexion.

On peut utiliser ceux-ci de manière analogue à l'étireur de Treacy. On dispose deux GRISMs de manière antiparallèle. Le premier sert à séparer angulairement les composantes spectrales. Le second collimate celles-ci. On obtient donc un faisceau collimaté où les composantes spectrales sont dispersées sur un axe. A l'aide d'un miroir de repli en sortie du second réseau, ce faisceau va se propager en sens inverse dans l'étireur et reconstruire un faisceau sans aberrations spectro-spatiales, sous réserve que les deux GRISMs soient parfaitement parallèles.

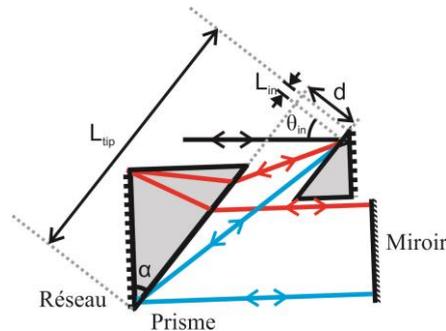


Figure II-6 : Etireur à GRISM en réflexion. (Extrait de (Ducourthial 2014))

Ce type d'étireur permet de compenser simultanément les ordres 2 et 3 de dispersion de la fibre endoscopique, ce qui assure une compression temporelle optimale en bout de fibre. Nous avons vu précédemment que l'étireur à réseaux compense la dispersion d'ordre 2 d'un compresseur à fibre mais rajoute de la dispersion d'ordre trois ; l'étireur à prismes pour sa part, peut compenser la dispersion d'ordre 2 mais surcompense la dispersion d'ordre 3. En associant ces deux effets on parvient donc à compenser simultanément des ordres 2 et 3 de dispersion en réglant l'angle incident θ_{in} du faisceau sur l'étireur et la distance d entre les deux GRISM.

Associée à un tronçon de fibre standard dont la fonction est d'élargir le spectre du laser ($\Delta\lambda' \approx 60\text{nm}$), cette technique de pré-compensation linéaire et non linéaire avancée a permis l'obtention à la sortie d'une fibre endoscopique de 5 mètres d'impulsions énergétiques ($\approx 1\text{nJ}$), en limite de Fourier, de durée $\Delta t = 39\text{ fs}$, plus courte donc que celle du laser. Ce résultat est la conséquence de l'obtention en sortie de fibre endoscopique d'une impulsion présentant un spectre plus large que l'impulsion en sortie de laser et donc potentiellement des impulsions comprimées en limite de Fourier plus courtes. Le contrôle des ordres 2 et 3 de dispersion nous permet de recomprimer les impulsions correctement sur un spectre large et donc d'obtenir des impulsions de durées inférieures à celle du laser. Ce résultat est limité d'une part par la dispersion d'ordre 4, non contrôlable, qui va limiter la compensation de la dispersion pour un spectre trop large et d'autre part, par la compression spectrale qui va réduire la taille du spectre pour de fortes puissances se propageant dans la fibre endoscopique.

2. Etireur à GRISM en transmission

Dans la configuration précédente de l'appareil, la longueur d'onde porteuse des impulsions se situait entre 800 nm et 830 nm ce qui a permis d'imager sans marquage les constituants fondamentaux de la matrice extracellulaire que sont l'élastine (par fluorescence à deux photons) et le collagène (par doublage de fréquence). Par contre un fonctionnement à 760 nm et un fonctionnement à 860 nm, qui sont indispensables pour exciter l'autofluorescence à 2 photons

respectivement du NADH et du FAD intracellulaires, se sont avérés impossibles à cause de la bande passante réduite de l'étireur. En effet, les GRISMs de l'étireur étaient initialement composés de réseaux gravés métallisés à échelle fonctionnant en réflexion. Ces réseaux ayant une transmission réduite en dehors de leur longueur d'onde d'utilisation nominale, la bande passante de l'étireur était limitée à quelques dizaines de nanomètres (Figure II-7). D'autre part l'efficacité de diffraction de ces composants était insuffisante (85%) si on considère que le signal frappe 4 fois sur ce type de composant dans l'étireur qui est en double passage (Kalashyan et al. 2012). En pratique la transmission globale maximale a atteint au maximum 32%. Les GRISMs utilisés lors de la thèse de G. Ducourthial présentent une usure qui a réduit cette transmission à 20%.

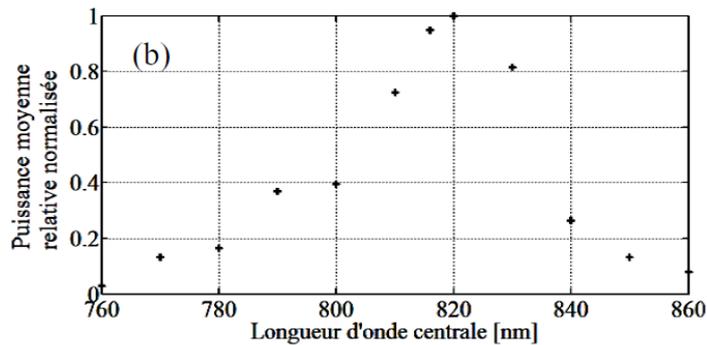


Figure II-7 : Evolution normalisée (1 = 32%) par rapport au maximum de la puissance moyenne en sortie d'étireur à GRISM en réflexion. On constate que la puissance moyenne s'écroule en dehors d'une courte bande spectrale d'utilisation. Issus de (Lefort 2012)

Afin d'augmenter très significativement la bande spectrale de l'appareil et de disposer d'une réserve de puissance suffisante, nous nous sommes inspirés de travaux récents de P. Tournois (l'inventeur des GRISMs) portant sur les chaînes amplifiées ultralarge bande haute énergie et basés sur l'emploi de GRISMs à réseaux de diffraction holographiques photo-inscrits en silice pure fonctionnant en transmission (IBSEN Photonics) (Forget et al. 2012; Ricci et al. 2012; Krauss et al. 2015). La publication Forget et al. 2012 présente comment cet étireur, utilisé à 800 nm, permet une compression efficace et large bande de la SOD et la TOD pour l'amplification d'impulsions femtosecondes.

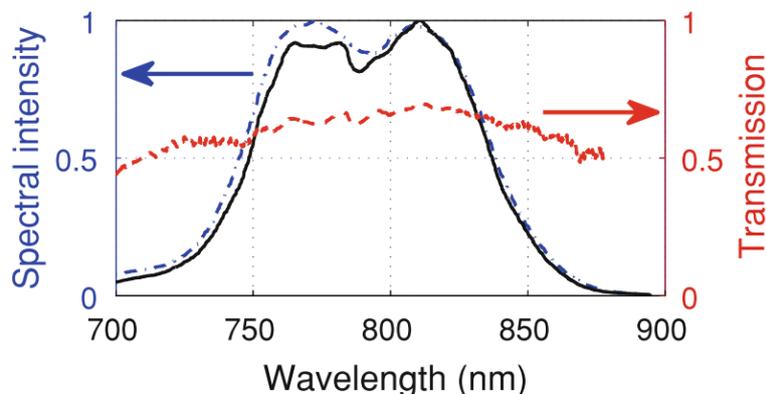


Figure II-8 : Transmission du GRISM en transmission en double passage. En bleu : Spectre en entrée de GRISM, en noir : spectre en sortie de GRISM. En rouge : la transmission des GRISM. Issue de Forget et al. 2012.

Comme on peut le voir sur la Figure II-8 issus de Forget et al. 2012 cet étireur présente une transmission importante en double passage sur un spectre large (700 nm – 900 nm). Compte tenu de la bande spectrale présentée, mais aussi des ordres de grandeurs de retard de groupe (52 ps de 750 à 850 nm), de SOD ($\approx 10^5 \text{ fs}^2$) et de ratio TOD/SOD (de -0.5 à 0.7 fs) comparables aux valeurs que nous utilisons (Kalashyan et al. 2012), ce système semble pouvoir être adapté à nos besoins. Afin de le vérifier puis de concevoir et dimensionner ce nouvel étireur à GRISM, j'ai réalisé une simulation complète du système de compensation des effets linéaires.

3. Simulations de la propagation dans le système

a. Modélisation du système

Le modèle de simulation qui est utilisé a été développé au cours de différentes thèses (Lelek 2006; Kalashyan 2012; Lefort 2012). Il prend en compte la propagation dans la fibre étireuse, l'apport de l'étireur à GRISMs en transmission, ainsi que la propagation dans la fibre endoscopique. La propagation dans les fibres est simulée grâce à la méthode à pas alternés, telle que proposée par G.P. Agrawal (Agrawal 2006). Pour cela on divise les fibres de longueur L en N tronçons de longueur $dz = L/N$. Pour chaque élément dz le champ de l'impulsion va être soumis à la dispersion dans le domaine spectral sur dz/2 puis sur l'élément dz/2 suivant ce même champ est soumis aux effets non linéaires dans le domaine temporel. C'est un modèle cohérent qui prend en compte les effets de tous les ordres de dispersion provenant des fibres optiques et de l'étireur ainsi que l'automodulation de phase de type Kerr qui permet de rendre compte de l'élargissement ou la compression spectrale qui en résulte, et la diffusion Raman issue des non linéarités d'ordre 3 au sein des fibres, le tout sur un spectre large.

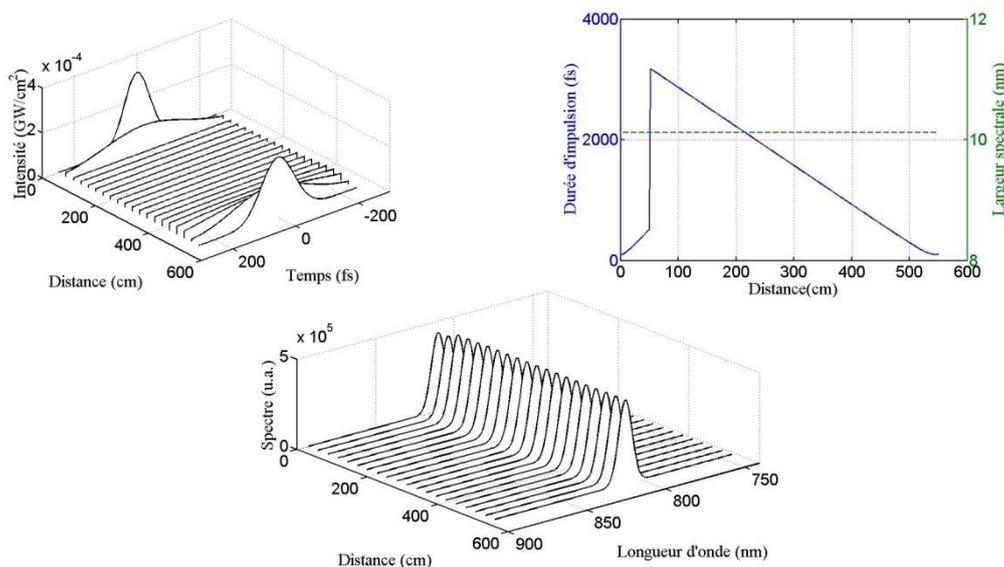


Figure II-9 : Simulation de la propagation de l'impulsion dans un cas sans pertes et sans effets non linéaires. On voit en haut à gauche l'évolution temporelle de l'impulsion dans le système lors de la propagation. En bas on trouve l'évolution du spectre associé à cette impulsion. En haut à droite on voit un graphique représentant l'évolution LMHI de la durée de l'impulsion. On y distingue nettement les contributions de la première fibre de 0.5m suivi de l'apport de l'étireur suivi enfin par la compression temporelle dans la fibre endoscopique.

Ces simulations ont été conduites pour 3 longueurs d'ondes : 760 nm, 810 nm et 860 nm. Elles ont pour but de confirmer la compensation de dispersion sur cette plage spectrale, mais aussi de connaître les propriétés géométriques du faisceau, afin de s'assurer que celui-ci traverse bien les deux prismes et les deux réseaux.

Nous avons choisi d'utiliser des prismes qui présentent un angle au sommet de 45° afin de réduire le coût des GRISM. Ce choix impose en retour de choisir le type de verre des prismes avec attention. En effet pour un angle au sommet fixé ce choix du verre des prismes va venir imposer la plage accessible pour le ratio TOD/SOD. Il est impératif que celui-ci corresponde au ratio imposé par les fibres.

b. Modélisation de l'étireur à GRISM en transmission

La modélisation de l'étireur se fait par le calcul des différents ordres de phase spectrale qu'il induit. Ceux-ci sont calculés à partir d'une formule analytique d'optique géométrique telle que définie dans (Forget et al. 2012) :

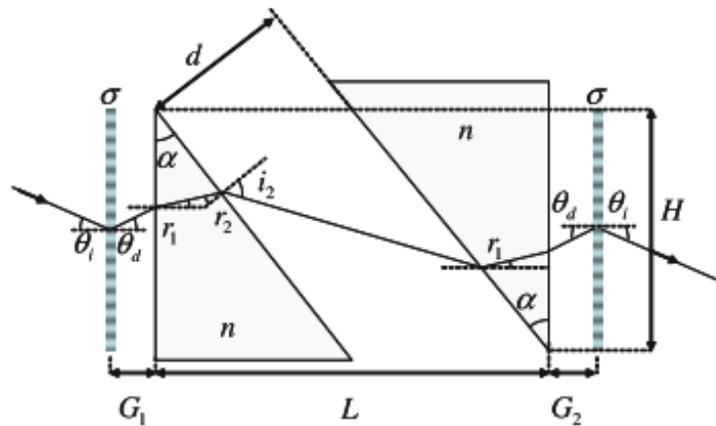


Figure II-10 : Schéma de principe d'un étireur à GRISM en transmission.(Forget et al. 2012)

Soit σ le nombre de traits par millimètre du réseau, α l'angle au sommet des prismes

θ_i correspond à l'angle de Littrow, est fixé par la longueur d'onde centrale utilisée afin d'assurer une transmission maximale.

$$2 \sin(\theta_i) = -\sigma \lambda_0 ;$$

θ_d est obtenu au moyen de la formule des réseaux, utilisée au premier ordre dans l'air:

$$\sin(\theta_d) = \lambda \sigma + \sin(\theta_i)$$

r_1, i_2 sont obtenus à l'aide des lois de Snell-Descartes

$$n \sin(r_1) = \sin(\theta_d)$$

$$n \sin(r_2) = \sin(i_2)$$

avec :

$$r_2 = r_1 - \alpha$$

L'étireur impose, pour un passage, un retard de groupe tel que (Forget et al. 2012) :

$$Tg = \frac{1}{c} \frac{d}{\cos(i_2)} + \frac{L}{\cos(r_1)} \left[N - \sin(\theta_i) \frac{\cos(r_2)}{\sin(\alpha)} \right] \cdot \left[1 - \frac{d \cos(\alpha + i_2)}{L \cos(i_2)} \right] + G \frac{1 - \cos(\theta_i - \theta_d)}{\cos(\theta_d)}$$

Avec :

- N, l'indice de groupe des prismes
- G, la distance totale entre les réseaux et les prismes ($G = G_1 + G_2$)

Il est à noter que la majorité des grandeurs géométriques mises en jeu sont fixes :

- α l'angle au sommet des prismes est fixé à la conception des Grisms
- Dans notre cas G_1 et G_2 ont été fixés car les réseaux sont accolés aux prismes et $G = 0.1$ mm (on considère un espace d'air entre les prismes et réseaux).

En conséquence les grandeurs qui nous sont accessibles pour compenser la dispersion sont L et H, soit les écarts entre les deux apex des prismes. Ceux-ci font tous deux varier la SOD et la TOD simultanément, suivant un ratio différent, si bien qu'en pratique deux platines de translation suivant deux directions orthogonales permettent de régler la dispersion.

Pour des raisons d'efficacité énergétique, nous avons choisi des réseaux holographiques en transmission de 1250 traits/mm, présentant une efficacité de diffraction à l'ordre 1 supérieure à 95% à 800 nm et pouvant fonctionner sur une bande spectrale de près de 200 nm (IBSEN Photonics PCG-1250/800)

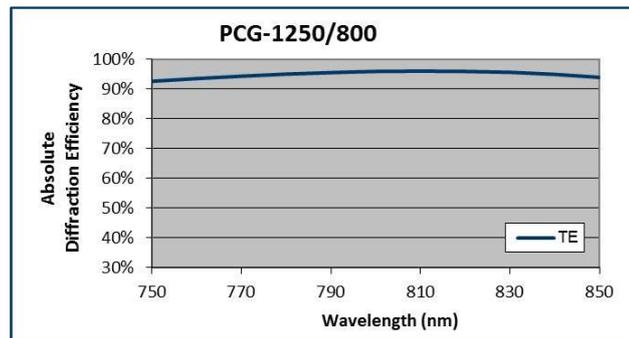
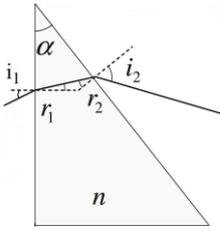


Figure II-11 : Transmission des réseaux holographiques IBSEN Photonics PCG-1250/800. Source : lbsen.com

Les prismes des GRISMs sont en verre SF57 avec revêtement antireflet assurant une transmission supérieure à 95% sur une large plage angulaire et spectrale. Le choix du SF57 assure à 810nm une dispersion d'ordre 2 compensée avec un ratio TOD/SOD de 1.55 contre 1.54 pour la fibre endoscopique comme nous le verrons par la suite au centre de la plage géométrique utilisable sur les GRISMs pour un angle au sommet de 45°.



	750 nm	%R @750 nm	800 nm	%R @800 nm	850 nm	%R @850 nm
$i_1(^{\circ})$	-25.94	0.021559	-29.99	0.13060	-34.22	0.23642
$i_2(^{\circ})$	-70.92	0.44981	-62.44	-	-55.76	0.86527

Tableau 1 :
Valeur de la

réflexion en pourcentage des prismes en SF57 à 750, 800 et 850 nm pour leurs angles d'entrée et de sortie associés.

En double passage, en considérant 8 dioptries pour les prismes et 4 passages dans les réseaux on approxime une transmission autour de :

$$T \approx 0.99^8 * 0.95^4 \approx 0.75$$

Le choix des composants étant arrêté, j'ai par la suite procédé à des simulations pour confirmer le fonctionnement de l'étireur.

c. Modélisation de la fibre endoscopique

Dans un premier temps j'ai cherché à simuler la fibre endoscopique. Le programme dans sa version antérieure se base sur un modèle de silice fondue décalé et ajusté de façon empirique pour calculer la dispersion autour de 800 nm. Ce modèle simple ne rend donc pas correctement compte de la dispersion de la fibre sur tout le spectre, et en particulier pour les ordres supérieurs à 3 aux longueurs d'onde de travail 760 et 860 ce qui induit des erreurs.

Nous disposons en revanche de valeurs de dispersions données par un modèle numérique utilisant la méthode des éléments finis fournies par Alexandre Kudlinski. Ces valeurs ayant un pas spectral arbitraire n'étaient pas utilisables dans notre modèle de simulation. J'ai donc cherché à obtenir une formule analytique de l'indice effectif de la fibre permettant de travailler avec notre modèle quel que soit l'échantillonnage imposé par celui-ci.

J'ai utilisé pour cela la relation de Sellmeier qui donne une équation de l'indice effectif en fonction de la longueur d'onde :

$$n(\lambda) = \sqrt{1 + \frac{C1 * \lambda^2}{\lambda^2 - C2^2} + \frac{C3 * \lambda^2}{\lambda^2 - C4^2} + \frac{C5 * \lambda^2}{\lambda^2 - C6^2}}$$

A l'aide de Matlab j'ai défini cette relation de Sellmeier et cherché grâce à une interpolation polynomiale utilisant la méthode des moindres carrés à faire converger les coefficients C_i vers des valeurs permettant de faire tendre $n(\lambda)$ vers l'indice effectif théorique dont nous disposons. Les coefficients de cette simulation ont pour point de départ les coefficients de la silice fondue et tendent vers d'autres valeurs qui vont permettre de prendre en compte la dispersion du guide. J'ai testé la robustesse de ce modèle en comparant les valeurs théoriques et ce modèle de mesures ainsi que sa dérivée première et seconde. Les résultats sont :

$$C1 = 0.6812 ; C2 = 0.1048 ; C3 = 0.3965 ; C4 = 0.1558 ; C5 = 0.8994 ; C6 = 9.896$$

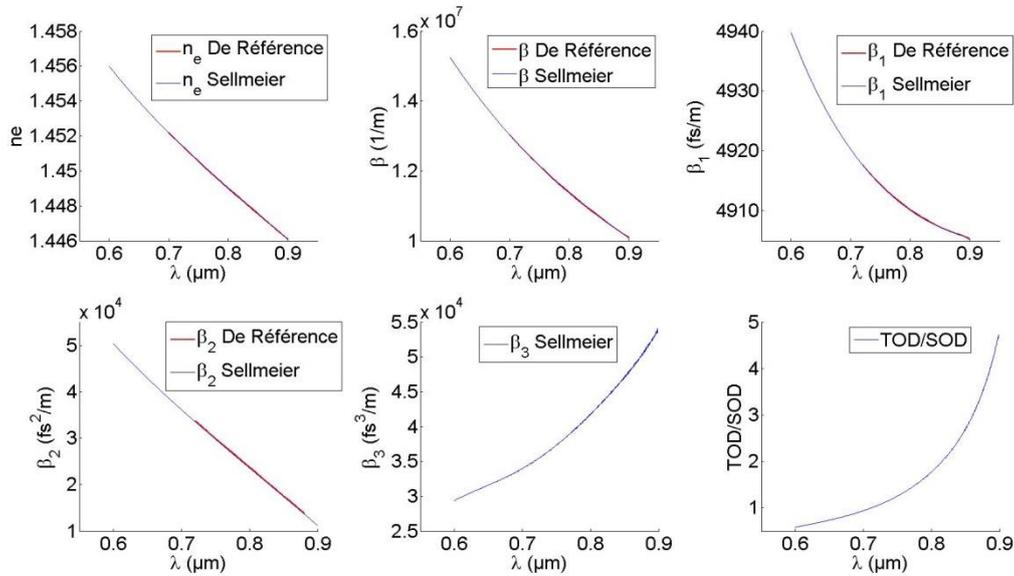


Figure II-12 : Simulation de la fibre T1628C. En rouge on peut voir les valeurs de références issues de la modélisation de la fibre à l'aide d'une méthode des éléments finis. En bleu les valeurs issues de la simulation. Le bon accord entre les mesures théoriques et de l'interpolation me permet de calculer β_3 , indispensable pour dimensionner l'étireur.

Comme on peut le voir sur la Figure II-12 cette simulation est en très bon accord avec les valeurs de référence. Cela nous a permis de remplacer dans le programme de simulation le modèle utilisé jusqu'alors. De plus, cela nous permet de déterminer un ratio TOD/SOD, nécessaire pour le dimensionnement et le choix des matériaux et composants de l'étireur. Par la suite, ce modèle a été injecté dans la simulation du système complet afin d'obtenir les résultats les plus fidèles possibles.

d. Simulation de la propagation d'impulsions dans l'ensemble du système

Afin de simuler le régime linéaire, on impose en entrée une puissance moyenne faible (0.1 mW). Cette condition permet de s'affranchir des effets non linéaires. Le spectre reste donc constant le long de la propagation.

L'analyse se fait en deux temps : on considère dans un premier temps un spectre étroit (10 nm) et des impulsions en limite de Fourier en entrée de système. Ce travail permet de compenser l'ordre 2 de dispersion. Dans un deuxième temps, on travaille avec un spectre large (60 nm) afin de mettre en évidence la capacité de l'étireur à compenser l'ordre 3 et l'influence de l'ordre 4.

Ces simulations ont un but double. Dans un premier temps s'assurer que pour notre application on peut correctement comprimer la dispersion pour des impulsions de 760 nm à 860 nm, et donc de savoir si cet étireur est adapté à nos besoins. Dans un second temps, permettre d'obtenir les caractéristiques opto-géométriques de l'étireur pour des impulsions comprimées aux différentes longueurs d'onde pour réaliser le dimensionnement de celles-ci avant l'achat des composants. Cette simulation est donc un cas simplifié qui ne prend pas en compte les effets non linéaires qui ont lieu dans les fibres. Des simulations en présence d'effets non linéaires ont aussi été effectuées mais ne correspondent pas au comportement obtenu en mesure, du fait d'un coefficient d'indice non linéaire n_2 qui peut être mésestimé. Les entrées de la simulation sont :

Laser Femtoseconde	Durée d'impulsion	100 fs	Mesurée
	Profil des impulsions	Gaussien	Mesuré
	Largeur spectrale initiale	10 nm (LMHI)	Mesurée
	Longueur d'onde	760/810/860 nm	Mesurée
	Puissance de sortie	-	Ajustable
	Fréquence de répétition	75 MHz	Mesurée
Première fibre monomode	Rayon de champs de mode	3.3 μm	Constructeur
	Longueur	0.5 m	Mesurée
	Dispersion d'ordre 2	120 fs/nm.m	Littérature
	Dispersion d'ordre 3	2.21.10 ⁻⁴¹ u.s.i.	Littérature
	Non linéarité	3.2.10 ⁻²⁰ m ² W ⁻¹	Littérature
	Puissance de sortie maximale	600 mW	Mesurée
	Atténuation	0	Littérature
	Injection	70%	Mesurée
Etireur à GRISM (reflexion)	Nombre de trait des reseaux	1250 traits/mm	Constructeur
	Apex des prismes	45°	Constructeur
	Efficacité énergétique (double passage)	70%	Mesurée
	Distance H	-	Ajustable
	Distance L	-	Ajustable
Fibre endoscopique	Rayon de champ de mode	3.5 μm	Constructeur
	Longueur	5 m	Mesurée
	Dispersion d'ordre 2	76 fs/nm.m	Simulée/Mesurée

	Non linéarité	$3.2 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2 \text{ W}^{-1}$	Littérature
	Puissance de sortie maximale	120 mW	Mesurée
	Atténuation	0	Littérature
	Injection	50%	Mesurée
Simulation	Pas du calcul	4 mm	
	Nombre de points	8192	

A partir de ces valeurs le programme simule la propagation de la lumière dans le système et affiche les évolutions de l'impulsion et de sa phase dans les domaines spectral et temporel. Les sorties qui servent de critères de qualité pour la comparaison entre les simulations sont :

- La durée finale de l'impulsion δt // la durée théorique finale de l'impulsion dans l'hypothèse d'être en limite de Fourier $\delta t_{\text{Fourier}}$
- La taille du spectre LMHI $\Delta \lambda$
- La puissance crête de l'impulsion \hat{P} // la puissance crête théorique finale de l'impulsion dans l'hypothèse d'être en limite de Fourier \hat{P}_{Fourier}

i. Spectre étroit

Les entrées sont définies comme suit :

- Lambda centre = 810 nm
- Largeur spectrale initiale 10 nm (LMHI)
- Puissance moyenne injectée dans la 1^{er} fibre = 0.1 mW

Je procède ensuite par itération à un réglage des valeurs L et H (les distances entre les angles au sommet des prismes dans les deux directions orthogonales) jusqu'à obtenir une impulsion comprimée.

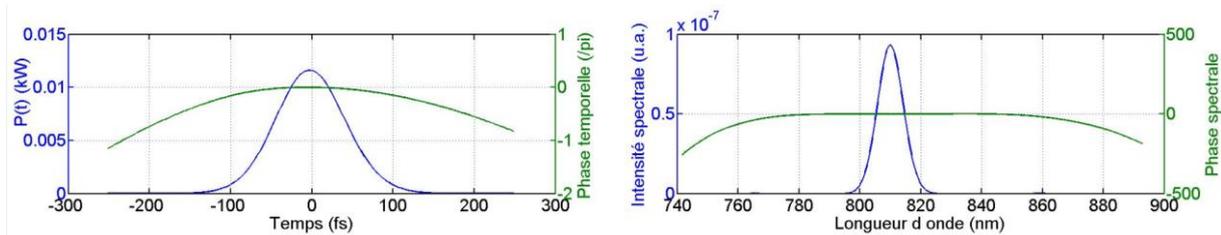


Figure II-13 : Profil de l'impulsion et de son spectre en sortie d'endoscope. A gauche : profil temporel en bleu et phase temporelle en vert. A droite : profil spectral associé à l'impulsion en bleu, phase spectrale en vert. Caractéristiques : durée d'impulsion LMHI $\delta t = 99.38 \text{ fs}$; $\Delta \lambda = 10 \text{ nm}$; $\delta t / \delta t_{\text{Fourier}} = 95\%$

Cette simulation, qui correspond au cas le plus simple, permet de confirmer que nous sommes à même de compenser convenablement l'ordre 2 de dispersion.

ii. Spectre large.

Ici notre but est de déterminer si nous sommes capables de compenser l'ordre 3 de dispersion. On utilise donc un spectre large ($\Delta\lambda = 60$ nm LMHI) afin de mettre en évidence les effets des ordres supérieurs. Nous verrons par la suite que cette valeur est analogue à ce que nous obtenons lors des manipulations

A partir de la simulation précédente je procède de nouveau à des itérations sur H et L afin de trouver un accord qui permet de compenser l'ordre 3. La Figure II-14 nous monte le résultat, une impulsion dont les ordres 2 et 3 sont correctement compensés. Toutefois l'impulsion présente en revanche des pieds issus de l'effet de l'ordre 4 de dispersion qui n'est pas compensé, comme nous le verrons à la fin de ce chapitre.

Les entrées sont définies comme suit :

- Lambda centre = 810 nm
- Largeur spectrale en sortie de laser = 60 nm LMHI
- Puissance 1^{er} fibre = 0.1 mW
- L = 26.94 mm ; H = 21.23 mm

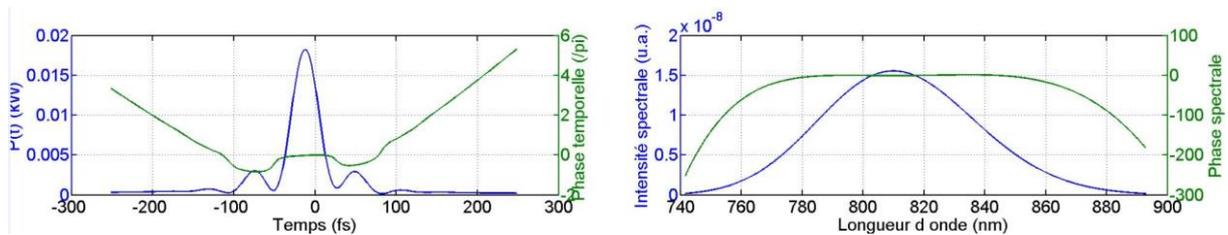


Figure II-14 : Profil de l'impulsion et de son spectre en sortie d'endoscope. A gauche : profil temporel en bleu et phase temporelle en vert. A droite : profil spectral associé à l'impulsion en bleu, phase spectrale en vert. Caractéristiques : $\delta t = 37.04$ fs ; $\Delta\lambda = 60.19$ nm ; $\delta t / \delta t_{\text{Fourier}} = 43\%$

Ce même travail de simulation a été conduit pour les deux extrema de notre bande 760 nm et 860 nm. Les résultats sont présentés ci-dessous dans le cas d'un spectre large :

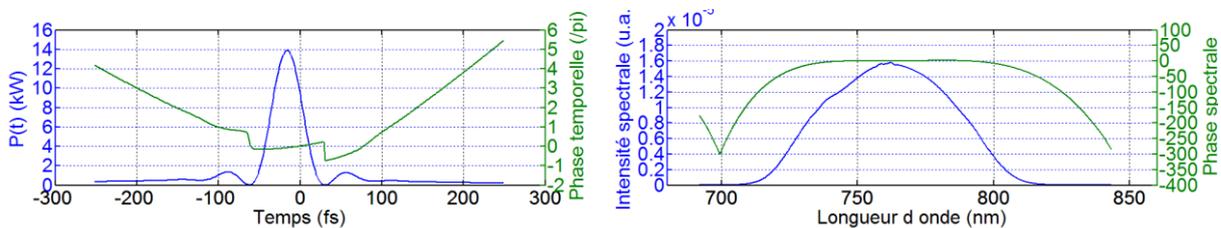


Figure II-15 : Profil de l'impulsion et de son spectre en sortie d'endoscope à 760 nm. A gauche : profil temporel en bleu et phase temporelle en vert. A droite : profil spectral associé à l'impulsion en bleu, phase spectrale en vert. Caractéristiques : $\delta t = 42,11$ fs ; $\Delta\lambda = 60,55$ nm ; $\delta t / \delta t_{\text{Fourier}} = 34\%$. L = 12 mm
H = 15.45 mm

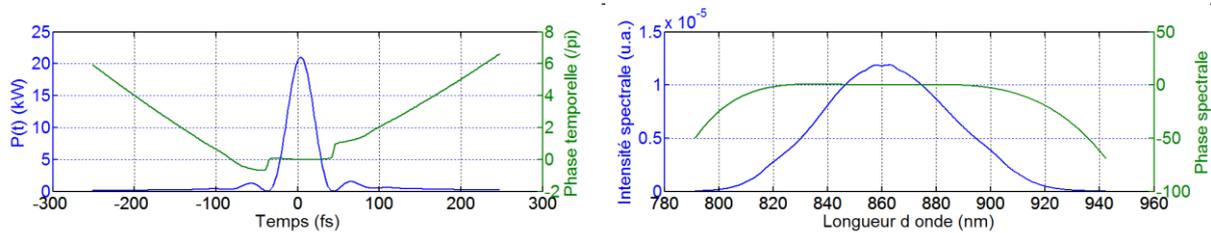


Figure II-16 : Profil de l'impulsion et de son spectre en sortie d'endoscope à 860 nm. A gauche : profil temporel en bleu et phase temporelle en vert. A droite : profil spectral associé à l'impulsion en bleu, phase spectrale en vert. Caractéristiques : $\delta t = 36,18$ fs ; $\Delta\lambda = 57$ nm ; $\delta t / \delta t_{\text{Fourier}} = 53\%$. L = 44.3 mm
H 41.4 mm.

Ces simulations nous ont conforté dans le choix d'utiliser un étireur en transmission, et de sa capacité à pouvoir compenser la dispersion dans les fibres de 760 nm à 860 nm. Le modèle de l'étireur ayant été validé en simulation, nous avons procédé au montage de celui-ci suivi de sa caractérisation.

4. Validation expérimentale des performances de l'étireur à GRISM en transmission

Ces simulations nous ont permis de dimensionner le GRISM pour nos besoins (Figure II-17 : Une fois ce travail effectué, les composants ont été achetés et les étireurs ont été assemblés. Les réseaux ont été collés sur les prismes. J'ai conçu et monté un système de maintien qui nous permet d'assurer le parallélisme des réseaux, un critère déterminant pour prévenir les aberrations spectro-spatiales. Pour cela un GRISM est placé sur une platine de rotation (MSRP01, Thorlabs) et l'autre sur une platine en berceau (GN1, Thorlabs).

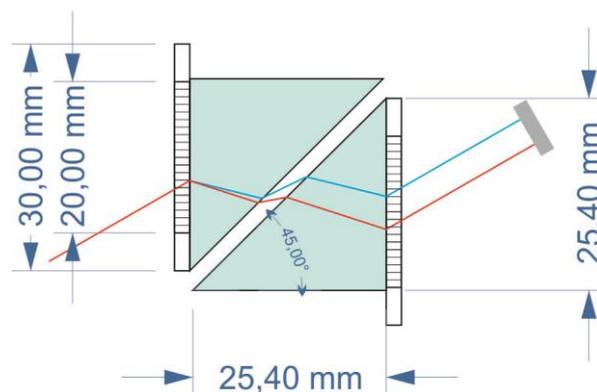


Figure II-17 : Dimensionnement des composants constitutifs des GRISMs. Les prismes sont taillés dans des blocs d'un pouce. La surface utile des réseaux est un rectangle de 20 mm par 10 mm gravé dans un substrat de 30 mm par 25,44 mm

Ce support repose sur une platine de rotation du système dans son ensemble. Celle-ci nous sert à trouver l'angle de Littrow des réseaux. Le faisceau incident arrive au niveau du centre de rotation de cette platine, sur le premier Grism qui est fixe (en bleu sur la Figure II-18). On réduit ainsi au maximum les écarts sur le pointé du faisceau en sortie lorsque l'on tourne cette platine.

Le second GRISM (en rouge sur la Figure II-18), qui est mobile, est disposé au-dessus de 2 platines de translations (M UMR5.25, Newport). Ces platines et leurs actionneurs (Newport et DM11-25, Newport) ont une course (25 mm) et une précision (0.1 μm pour le vernier le plus sensible) adéquates. Le dimensionnement de ces platines a été déterminé au cours des simulations. Elles sont

orthogonales entre-elles et placées sous le second GRISM (rouge). Ces platines ont pour rôle de modifier les grandeurs H et L et donc de permettre d'ajuster la dispersion. Enfin l'ensemble a été conçu afin d'avoir le centre des réseaux à hauteur de faisceau (7.5 cm).

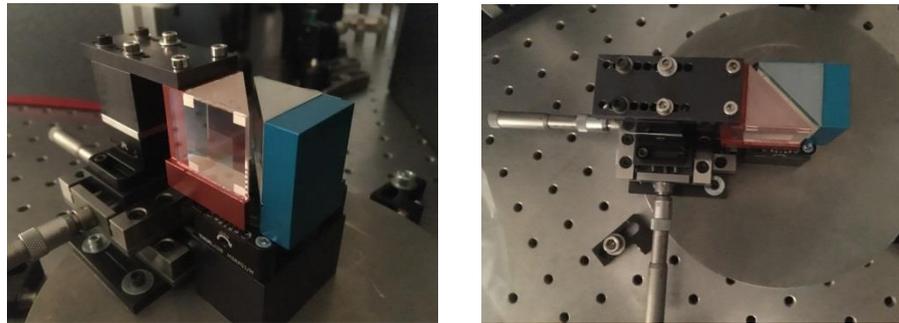


Figure II-18 : Photographies des GRISMs en transmission.

J'ai conduit par la suite une campagne de mesures qui a pour but de mesurer et valider expérimentalement les performances de l'étireur à GRISM en transmission. Nous avons caractérisé le système, alimenté par un laser Ti : saph (Coherent Mira). Un point critique de la caractérisation est que les impulsions doivent présenter un spectre de largeur à mi-hauteur $\Delta\lambda = 60$ nm après la 1^{ère} fibre, en entrée d'étireur. Encore une fois cela nous permet de vérifier la compensation des ordres 2 et 3 de dispersion aux différentes longueurs d'ondes. Ce travail de caractérisation a été conduit pour des impulsions de longueur d'onde centrale allant de 770 nm à 850 nm par pas de 10 nm.

a. Rendement énergétique

Dans un premier temps nous avons relevé la transmission de l'étireur utilisé en double passage. En pratique ce rendement oscille entre 70% et 75% sur l'intervalle {770 nm ; 850 nm}

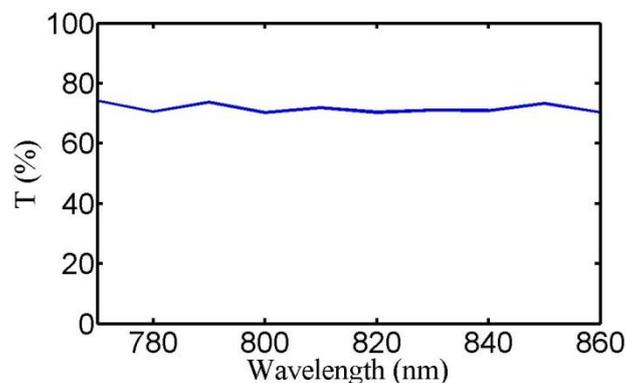


Figure II-19 : Transmission mesurée de l'étireur à GRISM en transmission en double passage. Mesure pour des impulsions compressées en bout de 5 m de fibre endoscopique par pas de 10 nm

L'objectif d'augmenter significativement la réserve énergétique est donc atteint. On passe en effet de 20 à 70% de transmission entre l'étireur en réflexion et l'étireur en transmission. Nous disposons donc d'une puissance moyenne disponible sur l'échantillon potentiellement triplée.

b. Evolution de la durée d'impulsion en bout de fibre endoscopique

Le second travail qui a été conduit est la mesure des durées d'impulsion et des spectres en bout de fibre endoscopique. On fait pour cela varier la longueur d'onde mais aussi la puissance

moyenne transmise dans le cœur de la fibre endoscopique au moyen d'une densité variable placée en amont de la fibre endoscopique. La puissance moyenne varie de 5 mW à 120 mW, qui est le maximum de puissance obtenue en bout de système pour la longueur d'onde (770 nm) où la puissance moyenne disponible en sortie de laser était la plus faible. Les mesures de durée d'impulsion sont obtenues à l'aide d'un autocorrélateur intensimétrique de SHG non colinéaire non commercial. Celui-ci a été calibré en induisant à l'aide d'une lame de verre d'épaisseur $e = 1$ mm et d'indice $n = 1.52$ un retard de 1.73 ps sur l'un des bras de l'autocorrélateur.

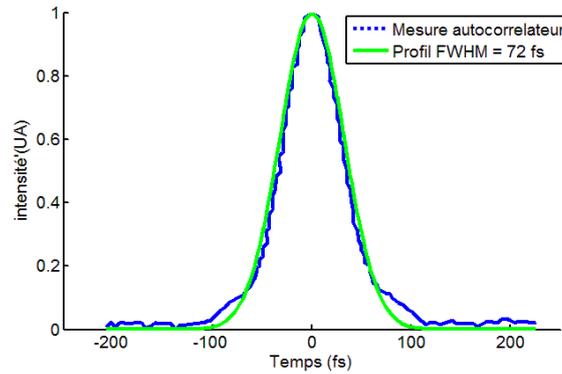


Figure II-20 : Exemple de profil temporel obtenu à 780 nm pour une puissance moyenne de 10 mW injectée dans la fibre endoscopique. On obtient une durée à l'autocorrélateur de 72 fs à mi-hauteur. Dans l'hypothèse d'un profil de la forme sech^2 on obtient une impulsion de durée à mi-hauteur réelle de 47 fs.

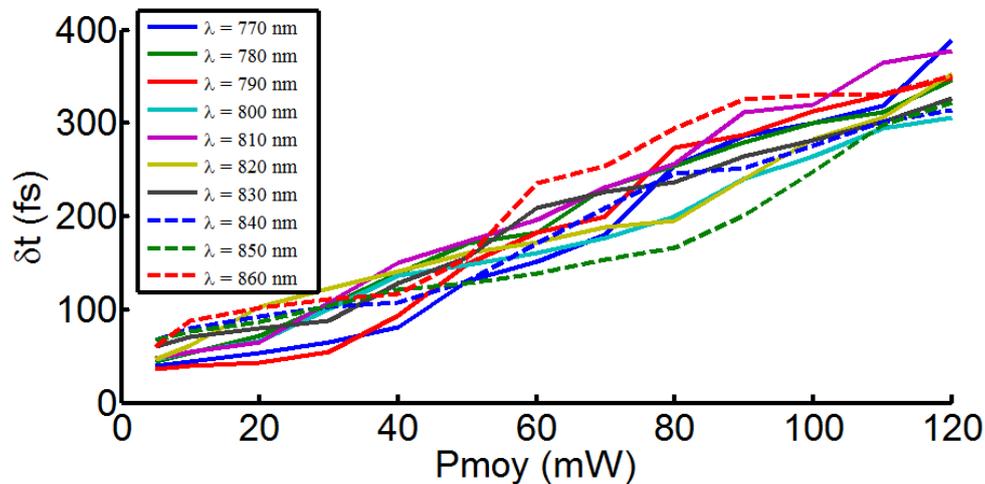


Figure II-21 : Evolution de la durée d'impulsion en sortie de l'endomicroscope en fonction de la longueur d'onde et de la puissance injectée dans la fibre endoscopique.

Ces mesures confirment la bonne compensation de la dispersion sur une large plage spectrale (de 770 à 850 nm). On obtient des valeurs aussi courtes que 45 fs pour des puissances en entrée de fibre faibles, ce qui confirme la compensation des effets d'ordre 2 et d'ordre 3.

Comme prévu, la durée augmente avec la puissance car celle-ci entraîne une importante compression spectrale :

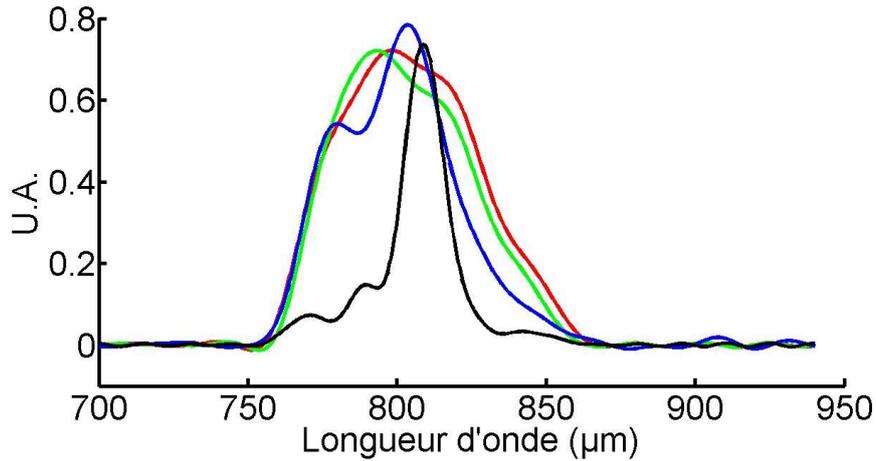


Figure II-22 : Evolution du spectre de l'impulsion à 810 nm, mesuré avec un spectromètre avaspec-2048 (Avantes). En rouge et vert respectivement : spectre après la 1^{er} fibre puis l'étireur à GRIMs. En bleu : après la fibre endoscopique 5 mW injecté, en noir 60mW

Les valeurs de durée sont plus grandes que ce que prévoit notre modèle de simulation, à cause d'effets non linéaires supérieurs à ce qui a été obtenu en simulation :

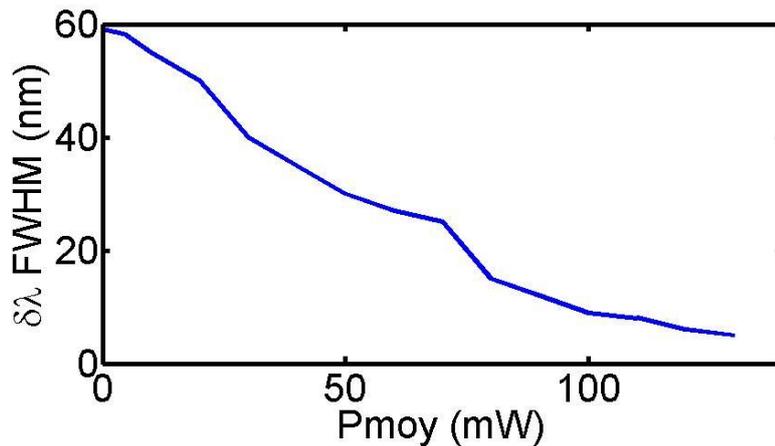


Figure II-23 : Evolution de la taille du spectre mesurée en sortie de l'endomicroscope en fonction de la puissance injectée dans la fibre endoscopique à 800 nm.

En conséquence les impulsions en présence d'effets non linéaires sont plus longues que celles simulées. Malgré ce phénomène, l'excitation non linéaire représentée en Figure II-24 reste efficace :

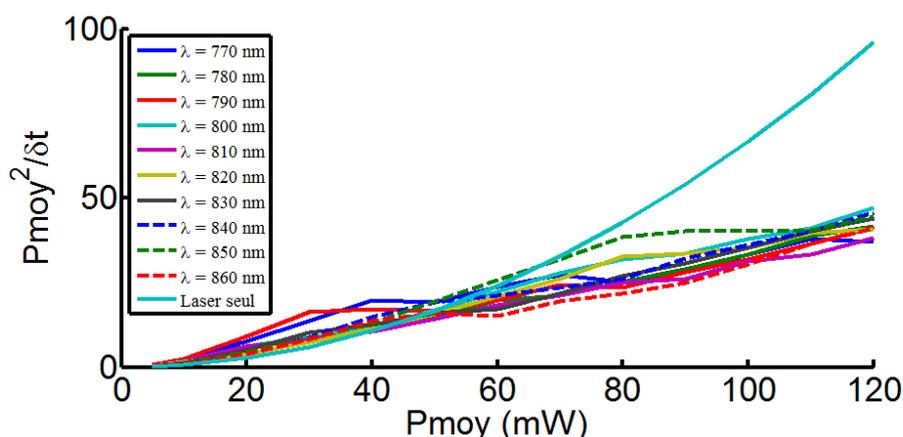


Figure II-24 : Evolution de la puissance au carré sur la durée d'impulsion, qui nous sert d'image du signal non linéaire d'ordre 2 potentiel en sortie de l'endomicroscope en fonction de la longueur d'onde et de la puissance injectée dans la fibre endoscopique. La durée d'impulsion fixée pour le laser est de 120fs.

On voit sur la Figure II-24 la capacité du système à produire un signal non linéaire, homogène à la puissance moyenne au carré divisée par la durée d'impulsion. On constate une augmentation linéaire de ce facteur pour l'architecture d'endomicroscope. En effet, la puissance se propageant dans la fibre va induire une compression spectrale de plus en plus importante ce qui va progressivement augmenter la durée des impulsions comprimées. Néanmoins ce facteur évolue de manière linéaire et permet d'affirmer que plus il y a de puissance sur l'échantillon plus le signal non linéaire produit sera fort et ce même compte tenu de l'allongement des impulsions. On peut distinguer 3 zones :

- Pour une puissance moyenne incidente inférieure à 40 mW ce facteur de qualité est supérieur pour toutes les longueurs d'ondes à celui donné en théorie par le laser seul. Ce régime correspond à une faible compression spectrale en bout de fibre endoscopique, qui permet d'obtenir des durées d'impulsion plus courtes que celle du laser.
- Pour une puissance moyenne de 40 à 60 mW, les performances du système sont comparables au laser seul.
- Enfin au-delà de 60 mW cette architecture ne permet plus d'avoir des performances comparables au microscope de table classique.

Ces résultats confirment que nous avons atteint les objectifs fixés pour le nouvel étireur :

- Une agilité accrue pour exciter les fluorescences intrinsèques du NADH et du FAD respectivement à 760 nm et 860 nm
- Une meilleure transmission afin de pouvoir disposer d'une réserve en puissance, afin de sonder les fluorescences faibles en profondeur dans la matière biologique.

5. Limitations du système de compensation des effets linéaire et non linéaires

a. Dispersion d'ordre 4

Pour de faibles puissances, les durées d'impulsion sont légèrement plus longues qu'avec l'étireur à GRISMs en réflexion. Cela s'explique par le fait que la dispersion d'ordre 4 (en anglais : fourth order of dispersion, FOD) est plus forte avec ces nouveaux réseaux très dispersifs de 1250 traits/mm contre 600 trait/mm pour les réseaux blazé à 800 nm de l'étireur en réflexion.

En effet, en absence de compression spectrale dans la fibre endoscopique, il nous faut compenser un spectre très large ($\Delta\lambda = 60$ nm). Comme nous pouvons compenser les ordres 2 et 3 de dispersion nous pouvons atteindre des durées extrêmement courtes (inférieures à 50fs). A partir de ce moment l'ordre 4 n'est plus négligeable.

- Pour une fibre de 5 mètres, la simulation nous donne $FOD = 4.5 * 10^5 fs^4$:
- L'étireur en réflexion avait une $FODr = -4.42 * 10^5 fs^4$ (Kalashyan et al. 2012)
- L'étireur en transmission, en revanche a une $FODt = -2.6234 * 10^6 fs^4$

Afin de confirmer cet effet, j'ai utilisé un modèle de simulation qui permet d'imposer des valeurs choisies de SOD, TOD et FOD au lieu de simuler le comportement de l'étireur. J'ai donc imposé un système parfait où le SOD et le TOD des fibres sont parfaitement compensées, sans effet non linéaire (la puissance moyenne en entrée est $P_{moy} = 0.1$ mW). On obtient pour 5 m de guide, en imposant respectivement FODr et FODt 34 fs et 44 fs :

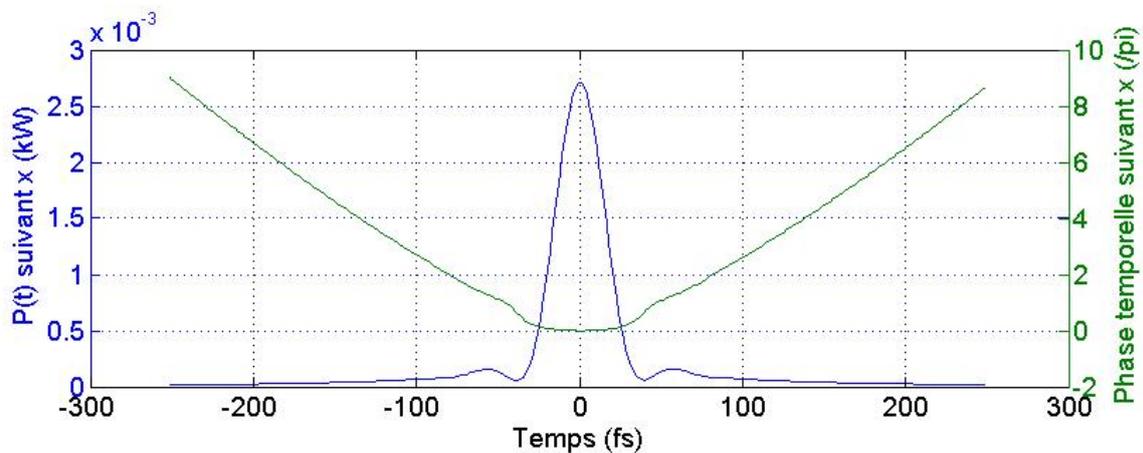


Figure II-25 : Profil de l'impulsion en sortie d'endoscope pour une FOD correspondant à l'étireur en réflexion. Profil temporel en bleu et phase temporelle en vert. Caractéristiques : $\delta t = 34.26$ fs ; $\Delta\lambda = 60.19$ nm ; $\hat{P} = 2.712$ W ; $\delta t / \delta t_{\text{Fourier}} = 212\%$

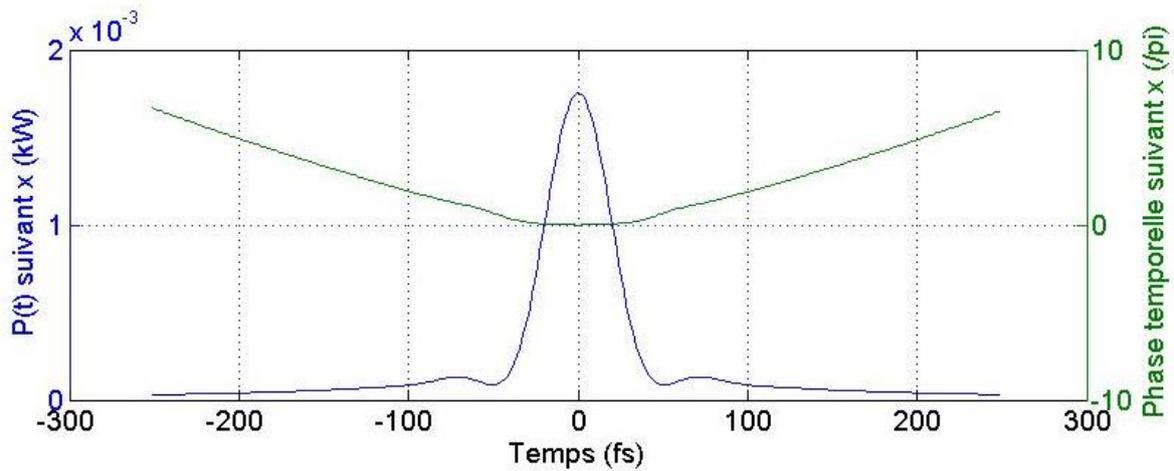


Figure II-26 : Profil de l'impulsion en sortie d'endoscope pour une FOD correspondant à l'étireur en transmission. Profil temporel en bleu et phase temporelle en vert. Caractéristiques : $\delta t = 44.44$ fs ; $\Delta\lambda = 60.19$ nm ; $\hat{P} = 1.754$ W ; $\delta t / \delta t_{\text{Fourier}} = 277\%$

On constate que l'ordre 4 entraîne une diminution de la puissance crête de l'impulsion. Cet effet est visible par la présence d'un pied sur les impulsions. Dans le cas de l'étireur en réflexion (Figure II-25), cet effet est plus faible qu'avec l'étireur en transmission (Figure II-26). On note par ailleurs que la durée d'impulsion pour l'étireur en transmission est légèrement supérieure (44fs contre 34fs). Comme il était attendu, cet effet de la FOD est donc plus fort pour l'étireur en transmission. Cet effet augmente la durée minimale accessible des impulsions pour des puissances faibles (<10mW) en l'absence de compression spectrale et donc réduit notre capacité à générer un signal non linéaire dans ce régime.

b. Modulation de phase croisée.

Dans le chapitre suivant je détaille les choix qui ont été faits dans l'architecture de l'endoscope pour l'excitation du NADH et du FAD. Un de ces choix impose l'utilisation de deux lasers femtosecondes, centrés à 760 nm et 860 nm.

Ce choix implique un risque d'interaction non linéaire entre deux impulsions dans la fibre endoscopique. Cette interaction, qui porte le nom de modulation de phase croisée, peut générer des effets parasites à même d'induire une erreur sur la mesure ou d'empêcher l'excitation des effets non linéaires souhaités. Une vérification de non interaction entre les ondes a donc été nécessaire. En premier lieu, les lasers ne sont pas synchronisés et présentent une fréquence de répétition légèrement différente, de 76 MHz et 80 MHz. Cette différence implique que tout au plus, une impulsion sur vingt va pouvoir interagir avec l'autre. D'autre part nous n'avons pas observé d'effet spectral en présence des deux ondes. Enfin les excitations seront utilisées de manière séquentielle et sélectionnées alternativement par des obturateurs.

En conclusion de ce chapitre, nous avons vu quels étaient les problèmes induits par la propagation d'impulsion dans les fibres optiques et comment nous y avons répondu. Dans un second temps, nous avons identifié les facteurs limitant du module de compensation des effets linéaires et non linéaires utilisé précédemment.

Afin de répondre à ces limitations, nous avons présenté un nouvel étireur à GRISMs en transmission. Par la suite nous présentons les choix qui nous ont conduits à sélectionner les composants de cet étireur. Enfin nous présentons les résultats de simulations et la campagne de mesures associée au GRISM et confirmons les deux points majeurs de ce développement :

- Cet étireur est accordable en longueur d'onde. Il permet la compensation de la dispersion de 760 à 860 nm. Il nous permet donc d'exciter le NADH et le FAD.
- Cet étireur a une transmission élevée, près de trois fois supérieure à son prédécesseur. Nous disposons donc de la réserve en puissance que nous avons identifiée comme capitale pour le 2P-ORR

Chapitre III. Adaptation de l'endomicroscope multiphotonique aux contraintes de la mesure du rapport d'oxydoréduction optique et du vivant

I. Endomicroscope non linéaire : état de l'art

Comme nous l'avons vu, les endomicroscopes multiphotoniques présentent de nombreux intérêts pour la pratique clinique, tels que la possibilité de détecter des fluorescences intrinsèques avec un meilleur rapport signal/bruit, permettant de s'affranchir des agents de contraste, souvent cancérigènes. Leur confocalité naturelle alliée à leur grande profondeur de pénétration, permettent d'accéder à une imagerie tridimensionnelle. Cela se révèle essentiel pour analyser un épithélium où l'on sait que des cellules cancéreuses peuvent migrer en profondeur. La réduction du photoendommagement est aussi une grande force de ce type de microscopie dans ce domaine. L'imagerie multiphotonique permet également l'émergence de nouveaux contrastes, comme dans le cas de la SHG qui permet de voir le collagène de type I, enrichissant ainsi l'imagerie structurelle tissulaire. Enfin au travers de la résolution subcellulaire offerte par ce type d'appareil, la matière peut être sondée cellule après cellule avec vitesse et précision. C'est pour toutes ces raisons que la communauté scientifique a consenti à d'importants efforts pour le développement d'endoscopes multiphotoniques. Dans ce chapitre je présente brièvement les différentes approches et résultats obtenus à ce jour.

1. Architecture des endomicroscopes non-linéaires

Une image en endomicroscopie non linéaire est usuellement obtenue en balayant l'échantillon avec un ou plusieurs lasers focalisés. La structure d'un tel endomicroscope comprend généralement les éléments suivants :

- Une source laser impulsionnelle à même d'induire une réponse non linéaire : l'excitation est, dans la plupart des cas, réalisée par un oscillateur femtoseconde, généralement au titane:saphir, qui a comme avantage majeur son accordabilité en longueur d'onde.
- L'élément central est la fibre optique qui assure l'acheminement de l'excitation et la collection du signal généré par l'échantillon. En amont ou en aval de cette fibre, on trouve un système de balayage.
- Du fait de l'influence de la fibre sur les impulsions excitatrices (dispersion chromatique, non linéarité optique), un système de compensation de ces effets peut être présent.
- Enfin, un système de détection, constitué généralement d'un ou plusieurs détecteurs mono-pixel (tubes photomultiplicateurs (PMTs), photodiodes à avalanche), adaptés à l'imagerie par balayage.

2. Système fibré à balayage proximal

Les systèmes à balayage proximal imposent que le balayage puisse être fait en amont de la fibre et par conséquent l'utilisation de guide d'image. Il existe différentes configurations, correspondant au guide utilisé : soit une fibre multicoeur, soit une fibre multimode. Ces systèmes présentent comme avantage majeur leur miniaturisation (<1mm) et une flexibilité optimale à leur

extrémité distale liée au fait que l'endomicroscope est réduit à une simple fibre, auquel on ajoute éventuellement une lentille.

Les faisceaux de fibres sont des guides d'images souvent associés à l'imagerie optique. En effet, ceux-ci reposent sur une stratégie efficace, où à chaque fibre du faisceau on associe un pixel de l'image finale. Ainsi, en balayant l'injection du laser dans les différents cœurs, au moyen par exemple de miroirs galvanométriques, on obtient une réponse de l'échantillon, chaque cœur agissant donc comme un filtre spatial qui permet d'exciter un point bien défini de l'échantillon.

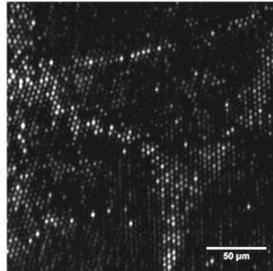


Figure III-1 : Images d'alvéoles pulmonaires humaines saines fixées au PFA, réalisées au travers d'un faisceau de fibres sans optique distale (tissu en contact avec la fibre) en fluorescence à deux photons. (Issues de (Ducourthial 2014))

Ce type d'architecture présente donc des avantages indéniables, comme, par exemple, en neuroscience où l'utilisation de balayage assuré par des modulateurs acousto-optiques permet d'obtenir des déplacements du point de focalisation arbitraires avec une dynamique temporelle très importante. Il est cependant limité par la résolution qu'impose la fibre, et plus précisément par l'espace entre les cœurs de la fibre. En effet l'espace entre ces cœurs va imposer l'échantillonnage spatial du système (Figure III-1).



Figure III-2 : Inhomogénéité entre les cœurs dans un guide d'image.

Pour assurer une bonne résolution, il est donc nécessaire de réduire la distance entre les cœurs. Cette proximité spatiale entre les cœurs va limiter le confinement optique et il se produit alors un couplage entre les cœurs, introduisant des artefacts sur l'image. Afin d'éviter ce couplage, il devient alors nécessaire d'induire des inhomogénéités dans le faisceau de fibres (Figure III-2). Cette particularité induit pour chaque cœur des dispersions et biréfringences différentes. Dans le cadre d'une imagerie non linéaire, afin d'assurer le déport d'impulsions femtosecondes, il faudrait donc corriger la dispersion différemment pour chaque cœur de l'image. Cette nécessité rend ce type de système très problématique pour l'imagerie non linéaire (Lelek 2006).

Dans le cadre de l'imagerie du métabolisme, la résolution imposée par le faisceau est insuffisante pour résoudre les mitochondries. Ce constat, associé au problème de collection abordé au chapitre I pour les courtes longueurs d'ondes est rédhibitoire pour la collection de signal de NADH et nous contraint à ne pas travailler avec ce guide d'images.

L'utilisation de ce type de fibre présente donc de fortes contraintes pour l'endomicroscopie multiphotonique. Cependant, il est possible de tirer parti des spécificités de ce faisceau de fibres afin de proposer des solutions innovantes permettant son utilisation. Parmi celles-ci, il a été proposé d'utiliser le couplage cohérent entre les cœurs et d'imposer en amont de la fibre une mise en forme spatiale permettant à la lumière en bout de faisceau de se coupler sur un seul cœur. Ce dispositif, associé à une relation de phase, toujours en amont de la fibre, permet de balayer le bundle, et donc l'échantillon (Szameit et al. 2008). Une autre approche, pour un faisceau de fibres qui ne présente pas de couplage entre les cœurs, propose de réaliser à l'aide du façonnage du front d'onde une imagerie par fibre sans lentille (Andresen & Monneret 2013).

De la même façon que pour les faisceaux de fibres, on peut réaliser la mise en forme du front d'onde incident sur une fibre multimode afin de recréer en bout de fibre un mode contrôlable spatialement. On assimile ici la fibre à un milieu diffusant et dont le contrôle va permettre d'assurer en bout de fibre les conditions nécessaires à l'imagerie. Cette solution élégante présente néanmoins des limites commune à l'approche par bundle pour l'imagerie non linéaire (Rosen et al. 2015). L'utilisation de modulateurs de phase spatiale (ou Spatial Light Modulator, « SLM »), nécessaire au façonnage réduit considérablement la vitesse d'utilisation possible : 30 min pour une optimisation dans Rosen et al. 2015. Ces systèmes sont eux aussi limités à des démonstrations de principe utilisant des fibres rigides de quelques dizaines de centimètres (15cm pour (Rosen et al. 2015)). On peut ajouter que :

- L'énergie n'est pas la même en tout point du champ de vision
- Le nombre de pixels d'une image est limité par le nombre de modes contrôlables, de quelques centaines tout au plus. De plus ce contrôle est directement relié au nombre de pixels disponibles du SLM ce qui induit une limite technologique.
- Enfin, surtout, il nécessite pour fonctionner une calibration qui n'est valable que pour une position et courbure données de la fibre, rendant donc leur utilisation en pratique (i.e. en endoscopie) impossible pour le moment.

Enfin une nouvelle technique pourrait aussi être employée pour l'endomicroscopie utilisant des fibres multimodes: le nettoyage modal. Il permet un auto-arrangement lors de la propagation de la lumière dans la fibre multimode en faisceau en forme de cloche par effets non linéaires (Krupa et al. 2017). Cette technique nécessite cependant un système de balayage distal.

Ces techniques, qui présentent beaucoup de potentiel, sont pour le moment limitées à des démonstrations de principes. Ces raisons ont mené à l'utilisation d'une autre architecture, associant une fibre monomode à des techniques de balayage distal.

3. Système fibré à balayage distal

Afin d'acheminer efficacement les impulsions excitatrices, on peut recourir à une fibre monocœur monomode associée à un système de balayage distal. Ce balayage peut être assuré par des MEMs (ou Micro Electromechanical Mirrors), (Fu et al. 2006; Fu & Gu 2007; Flusberg et al. 2005). Ceux-ci permettent une dynamique temporelle d'imagerie et un champ d'observation importants. Ils présentent en contrepartie une fragilité, un coût et un encombrement conséquents.

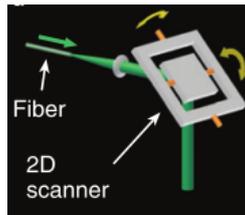


Figure III-3 : Scanner à MEMS en sortie de fibre optique. Ce système possède deux axes de rotation qui vont permettre au faisceau d'être balayé sur l'échantillon. (Flusberg et al. 2005)

La technique dite du « fiber-scanning » permet de s'affranchir de ces limitations. (Seibel et al. 2003 ; Huo et al. 2010; Zhang et al. 2012; Xi et al. 2012) . Cette solution consiste à fixer autour de la partie distale de la fibre une céramique piézoélectrique cylindrique quelques millimètres en amont de la face de sortie de la fibre. Le déplacement de la céramique est alors transmis à la fibre, ce qui assure le balayage du faisceau sur l'échantillon.

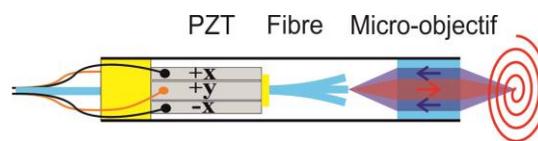


Figure III-4 : Schéma d'une sonde de fiber scanning.

Afin d'assurer une amplitude de mouvement importante, la fibre est excitée à sa fréquence de résonance mécanique. On applique alors des lois de tension sur des électrodes placées sur la céramique afin d'obtenir un balayage résonant contrôlé.

Dans le cas d'un balayage distal la fibre utilisée est souvent à double gaine. Le cœur central, monomode, assure le déport de l'impulsion IR femtoseconde. Comme nous l'avons vu, celui-ci peut être à cœur plein ou creux. Le cœur externe quant à lui va capter les photons signaux et les réacheminer vers les détecteurs en amont de la fibre. C'est cette architecture que nous employons et qui sera présentée en détail dans la suite de ce chapitre.

4. Exemples de résultats en endoscopie multiphotonique

Au cours des dernières années, de nombreuses équipes de recherche ont proposé des endomicroscopes multiphotoniques. Parmi les résultats les plus aboutis, on peut citer le groupe du Professeur Min Gu de l'université de Swinburne (Bao et al. 2008; Bao et al. 2010; Gu et al. 2014) ; du groupe du Professeur Chris Xu de l'université de Cornell aux Etats-Unis (Brown et al. 2012; Ouzounov et al. 2013) ainsi que du groupe du Professeur Xingde Li (Liu et al. 2004; Zhang et al. 2012). Mon travail prend la suite de la thèse de Guillaume Ducourthial (Ducourthial et al. 2015) qui a abouti sur l'élaboration d'un premier prototype qui présente des performances de premier plan. On peut également citer le travail de thèse d'Alberto Lombardini de l'institut Fresnel sous la direction d'Hervé Rigneault (Lombardini 2016) sur l'imagerie CARS.

Les caractéristiques et performances des différents EMMP fonctionnels à ce jour sont énumérées ci-dessous :

	Min Gu (Swinburne)	Chris Xu (Cornell)	Ducourthial (Xlim)	Lombardini (Fresnel)
Fibre	2.9 m de fibre DC dopée (Fiber-core) Cœur central : 3.6µm Gaine collectrice: 7.5 µm	1 m de fibre à cœur creux (HC-PBGF, HC800-2, NKT Photonics) Cœur: 7.5 µm	5 m de fibre DC PCF T1628C (PhLAM) Cœur central : 3.55 µm	1 m de fibre Kagomé Hollow-core DCF (PhLAM) Cœur central : 20 µm mais avec une bille de polystyrène fusionnée en fin de fibre
Précompensation	Etireur à réseaux	Bloc de verre SF11	Etireur à GRISM en réflexion	-
Scanner	Actuateur électromagnétique (Optiscan)	Actuateur Piézoélectrique double	Actuateur Piézoélectrique cylindrique	Actuateur Piézoélectrique cylindrique
Collection	Gaine de fibre DCF	Couronne de fibres plastiques	Gaine de fibre DCF	Gaine de fibre DCF
Diamètre de la sonde/poids de la sonde	3mm/60g	5mm/ -	2.2mm/1.2g	3.2mm/ -
Détection	Analogique 1 canal	Analogique 1 canal	Analogique 2 Canaux	Analogique 2 Canaux
Particularité	-	Imagerie de réflectance grand champ		Microscopie CARS
In Vivo				
Cible	Rein de rat	Rein de rat	Rein de souris	-
SHG in vivo	Non	Non	Oui	-
Marquage	Oui	Non	Non	-
Cadence d'imagerie	1.7 im/s	4.1 im/s	8 im/s	-
Champ	475*475 µm	160*160 µm	450*450 µm	(320 µm)
Résolution transversale	1 µm	0.8 µm	0.8 µm	(0.8 µm)
Puissance	30 mW	70 mW	30 mW	-
Durée d'impulsion	1.5 ps	110 fs	40 fs	(100 fs)
Profondeur d'imagerie atteinte	60 µm	140 µm	300 µm	-

Ce tableau comparatif permet de rendre compte des performances de l'EMMP proposé par G. Ducourthial dont l'architecture a été reprise et adaptée à l'imagerie du métabolisme cellulaire. Dans la suite de ce chapitre je présente en détail l'architecture qui a été utilisée, quels sont les choix

technologiques qui ont permis d'obtenir ces résultats et enfin quelles évolutions j'ai apportées afin de pouvoir imager le rapport d'oxydo-réduction optique.

II. Présentation du système endoscopique utilisé

1. Excitation à deux couleurs pour l'imagerie du métabolisme cellulaire

Un des principaux changements apportés lors de ma thèse est l'excitation à deux longueurs d'onde assurée par deux lasers. Ceux-ci sont nécessaires pour exciter de manière concomitante le NADH et le FAD, qui, comme nous l'avons vu précédemment, sont excités respectivement à 760 nm et 860 nm.

Ces deux lasers sont des oscillateurs au titane-saphir. Ils permettent tous deux d'avoir des impulsions femtosecondes à un taux de répétition proche de 80 MHz. Le laser utilisé à 760 nm pour l'excitation du NADH est un laser titane:saphir (modèle « Micra », société Coherent). Il est utilisé dans des conditions plutôt défavorables, car initialement prévu pour fournir des impulsions extrêmement courtes autour de 800 nm. Son utilisation en bord de bande à 760 nm augmente la durée des impulsions et réduit la puissance moyenne en sortie de laser. Lors de mes expérimentations le laser présentait les caractéristiques suivantes :

- $\Delta\lambda = 25$ nm centré autour de 760 nm, avec $\Delta\lambda$ la largeur du spectre à mi-hauteur en intensité
- $\Delta t = 100$ fs, avec Δt la largeur temporelle de l'impulsion à mi-hauteur en intensité
- Une puissance moyenne $P_{\text{moy}} = 450$ mW.
- $f_{\text{rep}} = 80$ MHz, la fréquence de répétition du laser.

Le laser utilisé à 860 nm, pour l'excitation du NADH est également un laser titane:saphir (modèle « MIRA », société Coherent). Lors de mes expérimentations, le laser présentait les caractéristiques suivantes :

- $\Delta\lambda = 15$ nm à 860 nm
- $\Delta t = 150$ fs, Une puissance moyenne accordable jusqu'à 1W
- Une fréquence de répétition du laser $f_{\text{rep}} = 76$ MHz.

Pour chacun des lasers on associe le système de pré-compensation qui a été présenté au chapitre 2. On retrouve donc une première fibre (Thorlabs, PM780-HP, de longueur $L = 0,5$ m), qui assure l'élargissement du spectre de l'impulsion et un étireur à Grisms, qui permet de compenser les effets de dispersion des deux fibres. Un obturateur a été ajouté au niveau de la sortie de la première fibre sur chacune des voies d'excitation afin de pouvoir sélectionner l'une ou l'autre.

Par la suite, les deux voies sont combinées avant leur injection dans la fibre au moyen d'un filtre dichroïque (FF705-DiO1 Semrock). Afin de faciliter l'injection dans le cœur de la fibre endoscopique, un grand soin a été apporté à l'élaboration des deux périscoptes qui servent à réaliser celle-ci. Ces périscoptes sont réalisés à l'aide de platines haut de gamme Polaris (Thorlabs), afin d'obtenir une injection facilitée du second laser, lorsque la fibre est immobilisée après l'injection du premier faisceau.

2. Fibre endoscopique à double gaine optimisée pour l'endomicroscopie multiphotonique

La fibre endoscopique utilisée lors des travaux de cette thèse est la fibre T1979A. Elle est extrêmement semblable à la fibre T1628C utilisée lors de travaux précédents (Ducourthial et al. 2015), puisque issue de la même conception.

Il s'agit d'une fibre à double gaine microstructurée air-silice. Elle présente l'avantage de ne pas être dopée, ce qui évite tout signal collecté parasite issu d'auto-fluorescence de la fibre. Elle possède un cœur central solide monomode jusqu'à 740 nm pour le transport des impulsions femtosecondes excitatrices, et une deuxième gaine multimode pour la collection des luminescences émises par la matière biologique.

Le cœur central (ON = 0.13 à 810 nm) présente une atténuation de quelques dizaines de dB par kilomètre et un coefficient de dispersion de 64 fs/(nm.km). Ce cœur est à maintien de polarisation, ce qui joue un rôle positif lorsque la modalité d'imagerie utilisée est sensible à la polarisation, comme l'est l'imagerie de génération de seconde harmonique optique du collagène. Le guidage est assuré par la diminution de l'indice effectif induit dans la structure par des trous d'air et qui permettent la réflexion totale de la lumière. Le diamètre de mode est égal à 3,5 μm , ce qui assure une bonne résolution d'imagerie pour l'endomicroscope, même couplé à des optiques de tailles réduites. En contrepartie, la non-linéarité optique de type Kerr du cœur est importante. Il est possible d'injecter jusqu'à 60% de lumière incidente spécifiquement dans le cœur central de la fibre

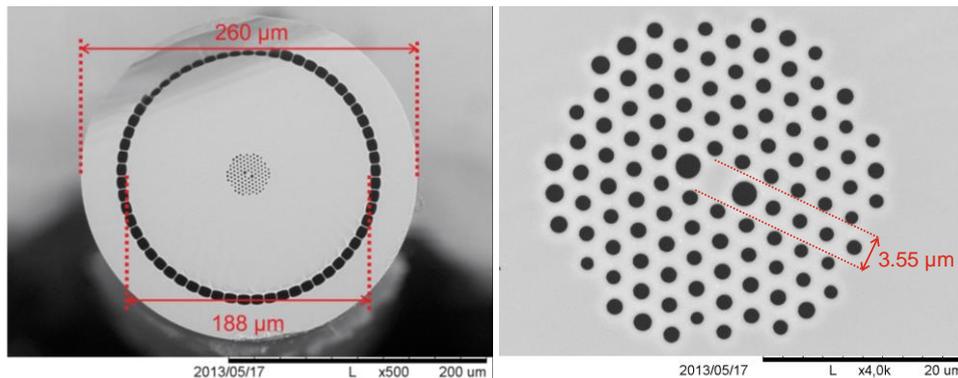


Figure III-5 : Fibre endoscopique T1628C.

La gaine collectrice qui entoure le cœur central est caractérisée par une ouverture numérique importante (ON=0,2 @ 400 nm) et une grande surface ($\phi=195\mu\text{m}$), ce qui permet de collecter les signaux multi-photoniques efficacement. Cette fibre a été conçue dans le cadre de la thèse de Guillaume Ducourthial, en partenariat avec Alexandre Kudlinski (PhLAM UMR CNRS 8523). La réalisation de ces fibres est aussi assurée par le PhLAM.

3. Microscope fibré non linéaire

Les impulsions excitatrices sont transmises à la partie distale de l'endomicroscope par le cœur central de la fibre qui est monomode. Afin de réaliser une image, il est donc nécessaire de réaliser un balayage. Dans un premier temps, et de manière analogue à (Ducourthial 2014), on peut utiliser une tête de microscope composée d'une lentille de collimation (AL 2520A, Thorlabs), de miroirs galvanométriques (GVS 002, Thorlabs) et d'un objectif (W plan Apo-chromat 63x/1.0 Zeiss).

aussi pour l'industrie cosmétique. Enfin l'utilisation du rapport d'oxydo-réduction optique permettrait de distinguer entre les nævus et de détecter les mélanocytes.

- L'archéologie, en particulier l'étude de parchemin (Latour et al. 2016), dans ce cas précis les platines de microscope « classique » ne se prête pas à l'étude d'un échantillon de parchemin et pourrait endommager celui-ci.

Cet instrument qui nous sert de modèle de validation avant les expériences en endoscopie a été validé par plusieurs expériences, qui sont détaillées en annexes :

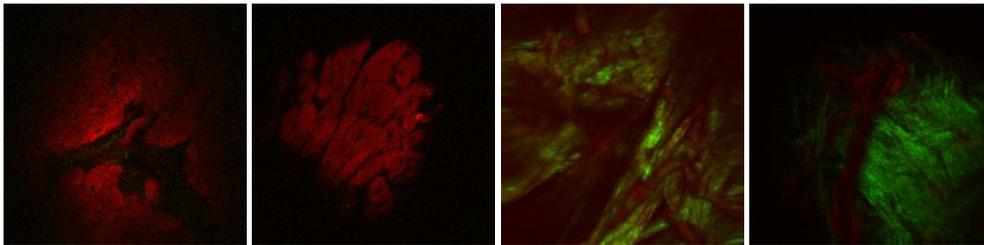


Figure III-8 : Divers échantillons observés au microscope fibré. En rouge : 2PEF ; en vert : SHG. De gauche à droites, deux échantillons de cœur, un échantillon de parchemin et un échantillon de nerf.

Cet instrument correspond donc à une étape intermédiaire entre un microscope multiphotonique classique et l'endomicroscope dont la sonde est décrite dans la suite de ce paragraphe.

4. Sonde d'imagerie non linéaire

Parmi les solutions existantes permettant de balayer l'échantillon en endomicroscopie nous avons retenu celle du balayage par la fibre, c'est-à-dire un balayage de la fibre elle-même, qui a été décrit très brièvement plus haut (Lien [video](#) vers un exemple de balayage où l'on image sur un écran la face de sortie de la fibre en mouvement. Sur le trajet optique une cuvette de coumarine permet de rendre compte du balayage).



Figure III-9 : Photographie de la sonde de l'EMMP (Ducourthial 2014)

Ces sondes nécessitent lors de leur assemblage un soin particulier, car leur réalisation représente un véritable défi technologique. Ces sondes sont assemblées à XLIM par Marc Fabert.

a. Résonateur à fibre optique

Le résonateur est donc constitué de la fibre qui passe dans un tube piézoélectrique tubulaire (PZT) creux et est reliée à celui-ci par une rondelle placée sur la partie distale du PZT. En bout d'endoscope, on trouve un objectif miniature, composé de plusieurs lentilles associées, ou une lentille GRIN (Figure III-10). A l'excitation électrique du PZT va donc correspondre un déplacement de la fibre monomode excitatrice. Celui-ci va permettre le déplacement du foyer sur le plan de

l'échantillon. Le signal non linéaire généré au foyer sur l'échantillon est rétro collecté par la même fibre au travers de sa gaine collectrice et détecté en amont de la fibre.

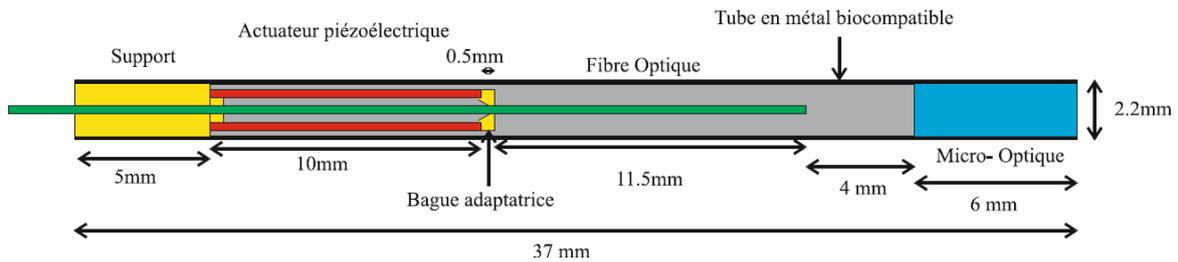


Figure III-10 : Schéma de la sonde finale encapsulée. (Ducourthial 2014)

La taille du champ balayé dépend de l'amplitude de débattement de la fibre et du système optique qui sont reliés par le facteur de grandissement. De la même façon, la résolution va dépendre de la taille du mode du faisceau exciteur en sortie du cœur central.

i. Mécanisme de balayage

La fibre reliée au PZT est semblable à un porte-à-faux et son comportement est comparable à celui d'un oscillateur. Pour des tensions basses (<30V) appliquées au PZT, le déplacement du PZT est de l'ordre du micromètre. Ce déplacement ne permet pas d'obtenir un champ de vue suffisant en bout de sonde. Pour permettre une amplitude de mouvement de la partie distale de la fibre de plusieurs centaines de micromètres, il est alors nécessaire d'exciter la fibre à sa fréquence de résonance propre (autour de 1.5 KHz). Cette excitation résonante doit être appliquée sur deux axes pour pouvoir obtenir un balayage, et donc une image en deux dimensions.

La céramique piézoélectrique que nous utilisons est un modèle commercial de Physik Instrument (PI). C'est un cylindre creux de 10 mm de long, 1.5 mm de diamètre externe et 0.9 mm de diamètre interne. La surface externe présente quatre électrodes isolées entre elles, qui permettent le déplacement sur deux axes distincts. Une cinquième électrode sur la surface interne sert de masse (Figure III-11). Ces électrodes fonctionnent par paires afin de maximiser la flexion. Ainsi, si l'on envoie deux tensions opposées sur deux électrodes diamétralement opposées, un côté va se compresser, l'autre se dilater, accroissant ainsi la flexion.

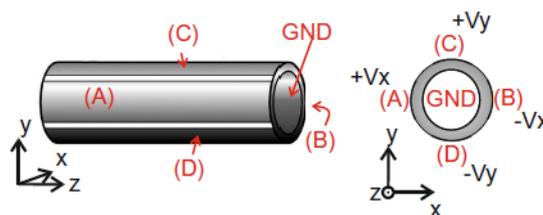


Figure III-11 : Schéma d'une céramique piézoélectrique tubulaire avec ses quatre électrodes (A,B,C,D) et la masse. (Schéma issu de (Ducourthial 2014))

Selon la tension appliquée, nous aurons une déformation plus ou moins importante, ce qui correspond à une commande en position suivant la relation théorique suivante :

$$\Delta y = V \frac{2\sqrt{2}L^2 d_{31}}{\pi Dh}$$

Avec :

- Δy : écart avec la position de repos.
- d_{31} : coefficient du couplage électromécanique, dépendant du matériau constituant la céramique (pour PIC255 : $d_{31} = 180 \text{ pC/N}$).
- L : longueur de la céramique piézoélectrique (10 mm).
- V : tension d'alimentation.
- D : diamètre interne de la céramique piézoélectrique (0.9 mm).
- h : épaisseur de la céramique piézoélectrique (0.3 mm).

La définition des quatre lois de commandes en tension qui permettent de contrôler le balayage est fait sur un programme LabVIEW. Ces tensions sont ensuite générées par un convertisseur numérique analogique (USB 6343 National Instrument), avant d'être amplifiées au travers d'amplificateur E-835.00 (PI).

ii. Contrôle du résonateur

Si la fibre suit parfaitement les commandes appliquées à la céramique en régime non résonant, cela n'est pas vrai à la résonance. En effet, il existe, entre autre, un fort couplage mécanique entre les deux axes lors de celle-ci, et qui entraîne un mouvement de la fibre qui ne correspond pas à la commande. Ce couplage est dû à une légère asymétrie du dispositif (Figure III-12).

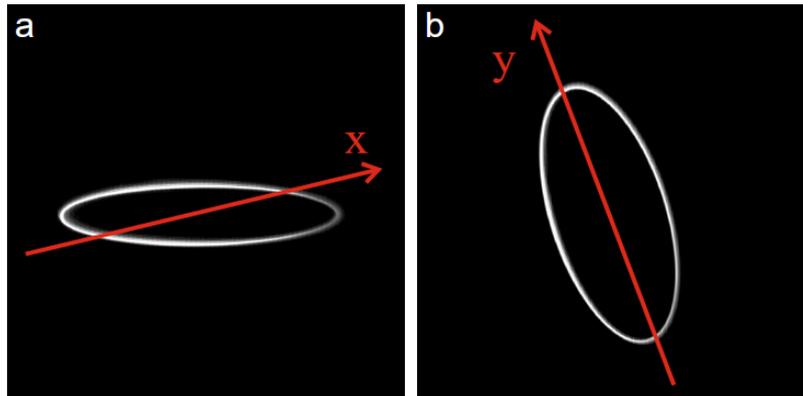


Figure III-12 : Figure de balayage elliptique à la résonance de la fibre. On excite la fibre sur un axe, et on constate à la résonance une figure elliptique : il existe un couplage entre les axes propres de la fibre qu'il faut corriger. (Schéma issu de (Ducourthial 2014)).

Ce résonateur mécanique possède néanmoins deux axes propres mécaniques indépendants que l'on peut utiliser pour supprimer ce couplage. Il faut alors procéder à l'emploi d'électrodes virtuelles X et Y , qui correspondent à une combinaison linéaire des deux électrodes réelles, x et y , et qui sont définies par (Kundrat et al. 2011) :

$$\begin{aligned}\vec{e}_X &= \cos(\theta) \vec{e}_x + \sin(\theta) \vec{e}_y \\ \vec{e}_Y &= -\sin(\theta) \vec{e}_x + \cos(\theta) \vec{e}_y\end{aligned}$$

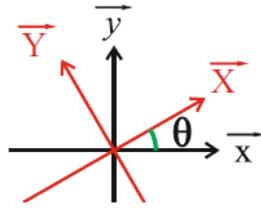


Figure III-13 : Décalages entre les axes réels (en noir) et virtuels (en rouge).

La correction apportée par l'utilisation des électrodes virtuelles permet d'obtenir deux trajectoires parfaitement rectilignes et orthogonales entre elles hors de et à la résonance. Ces axes servent de base orthonormée qui va nous permettre d'envoyer un couple de commandes en tension V_x et V_y et donc de contrôler le balayage (Figure III-14).

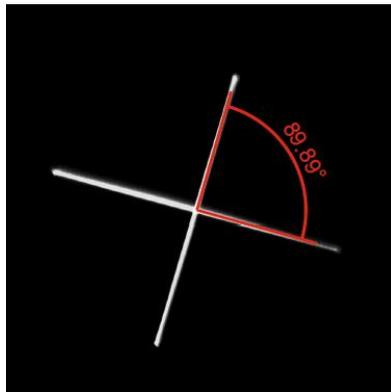


Figure III-14 : Obtention (par surimpression sur l'image) de deux axes droits et orthogonaux à la résonance de la fibre. Ces axes sont la base du formalisme mathématique qui nous sert à contrôler la trajectoire de la sonde. (Schéma issu de (Ducourthial 2014))

Comme pour tout oscillateur, le phénomène de résonance s'accompagne d'un déphasage plus ou moins important entre la commande et la réponse, selon la position par rapport à la résonance (Helmchen et al. 2001). Cependant, du fait de l'anisotropie du système, les deux axes n'ont pas la même fréquence de résonance : ce déphasage est donc différent pour chacun des axes. Il est nécessaire de tenir compte du déphasage différentiel ϕ entre les deux axes pour obtenir un balayage en cercle :

$$V_x(t) = \cos(\omega t); V_y(t) = \sin(\omega t + \phi)$$

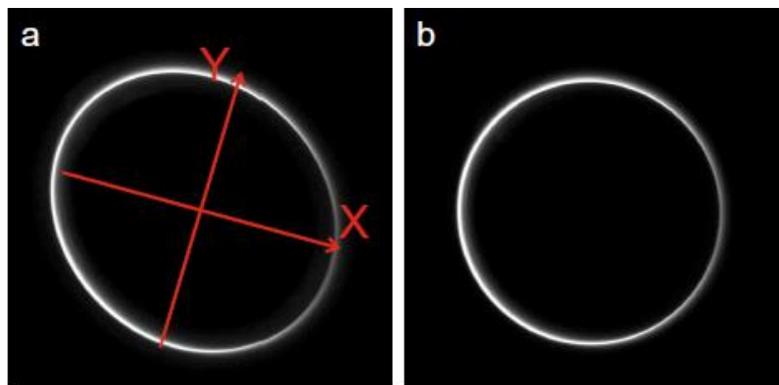


Figure III-15 : Obtention d'un balayage en cercle. a : cette image correspond à une trajectoire contrôlée circulaire. Les deux axes présentent une différence d'amplitude qu'il convient de changer pour obtenir la figure b. (Schéma issu de (Ducourthial 2014))

Une fois la trajectoire circulaire établie, une modulation d'amplitude continue dans le temps de ce cercle permet d'obtenir un balayage 2D en spirale.

b. Développements relatifs à l'acquisition d'une séquence d'image

Une fois la trajectoire établie, il est possible d'acquérir des images. Cependant générer une séquence nécessite de pouvoir répéter cette spirale dans les mêmes conditions initiales que la précédente. Cette nécessité est d'autant plus vraie que la reconstruction des images est assurée par une programmation en boucle ouverte, où chaque information donnée par les détecteurs dans le temps va être adressée aux coordonnées correspondantes calculées *a priori* par une table de correspondance (en anglais : LUT, look-up table). Il est donc nécessaire d'avoir un très grand contrôle de la sonde et une excellente répétabilité du mouvement de la fibre.

Or le scanner qui a été présenté à un très grand facteur de qualité ($Q=180$). Cette propriété permet d'obtenir un débattement important (1 mm) pour des tensions d'alimentation faibles (< 30 V), mais il induit également un temps de retour au repos en régime libre important.

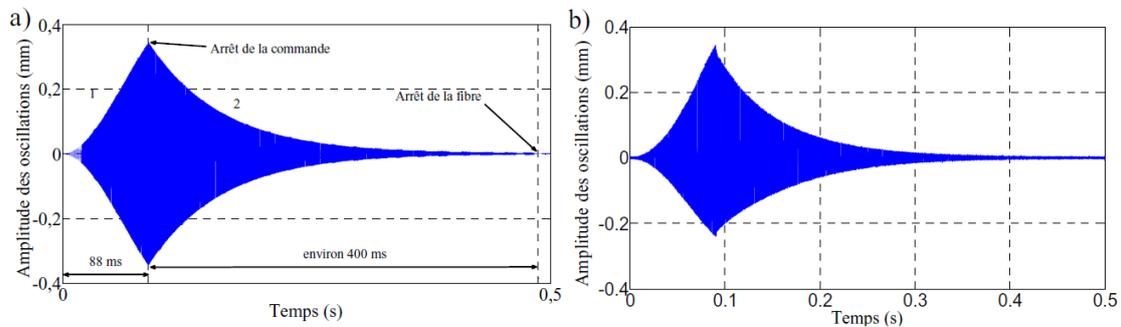


Figure III-16 : Commande et trajectoire mesurée au PSD (Position Sensing Device) dans un cas non amorti (Schéma issu de (Ducourthial 2014)). Dans la première partie, la céramique piézoélectrique joue un rôle moteur. Elle entraîne la fibre afin de réaliser une spirale sortante permettant l'acquisition de l'image. Puis la fibre retourne à sa position de repos en régime.

La conséquence directe est l'impossibilité de travailler avec un nombre d'images par seconde important dans ce régime de fonctionnement, soit pas plus de deux images/s :

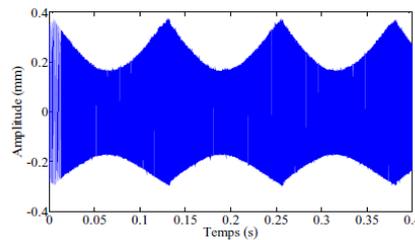


Figure III-17 : En cas de non amortissement pour un nombre d'images par seconde important, la fibre ne revient pas au repos, et empêche de prendre des images fidèles et répétables. (Schéma issu de (Ducourthial 2014))

Il devient donc indispensable, pour obtenir une cadence importante d'accélérer le freinage de la fibre optique activement au moyen des consignes de commandes du PZT.

Dans la première partie, la céramique piézoélectrique joue un rôle moteur. Elle entraîne la fibre afin de réaliser une spirale sortante permettant l'acquisition de l'image. Puis, en déphasant le signal de commande de π , on transforme l'actuation produite par la céramique en frein actif dans le

but de ramener la fibre sur l'axe en quelques oscillations. Lors des quelques millisecondes suivantes, qui précèdent l'acquisition suivante, les tensions appliquées sont nulles et la fibre est en régime libre autour de sa position de repos.

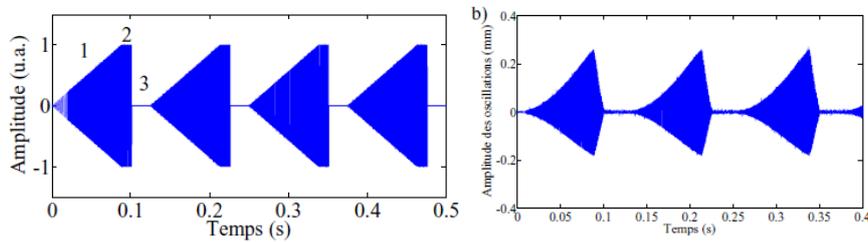


Figure III-18 : Commande (gauche) et trajectoire (droite) mesurées au PSD dans un cas amorti. La trajectoire est maîtrisée et permet d'obtenir des informations fidèles et répétables. (Schéma issu de (Ducourthial 2014))

Ce travail, qui a été réalisé conjointement par Guillaume Ducourthial et moi-même, nous a permis, d'obtenir une cadence à 8 images par seconde pour une image en 250*250 pixels sur un champ de 250 μm de diamètre.

c. Développements informatiques relatifs au contrôle de la sonde et de l'imagerie

Les fonctions qui permettent l'envoi des signaux de commandes et le traitement des données acquises sont réalisées sur labVIEW. Les données sont acquises à l'aide d'une carte PCI-6115 (National Instrument).

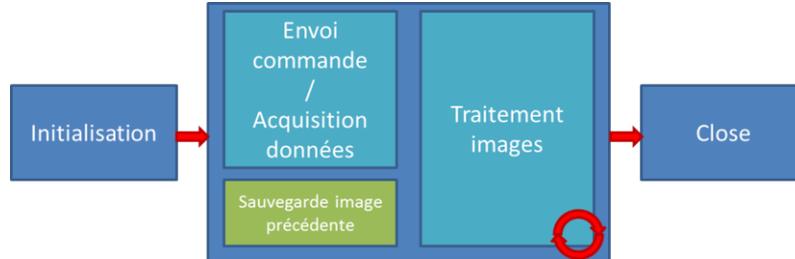


Figure III-19 : Schéma de principe du programme utilisé. Le bloc central représente la boucle principale, qui permet d'acquérir des images de manière répétée

Au cours de ma thèse, et pour les besoins de l'imagerie du métabolisme, ce programme a nécessité des évolutions pour répondre à l'augmentation de la cadence d'acquisition.

Pour cela, il a été nécessaire de procéder à une optimisation du code, notamment par l'allocation de la déclaration de variable en dehors de la boucle principale du programme. Ainsi, toutes les variables et les calculs préalables ont été relocalisés dans la partie d'initialisation du programme. On évite ainsi une étape inutilement redondante et le programme est alors bien plus léger et dynamique. Il en résulte un gain en rapidité et stabilité : il peut donc gérer plus d'informations. Par conséquent, on obtient:

- Un échantillonnage à l'envoi des commandes qui passe de 200KHz à 500KHz pour quatre voies de commandes (limite de la carte : 2MHz/ nb de voies) pour les 4 électrodes du PZT. Il en résulte un contrôle affiné de la sonde puisque il y a plus d'échantillons de commande.

- Passage de l'acquisition de 1 à 10MHz (limite de la carte PCI 6115). Cela permet une réduction du phénomène de moiré, c'est-à-dire dans notre cas de structures issues de pixels présents sur l'image mais non remplis à cause du sous échantillonnage, et évite pour des cadences importantes le sous-échantillonnage numérique.

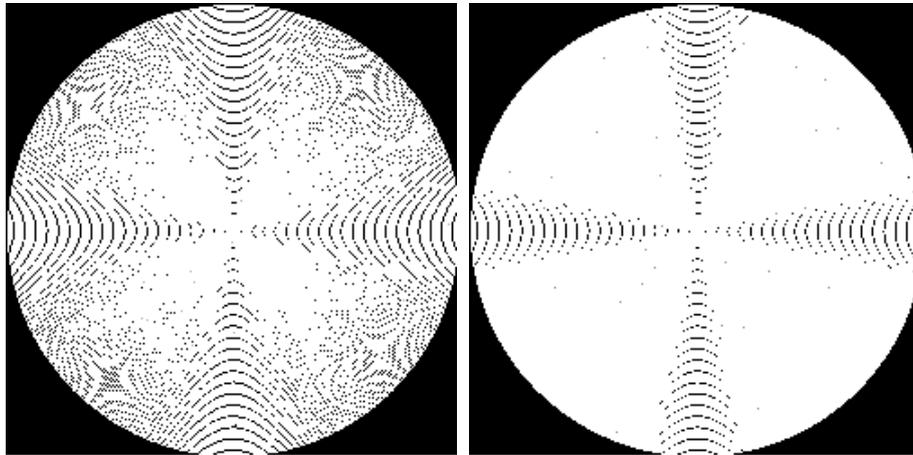


Figure III-20 : Acquisition du moiré dû au sous-échantillonnage numérique. A gauche, échantillonnage à 1MHz. A droite, échantillonnage à 10MHz. Images acquises pour 8 images par seconde, 250x250 pixels).

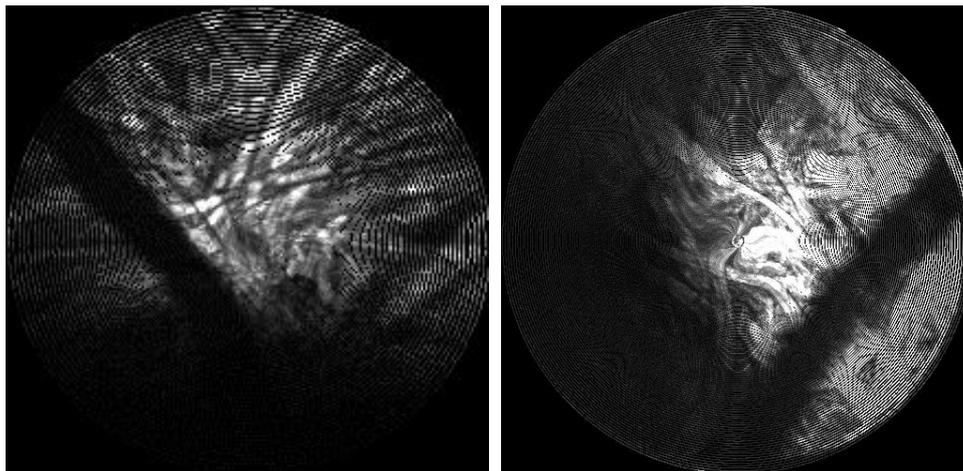


Figure III-21 : Comparaison entre deux images de papier à 8 images par seconde. À droite, anciennes valeurs (en 250x250 pixels imposés), à gauche nouvelles valeurs (en 500x500 pixels)

- Gain en cadence : ainsi on peut imager de 10 à **25 images par seconde** (Figure III-22). Une dynamique plus importante est possible, mais nous allons voir que la part d'informations perdues par sous-échantillonnage mécanique dans ce cas est trop importante. Produire des images aussi rapidement renforce la nécessité d'un contrôle parfait de l'excitation de la fibre ainsi que la contrainte sur la maîtrise du freinage (Figure III-23).

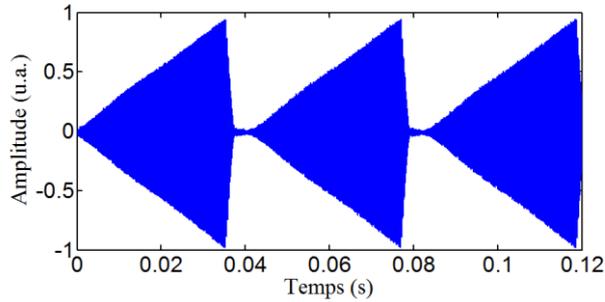


Figure III-22 : Trajectoire mesurées au PSD à 25 image/seconde. La trajectoire est maîtrisée et permet d'obtenir des informations fidèles et répétables.

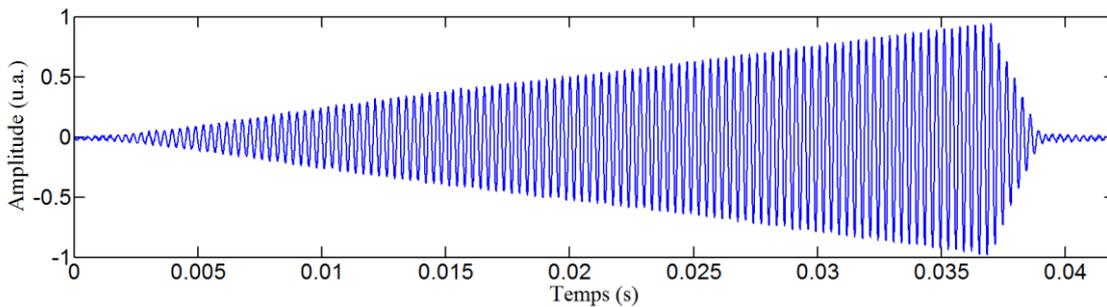


Figure III-23 : Zoom sur la trajectoire mesurée au PSD à 25 image/seconde. On remarque que 5 oscillations permettent à la fibre de retourner au repos

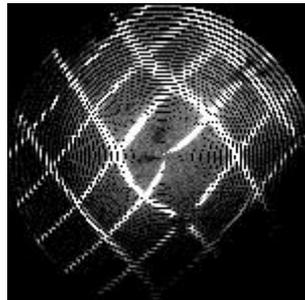


Figure III-24 : Image de grille en réflectance de 50 μm à 25fps et moiré associé. (Lien vers vidéo à 25 image/s sur la **grille de 50 μm et papier**)

Il en résulte que le système dans son ensemble n'est limité que par la fréquence de résonance de la fibre. En effet, celle-ci va imposer la période spatiale entre deux révolutions du balayage. Ainsi, pour une sonde qui résonne par exemple à 1.5 KHz, si l'on souhaite une acquisition à 25 images par seconde, on ne dispose que de 60 oscillations pour réaliser l'image et le freinage. Si on suppose une résolution optique micrométrique du système, le champ ne doit pas excéder les 120 μm afin de ne pas sous échantillonner l'espace entre deux passages de la fibre. On en déduit une règle empirique telle que :

$$\Delta res_m \approx \frac{FPS * FOV}{2(f_{res} - Osc_{freinage})}$$

Avec Δres_m la résolution mécanique, ou résolution entre deux révolutions.

Le long de la trajectoire de la fibre, en revanche, l'échantillonnage informatique de 10MHz, permet d'obtenir une mesure toutes les 0.1 μs , soit environ 670 mesures par révolution de spirale à 25 images/seconde. On peut donc en déduire le diamètre du champ maximum D_{max} à cette cadence

pour ne pas avoir de sous échantillonnage informatique (en considérant une résolution optique toujours micrométrique)

$$D_{max} = \frac{res_{optique} * 670}{\pi} = 210 \mu m$$

On comprend donc bien que l'informatique n'est pas le facteur limitant du système, et que celui-ci provient des contraintes physiques du résonateur.

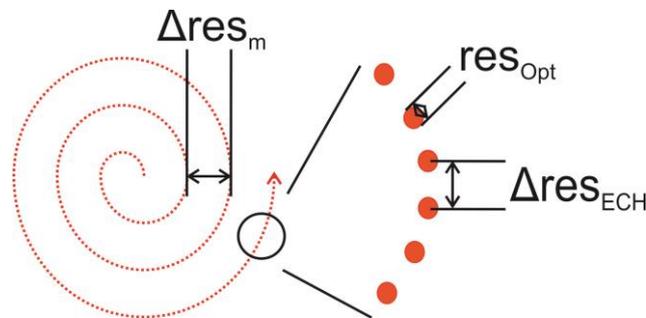


Figure III-25 : Les différentes résolutions du système. Sur ce schéma un point rouge représente la résolution optique donnée par la fonction d'étalement du foyer (ou Point Spread Function, « PSF »). L'espace entre deux points le long de la spirale représente la résolution imposée par l'échantillonnage numérique. Enfin, la fréquence de résonance associée à la taille de champ et la dynamique choisie fixent la résolution mécanique (Δres_m).

Enfin, il a été ajouté au programme un système de gestion d'obturateur afin de pouvoir exciter de manière séquentielle, avec l'une ou l'autre des voies d'excitation, dans le but d'obtenir une image en ratio redox.

Au final, les propriétés de la sonde qui a été utilisée pour les travaux sur l'étude du métabolisme sont :

- Une sonde de fréquence de résonance de 1550 Hz
- Une taille de champ (diamètre), pour les cadences usuelles, maximale de:
 - 500 μm jusqu'à 4 images par seconde.
 - 450 μm jusqu'à 8 images par seconde, en pratique on ne dépasse pas 250 μm pour près de 250 révolutions de la spire.
 - 300 μm jusqu'à 16 images par seconde, en pratique on ne dépasse pas 100 μm pour près de 120 révolutions de la spire.
 - 250 μm jusqu'à 25 images par seconde, en pratique on ne dépasse pas 50 μm pour près de 60 révolutions de la spire.

d. Micro-optique distale de la sonde d'imagerie

Le micro-système optique qui doit être placé après la fibre optique conditionne les caractéristiques optiques (ouverture numérique, résolution optique, champ de vue, distance de travail, chromatisme, aberrations géométriques) et aussi les performances énergétiques du système (efficacités d'excitation et de collection). Celui-ci est inspiré par (Zhao et al. 2010) et a été implémenté lors de la thèse de G.Ducourthial

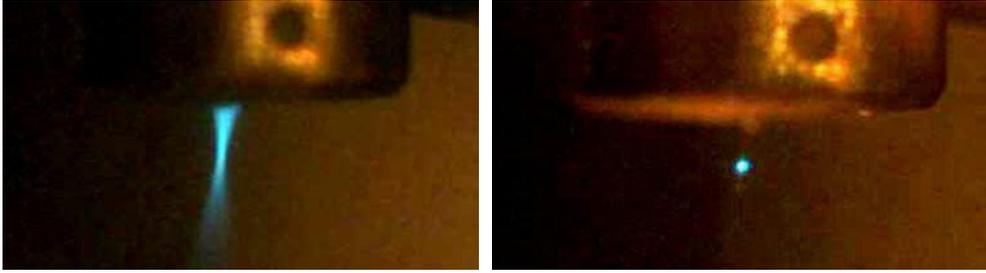


Figure III-26 : Différence entre fluorescence à un et deux photons après focalisation par le micro-objectif. Ces deux images ont été prises en bout de sonde endoscopique.

Le micro-objectif utilisé est une association de trois doublets achromatiques de 2 mm de diamètre externe. Ce système permet d'obtenir un bon compromis entre la résolution, la taille du champ d'observation et la distance de travail. Il présente un grandissement théorique de 0,42 (mesuré 0,48), ainsi que des ouvertures numériques objet (côté fibre) de 0,19, et image (côté échantillon biologique) de 0,45.

L'EMMP reposant sur une réponse ayant une longueur d'onde très différente de l'excitation, le chromatisme induit une différence de position le long de l'axe optique du point focal retour, pouvant être de l'ordre de quelques millimètres (Wu & Li 2010). Cet effet est un problème lors de la collection de la réponse par la deuxième gaine de la fibre optique. Le faible chromatisme permet donc une bonne collection du signal non linéaire.

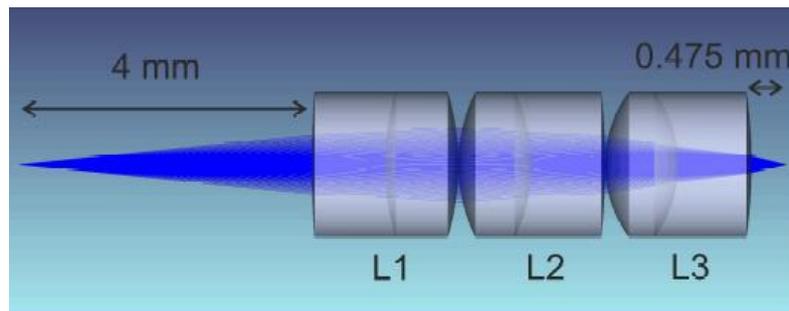


Figure III-27 : Assemblage de trois doublets achromatiques commerciaux Edmund Optics (EO) ; L1 : ref. EO #65-569 ; L2 : ref. EO #65-568 ; L3 : ref. EO #65-567 (gauche : fibre optique ; droite : échantillon). (Schéma issu de (Ducourthial 2014))

Cependant, dans le cadre de l'endomicroscope à deux photons pour la visualisation du métabolisme, cet effet du chromatisme est d'autant plus critique. En effet, la différence de position le long de l'axe optique du point focal entre les deux longueurs d'ondes d'excitation, compte tenu de la confocalité naturelle de l'imagerie non linéaire peut conduire à imager deux plans différents de l'échantillon. Il est donc nécessaire de mesurer l'effet du chromatisme aux deux longueurs d'onde utilisées. Cela permet de s'assurer que l'on image sur le même plan entre les deux longueurs d'onde, et donc que les deux images qui servent *in fine* à créer l'image redox représentent bien la même information spatiale.

En premier lieu, des simulations complémentaires sur ZEMAX (Radiant ZEMAX) ont été menées. Pour cela j'ai repris le fichier de simulation de l'objectif créé par G.Ducourthial en modifiant le point source. Celui-ci présente un point source bi-chromatique d'ouverture numérique de 0.13 situé à 4 mm de la 1^{ère} lentille. Les longueurs d'onde utilisées sont 760 et 860 nm.

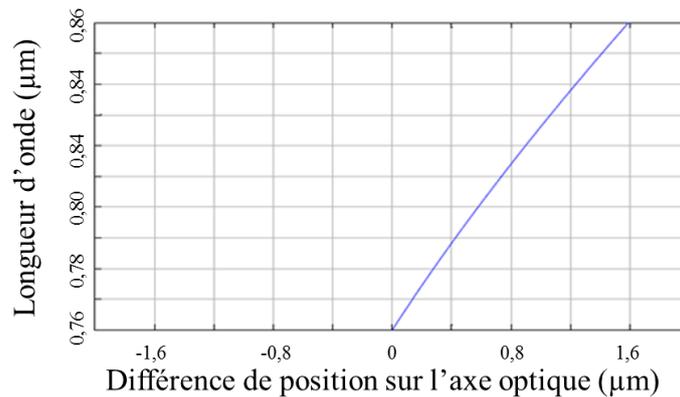


Figure III-28 : Décalage théorique de la focale entre 760 et 860 nm. Entre les deux valeurs extrêmes on obtient un décalage de 1.6µm

Le micro-objectif présente un chromatisme qui va se traduire par un déplacement du plan focal sur l'axe optique. On constate qu'en théorie ce déplacement est de 1.6 µm de 760 à 860 nm. Il est par la suite nécessaire de comparer ce déplacement à la résolution optique axiale afin de déterminer s'il a une incidence forte en imagerie.

Cette étude est effectuée en mesurant des fonctions d'étalement au foyer (« FEF », ou Point Spread Function, « PSF ») pour les deux longueurs d'onde, afin de mesurer les résolutions de l'instrument et de confirmer l'effet du chromatisme. Cette mesure est effectuée à partir de l'image de billes fluorescentes de 0.1 µm de diamètre aux 2 longueurs d'onde. Afin de conduire cette mesure il est nécessaire de déconvoluer la taille des billes afin d'obtenir la PSF. Dans notre cas, les billes étant bien plus petites que la résolution de l'instrument, elles sont assimilables à un Dirac spatial et le profil en intensité de celles-ci correspond donc au profil du foyer. Pour mesurer la résolution axiale, j'ai balayé l'échantillon en profondeur à l'aide d'une platine contrôlée numériquement. Les deux mesures (760 et 860 nm) ont été réalisées successivement.

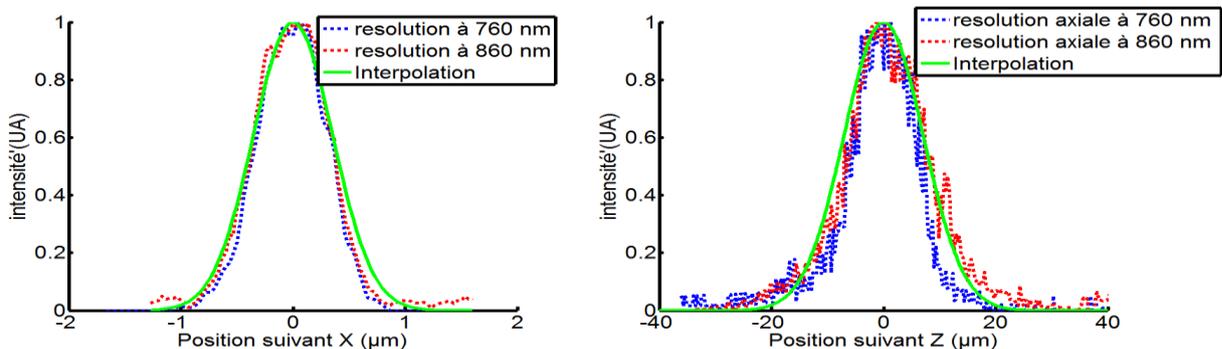


Figure III-29 : Mesure des FEF à 760 nm et 860 nm à l'aide de billes fluorescentes de 0.1µm de diamètre.

Gauche : résolution latérale : 0.72 µm à 760 nm et 0.82 µm à 860 nm. Droite : résolution axiale : 11.7µm à 760 nm et 13.5 µm à 860 nm. On remarque que la FEF à 760 nm est incluse entièrement dans celle à 860 nm avec un décalage de 1.8µm.

Le micro-objectif répond donc bien à nos attentes :

- Sa résolution transversale (Figure III-29) de 0.82 µm maximum permet d'imager des structures intracellulaires

- Les plans d'imageries à 760 et 860 nm (Figure III-29) sont bien superposés et permettent d'accéder à la même information. On remarque que la PSF à 760 nm est incluse entièrement dans celle à 860 nm avec un décalage de $-1.8 \mu\text{m}$, nettement plus faible que notre PSF et donc non problématique pour l'imagerie

e. Micro-optique distale alternative de la sonde d'imagerie : la lentille GRIN achromatique

Un autre type d'optique a été envisagé dans le cadre de cette thèse : une lentille à gradient d'indice (ou « GRIN », modèle GRINtech GT-MO-080-018-AC900-450). Contrairement aux précédentes générations de lentille GRIN, celle-ci présente un chromatisme réduit, ce qui la rend compatible avec la collection de signal de fluorescence comme on peut le voir sur la Figure II-22.

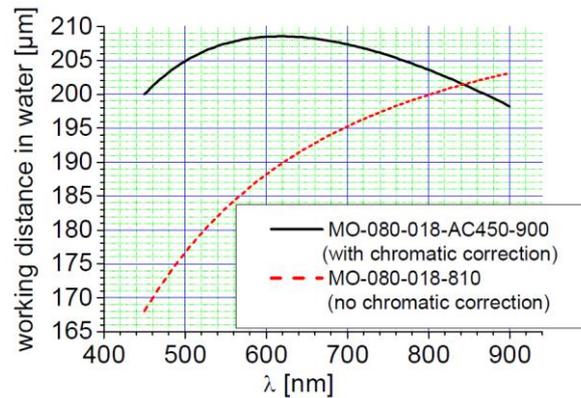


Figure III-30 : Chromatisme des lentilles GRIN. (Issu du catalogue GRINTECH)

De manière générale, les lentilles GRIN présentent une meilleure ouverture numérique (0.8) côté échantillon et des dimensions plus faibles (1,4 mm x 6 mm). En conséquence cela induit potentiellement une meilleure résolution et une meilleure collection du signal, avec une miniaturisation potentiellement supérieure. Ces avantages se font au prix d'une plus faible distance de travail ($200 \mu\text{m}$) et d'un champ de vue réduit (grandissement $\gamma = 4.76 \times$).

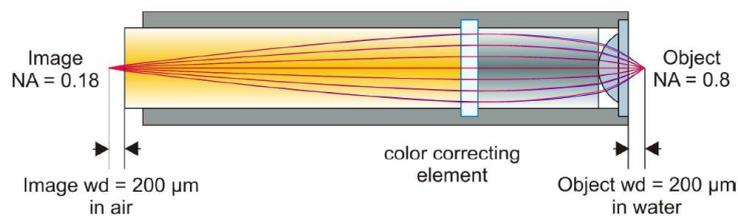


Figure III-31 : Lentille GT-MO-080-018-AC900-450 de GRINtech.

Les efforts pour développer une sonde avec ce type de lentille n'ont, pour le moment, pas abouti, mais il est certain qu'à l'avenir cette lentille fera l'objet d'un test pour les applications de suivi de métabolisme, où il est crucial de disposer d'une collection importante et où la taille de champ est réduite pour résoudre les mitochondries.

5. Vue d'ensemble du système utilisé

Le système qui a été mis au point pour l'endomicroscope multiphotonique fibré est donc le suivant :

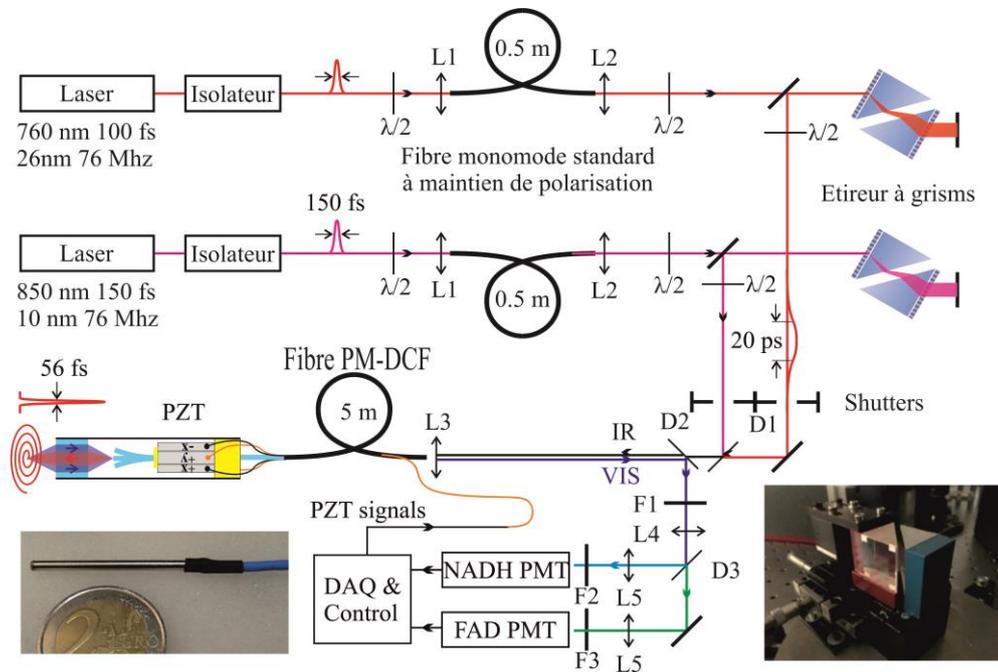


Figure III-32 : Schéma de principe de l'endomicroscope multiphotonique utilisé. L1: A375TM-B Thorlabs; L2: C110TME-B Thorlabs; L3: C230TME-A Thorlabs. L4: LBF254-200-A Thorlabs L5: LBF254-0758-A Thorlabs D1: FF801-DiO2 Semrock; D2 : FF705-DiO1 Semrock; D3 : FF495-DiO3 Semrock. F1: FF02-720-SP Semrock, F2: FF02-460/80 Semrock; F3 : FF01-538/40 Semrock.

L'excitation est réalisée par deux sources laser (860 nm, 76 MHz, 150 fs et 760 nm, 80 MHz, 100 fs) suivies chacune d'un isolateur de Faraday. Vient ensuite après chaque laser la première fibre optique pré-compensatrice des effets non-linéaires (Thorlabs, PM780-HP). Au niveau de l'extrémité de ces fibres, des obturateurs contrôlés informatiquement ont été placés et permettent la sélection de la longueur d'onde d'excitation ou leur utilisation alternée.

On trouve ensuite l'étireur à Grisms en transmission pour la pré-compensation de dispersion. Les deux voies sont ensuite combinées grâce à un miroir dichroïque D1 (FF801-DiO2 Semrock) avant d'être injectées dans le cœur central de la fibre endoscopique (T1979A, PhLAM) de cinq mètres de long.

À l'extrémité distale de la fibre endoscopique se trouve la tête de balayage miniaturisée qui a été présentée plus haut. Cette tête fait 2.2 mm de diamètre pour 37 mm de long et comprend le système de balayage reposant sur la résonance d'un bras de fibre optique et l'assemblage de trois doublets achromatiques qui agit comme micro-objectif. La sonde distale pèse 1.2 grammes.

Le système de balayage est piloté par un ordinateur et par le logiciel LabVIEW à l'aide d'une carte de conversion numérique-analogique (ref. USB 6343 - National Instrument (NI)) générant quatre tensions de commande amplifiées par des amplificateurs E-835.00 (PI). Enfin une carte NI PCI 6115 acquiert les signaux venant des détecteurs.

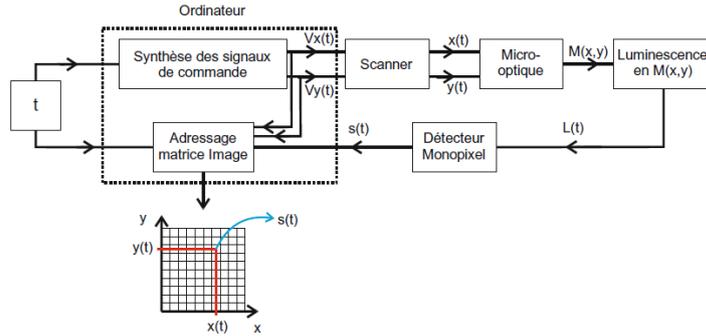


Figure III-33 : Schéma bloc de principe du système de balayage et d'imagerie (Schéma issu de (Ducourthial 2014))

À chaque instant, le faisceau laser excite un point de l'échantillon qui émet ou non une réponse. Celle-ci est collectée par la micro-optique puis par le cœur ainsi que par la gaine collectrice de la fibre endoscopique dans le but d'être réacheminée vers le système de détection à l'aide du miroir dichroïque D2 (FF705-DiO1 Semrock). Celui-ci réfléchit efficacement les longueurs d'onde inférieures à 690 nm.

Sur cette voie de détection, le filtre F1 (720-shortpass, Semrock) rejette le reliquat d'infrarouge. Ensuite, le miroir dichroïque D3 (FF495-DiO3 Semrock) définit deux canaux permettant de détecter séparément le signal d'autofluorescence issu

- du NADH se situant dans la bande du filtre F2 420 nm – 500 nm; (FF02-460/80 Semrock).
- du FAD dans la bande 418 nm – 558 nm; (FF01-538/40 Semrock).

La détection s'effectue à l'aide de deux photomultiplicateurs identiques (H7422P-40P, Hamamatsu ; efficacité quantique maximale = 40% @ 550 nm). Tout le module de détection est à l'intérieur d'une boîte opaque et chaque élément après L3 est tubé afin de réduire le plus possible les parasites dus à la lumière ambiante. Chaque PM est suivi d'un amplificateur trans-impédance bas bruit à gain et à bande passante réglable jusqu'à 500 kHz (ref. DLPCA-200 de chez Femto-Messtechnik GmbH). Les PMs fournissent des signaux temporels dont chaque instant correspond à une position sur l'échantillon. Ces signaux sont numérisés à l'aide d'une carte d'acquisition (PCI 6115, National Instruments). Puis grâce à au logiciel LabVIEW et à une table de correspondance, les deux images correspondantes aux deux canaux de détection sont construites numériquement.

6. Premières validations des systèmes expérimentaux sur cible biologiques

Dans un premier temps nous avons imagé une cible de référence en imagerie de second harmonique : le tendon de queue de rat. Pour cette observation, seul le canal de la SHG est utilisé. La Figure III-34 correspond à une étude de la réponse en génération de seconde harmonique détectée en fonction de la puissance moyenne d'excitation IR appliquée sur l'échantillon. Le numéro de chaque image correspond à la puissance déposée sur le tissu en milliwatts. Avec seulement 5 mW, on commence à distinguer les fibres :

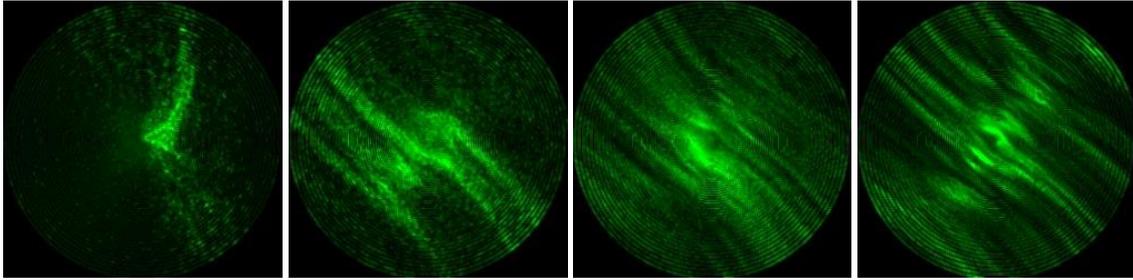


Figure III-34 : SHG sur tendon de queue de rat à 5, 10, 15 et 20 mW. L'excitation se fait à 760 nm et la collection après un filtre FF01-380/14-25. Image acquise à 16 images/sec et moyenné 4 fois.

Cet exemple permet de mettre en évidence la capacité de l'appareil à fournir des images contrastées avec une puissance moyenne faible, sur une cible peu coopérative, ici de la SHG avec une excitation à 760 nm (à cette longueur d'onde la réponse en SHG est cinq fois plus faible qu'à 810 nm (Peyrot et al. 2012)).

Un autre exemple, qui est détaillé en annexe, est l'imagerie d'échantillon de peau humaine fraîchement prélevée. Ici on s'intéresse à la capacité de l'instrument d'imager, dans un cas pratique, une organisation structurée :

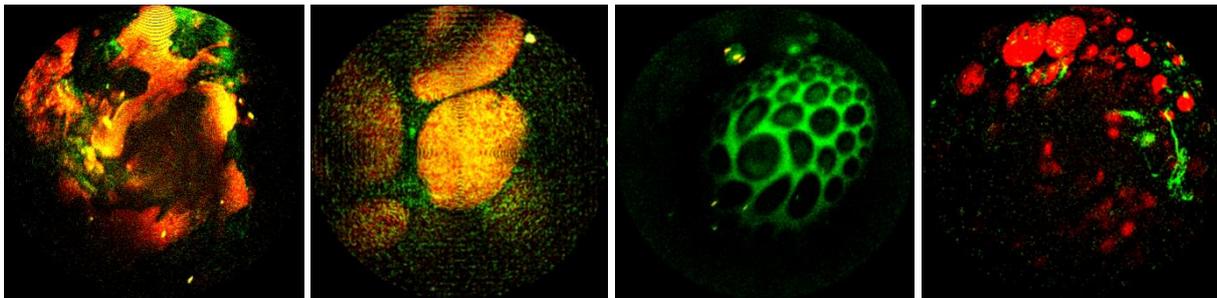


Figure III-35 : tissu fraîchement prélevé de peau humaine observé à l'endomicroscope observé à 760 nm (45mW). Image acquise à 16 images/sec et moyenné 10 fois.

En conclusion, nous avons développé un système endomicroscopique à même de potentiellement fournir une image de rapport d'oxydo-réduction optique. Ce système est une évolution de celui présenté par G.Ducourthial avec des modifications et améliorations notables comme l'utilisation conjointes de deux sources femtosecondes et une réserve énergétique supérieure. Les évolutions présentées dans cette partie sont résumées dans le tableau ci-dessous :

	Ducourthial 2014 (Xlim)	Leclerc 2017 (Xlim)
Fibre	5 m de fibre DC PCF T1628C (PhLAM) Cœur central : 3.55 μm	5 m de fibre DC PCF T1979A (PhLAM) Cœur central : 3.55 μm
Précompensation	Etireur à GRISM en réflexion	Etireur à GRISM en transmission
Scanner	Actuateur Piézoélectrique cylindrique	Actuateur Piézoélectrique cylindrique
Collection	Gaine de fibre DCF	Gaine de fibre DCF
Diamètre de la sonde/poids de la sonde	2.2mm/1.2g	2.2mm/1.2g
Détection	Analogique 2 Canaux	Analogique 2 Canaux
Particularité	-	Mesure du métabolisme
Excitation	810 nm - monocanal	De 760 à 860 nm - bi canal
Marquage	Non	Non
Cadence d'imagerie	8 im/s	25 im/s
Champ (maximal)	450*450 μm	450*450 μm
Résolution	0.8 μm	0.8 μm
Puissance maximale	40 mW	120 mW
Durée d'impulsion (min)	35 fs	50 fs
Profondeur d'imagerie atteinte	300 μm in vivo	300 μm

Chapitre IV. Validations du rapport d'oxydo-réduction optique sur modèles biologiques

I. Validation sur cellules *in vitro*

1. Avant-propos sur la nécessité d'imager sur des cellules en culture et méthodologie de la culture cellulaire

Par essence le suivi du métabolisme cellulaire nécessite d'utiliser des cibles vivantes. En effet, comme nous l'avons vu au 1^{er} chapitre, les fluorescences d'intérêt de cette étude sont liées à la respiration cellulaire, et nécessitent d'être régénérées en permanence. Par conséquent, afin de subvenir aux besoins permanents de cibles vivantes durant ma thèse, nous nous sommes équipés d'un laboratoire de culture cellulaire. Nous avons retenu pour nos travaux deux lignées cellulaires :

Les cellules d'adénocarcinomes de colon humain « HT29 ». Elles sont très utilisées en biologie car elles expriment des caractéristiques de cellules intestinales matures. Pour notre étude elles présentent des qualités indéniables. En premier lieu, elles sont robustes et connues pour leur stabilité et reproductibilité lors des cultures. Elles sont aussi associées à une importante consommation de glucose, synonyme de forte activité métabolique (Verhoeckx et al. 2015). Enfin, ce sont des cellules épithéliales cancéreuses, et correspondent donc parfaitement à la cible type d'un EMMP capable de réaliser l'imagerie du métabolisme. Je remercie le Pr Alexis Desmoulière de la faculté de médecine et de pharmacie de Limoges, qui nous a fourni ces cellules.

Ces cellules adhérentes sont cultivées en boîte de Pétri. Elles sont placées dans le milieu de culture McCoy 5A (89% du volume) auquel est ajouté le couple d'antibiotique pénicilline/streptomycine (5ml, 1% du volume) ainsi que du sérum de veau fœtal (SVF, 10% du volume) et de la L-glutamine. Ces boîtes sont placées dans un incubateur à 37°C sous 5% de CO₂

Les cellules issues de métastase de mélanome « HBL ». Cette lignée a été choisie afin de confirmer que les résultats obtenus ne sont pas imputables uniquement aux propriétés des HT29. Elle présente aussi une bonne robustesse, et, en tant que cellules métastatiques correspondent aussi à une cible potentielle d'un EMMP. Je remercie François Gallet (Unité INRA UMR 1061, unité de génétique Moléculaire Animale) de la faculté de sciences et techniques de Limoges, qui nous a fourni ces cellules.

Ce sont également des cellules adhérentes, cultivées dans les mêmes conditions que les cellules HT29, à l'exception du milieu de culture qui est le RPMI 1640.

Ces modèles cellulaires nous permettent de répondre aux questions suivantes :

- Sommes-nous capable d'imager les fluorescences cellulaires intrinsèques au travers de 5 mètres de fibre optique ?
- Sommes-nous capable d'exciter et de collecter les fluorescences du NADH et du FAD ?
- Détectons-nous assez de photons pour disposer d'informations quantitatives ?

2. Images de fluorescence cellulaire intrinsèque

Note : dans la suite de ce chapitre les images sont en fausses couleurs où la réponse issue du canal de détection du NADH est en vert et celui du FAD en rouge.

a. Microscopie linéaire

Nous utilisons un microscope inversé Olympus IX71 pour réaliser des expériences de contrôle en fluorescence linéaire. L'objectif utilisé est un x40 à immersion à huile (ON = 1.35) et optimisé pour avoir une bonne transmission dans le proche UV (Olympus UApo N 340). L'excitation est assurée par une lampe au mercure dont nous sélectionnons les raies utiles pour exciter le NADH et le FAD au moyen d'un filtre passe-bande à 330-385 nm pour le premier et 450-490 nm pour le second. Enfin le détecteur est une camera ORCA (C4742-98, Hamamatsu), précédée de filtres passe-bande à 420-460 nm pour la détection du NADH et 500-550 nm pour le FAD.

Dans un premier temps nous nous intéressons aux propriétés spatiales des fluorescences intrinsèques du NADH et du FAD dans les cellules.

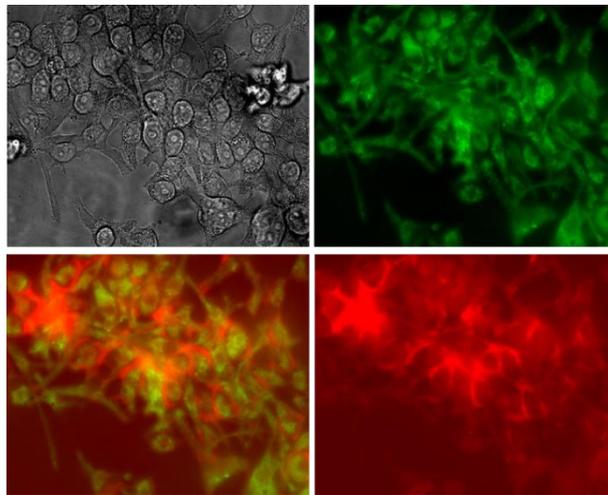


Figure IV-1 : Observation des cellules HBL. En haut à gauche : Transmission en lumière blanche. A droite de haut en bas respectivement : Signal de fluorescence du NADH et du FAD. En bas à gauche : Colocalisation NADH/FAD. (superposition des images réalisée grâce au logiciel ImageJ)

On observe une organisation particulière, ou les noyaux cellulaires sont visibles du fait de l'absence de signal (on parle alors de fantôme de noyau). Ceux-ci sont entourés d'un anneau très fluorescent dont on peut faire l'hypothèse qu'il est riche en mitochondries. Enfin une fluorescence plus diffuse permet de mettre en relief le reste du cytosol. Une organisation spatiale similaire est observée chez les cellules HT29.

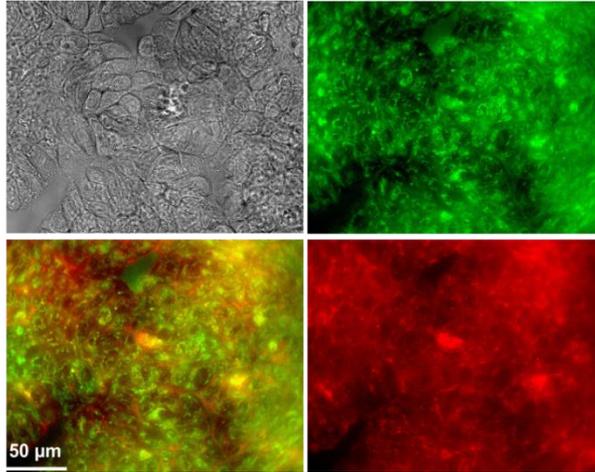


Figure IV-2 : Observation des cellules HT29. En haut à gauche : Transmission en lumière blanche. A droite de haut en bas respectivement : Signal de fluorescence du NADH et du FAD. En bas à gauche : Colocalisation NADH/FAD. (Images traitées sur ImageJ)

Afin de s'assurer que cette organisation spatiale particulière est caractéristique du NADH et du FAD dans ces cellules, nous avons par la suite marqué les cellules HBL au TRME, un marqueur spécifique des mitochondries.

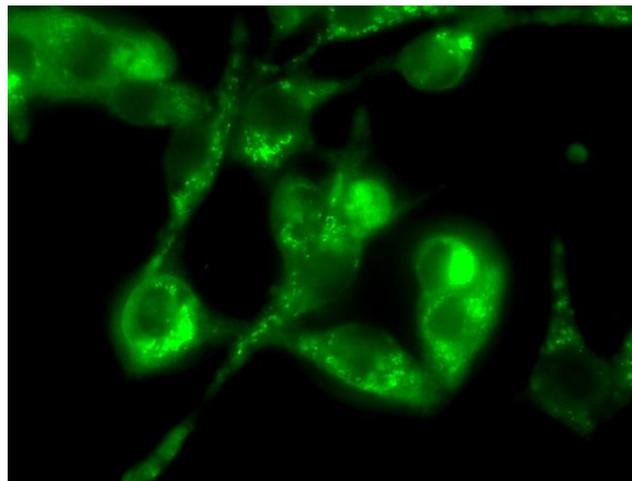


Figure IV-3 : Cellules HBL marquées au TRME. On retrouve l'organisation des mitochondries, concentrées autour du fantôme de noyau

Cette expérience confirme donc cette organisation spatiale particulière des mitochondries et donc du NADH et du FAD dans les cellules HBL et HT29. Cette information seule, on le verra, ne suffit pas à confirmer que l'on image exclusivement le NADH ou le FAD et que l'on peut faire la mesure du rapport d'oxydo-réduction. Cependant, retrouver cette organisation spatiale fortement corrélée aux mitochondries à deux photons permettrait de disposer d'une première preuve que l'on image bien ces molécules

b. En microscopie non linéaire fibrée

Les premières expériences d'imagerie non linéaire sur cellules ont été effectuées sur le microscope fibré à deux photons. Celui-ci présente l'avantage d'une excitation et d'une collection supérieure à l'endomicroscope grâce à l'utilisation d'un objectif de microscope de forte ouverture

numérique (W plan Apo-Chromat 63x/1.0 Zeiss). Dans un premier temps nous avons cherché uniquement le signal provenant du NADH.

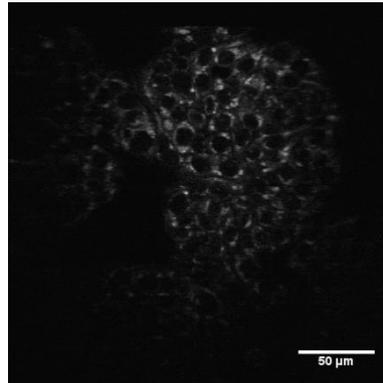


Figure IV-4 : Image brute obtenue de cellules HT29 sur le canal de détection de NADH. La puissance moyenne incidente sur l'échantillon est de 35 mW à 760 nm.

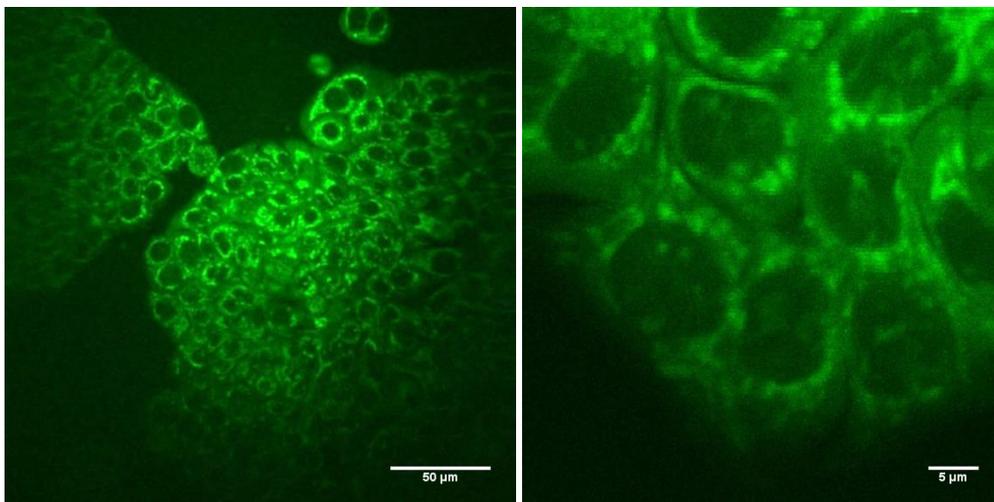


Figure IV-5 : Images de NADH de cellules HT29, observées au microscope fibré à deux photons. L'excitation est de puissance moyenne 60 mW à 760 nm. Gauche : champ de 250 µm, droite : 50 µm. Moyenné sur 4 images

Comme on peut le voir sur la Figure IV-4 le dispositif est capable d'acquérir une image des fluorescences intrinsèques des cellules. On distingue aussi très nettement les 3 zones différentes que l'on a vues en microscopie linéaire: le « fantôme » de noyau, autour de celui-ci une zone qui présente un fort signal de fluorescence. Enfin il y a un signal plus diffus qui correspond donc au cytoplasme. Cette organisation spatiale est donc extrêmement cohérente avec un signal mitochondrial et par conséquent cette image semble confirmer qu'on image bien le NADH.

Nous avons ensuite cherché à obtenir des images de NADH et FAD alternées. Pour ces mesures une image est acquise à 760 nm à partir des informations du canal de détection réservé au NADH. On acquiert sur l'image suivante une information issue de l'excitation à 860 nm à partir des informations du canal de détection réservé au FAD. On réalise pour cela une inversion des états des obturateurs (ouvert / fermé) placés sur le trajet des deux faisceaux. Cette inversion est obtenue automatiquement entre chaque image de la séquence.

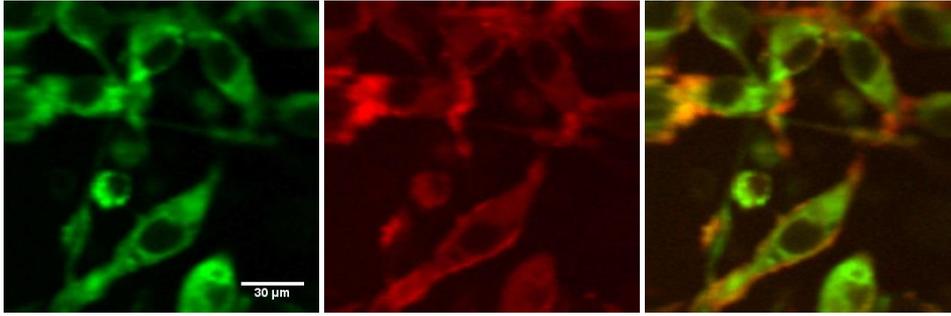


Figure IV-6 : Cellules HBL : en vert le canal correspondant au NADH, en rouge le canal correspondant au FAD, et colocalisation. L'excitation est de 25 mW à 760 nm (NADH) et de 45 mW à 860 (FAD). Champs de 150µm. Moyenne sur 10 images

Sur la Figure IV-6 on distingue les mêmes structures que précédemment (fantômes de noyau, signal fort provenant très probablement des mitochondries). On constate de plus que les images issues du canal NADH et du canal FAD présentent une information spatiale différente. Par conséquent ces canaux détectent bien une source de fluorescence différente. On remarque encore une fois que ces mesures sont parfaitement similaires aux images contrôles obtenues au microscope de fluorescence (Figure IV-1).

c. Endomicroscopie non linéaire

Enfin nous avons cherché à retrouver les mêmes observations à l'aide de l'endomicroscope.

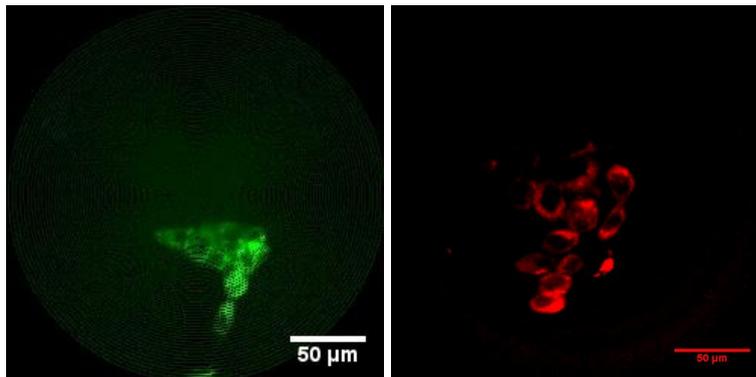


Figure IV-7 : Cellules HT29 : en vert le canal correspondant au NADH, en rouge le canal correspondant au FAD. L'excitation est de 30 mW à 760 nm (NADH) et de 45 mW à 860 (FAD) pour 16 image/s et un champ de 250 µm (Moyenne sur 4 images)

Les structures que nous avons détaillées plus haut ne sont pas très visibles pour une image en plein champ (diamètre de 250 µm). Il est nécessaire de réduire la taille de celui-ci afin de pouvoir les discerner (Figure IV-7).

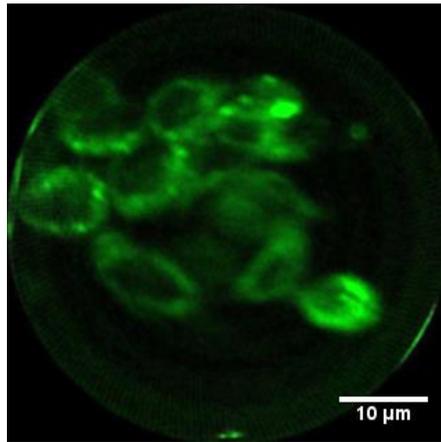


Figure IV-8 : Cellules HT29 : NADH de cellules HT29. L'excitation est de 30 mW à 760 nm pour 16 image/s et un champ de 50 μm (Moyenne sur 4 images)

On constate encore une fois sur la Figure IV-8 la présence d'un fantôme de noyau, entouré d'un anneau qui présente une forte fluorescence et baignant dans un milieu de fluorescence plus diffuse.

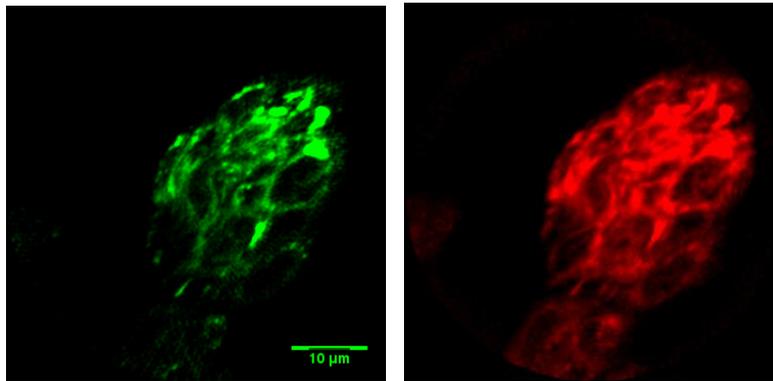


Figure IV-9 : Cellules HT29 : en vert le canal correspondant au NADH, en rouge le canal correspondant au FAD. L'excitation est de 70 mW à 760 nm (NADH) et de 90 mW à 860 nm (FAD) pour 8 image/s et un champ de 50 μm . Images brutes

La Figure IV-9 ci-dessus présente un cas d'excitation et de collection optimale. On voit très nettement, en l'absence de tout moyennage, un fort signal de fluorescence. Ces mesures nous permettent d'affirmer que nous excitons et collectons des fluorescences intrinsèques, qui vraisemblablement proviennent du NADH ainsi que du FAD. Nous disposons donc d'un rapport signal à bruit suffisant pour distinguer différents niveaux de signal et donc d'avoir une image quantitative de l'intensité de fluorescence, nécessaire pour pouvoir prétendre à l'imagerie du métabolisme par la mesure du rapport d'oxydo-réduction.

3. Contrôle de la nature des fluorescences par des variations issues de réaction métabolique

Nous venons de voir que nous sommes à même d'exciter, collecter et de détecter les fluorescences cellulaires intrinsèques sur les bande d'émission du NADH et du FAD. Cependant, même si ces images présentent des fortes similarités spatiales avec les contrôles au microscope de fluorescence classique et au marquage des mitochondries, des doutes peuvent subsister quant à la

nature de ces fluorescences. La population importante de molécules différentes dans les milieux biologiques nous incite en effet à la prudence.

Afin de démontrer qu'il s'agit bien de fluorescence de NADH et de FAD, nous avons cherché à mettre en évidence le lien entre la fluorescence mesurée et les mécanismes de production d'énergie cellulaire. Pour cela l'état métabolique des cellules a été modifié par l'injection de différents composés, largement utilisés dans la littérature (Kuznetsov et al. 1998; Mayevsky & Rogatsky 2007; Combs & Balaban 2001). Ces modifications entraînent des modifications dans la production et l'utilisation des deux métabolites, ce qui se traduit par des modifications de l'autofluorescence mesurée. La Figure IV-10 ci-dessous illustre ce principe.

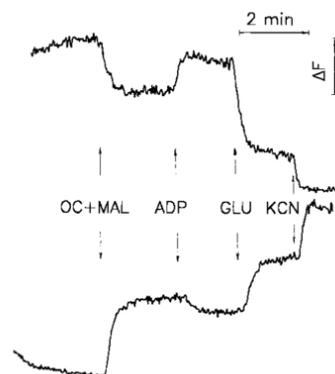


Figure IV-10 : Couplage et modification des niveaux de fluorescence du NADH et du FAD. La courbe du haut correspond au niveau de fluorescence du FAD et la courbe du bas au niveau de fluorescence du NADH. Tiré de (Kuznetsov et al. 1998). OC+MAL : octanoyl carnitine + malate ; ADP : Adénosine Di-Phosphates ; GLU : Glutamate ; KCN : Cyanure de potassium.

Dans nos expériences nous utilisons deux composés chimiques inhibiteurs différents :

- Un sel de cyanure, qui va se lier au complexe mitochondrial IV à la place de l'oxygène, et qui va entraîner l'accumulation du NADH mitochondrial et s'accompagner de la diminution du FAD. Après injection du composé, nous devons donc assister à une augmentation de la fluorescence du NADH et à une diminution de celle du FAD.
- Du FCCP, qui découple le transport d'électrons de la phosphorylation oxydative en relâchant des protons H^+ dans la mitochondrie. La conséquence directe est l'accélération des réactions chimiques et donc une diminution du NADH et du $FADH_2$ au profit du NAD^+ et du FAD. Après injection du composé, nous devons donc assister à une diminution de la fluorescence du NADH et à une augmentation de celle du FAD.

Ces expériences ont été conduites au microscope multiphotonique avec un contrôle au microscope Olympus. Afin de tracer les chronogrammes ci-dessous, des images ont été acquises à intervalle régulier (30s) sur les canaux de fluorescence correspondant au NADH et au FAD. Cette temporisation entre chaque image est nécessaire afin d'avoir un temps d'observation suffisamment long tout en réduisant le plus possible l'effet du photo-endommagement, nuisible à cette mesure. Au cours de l'acquisition les sels sont injectés pour moduler l'intensité de fluorescence. On ajoute donc 10 μ L à 100 μ M de cyanure ou 25 μ L à 1 μ M de FCCP dans le milieu de culture de volume 2,5 ml. Afin de permettre la diffusion des sels cette solution est homogénéisée au moyen d'une pipette. Les

séquences résultantes sont ensuite analysées sur le logiciel ImageJ ou l'on trace l'évolution de l'intensité de fluorescence intégrée sur toute l'image dans le temps.

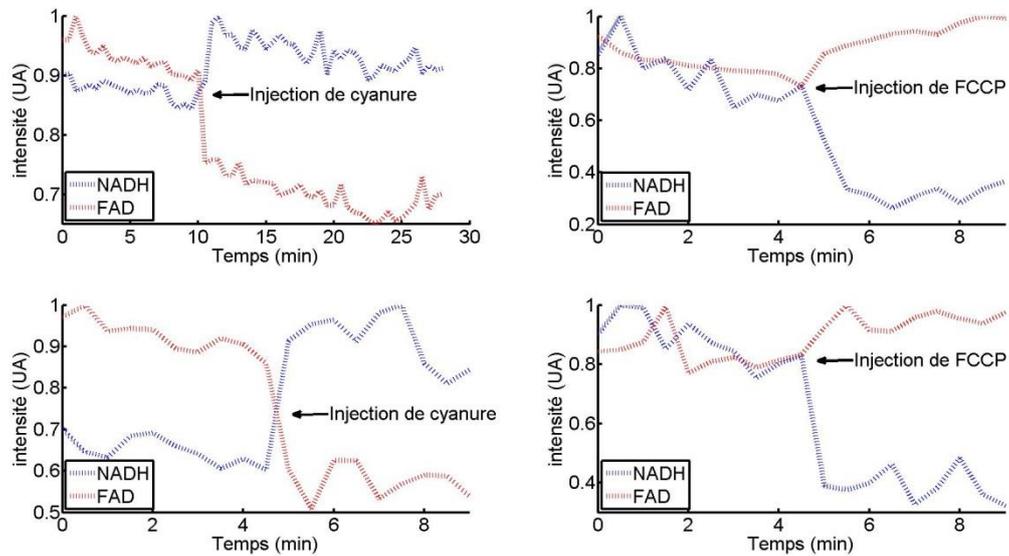


Figure IV-11 : Couplage et modification des niveaux de fluorescence du NADH et du FAD (microscopie de fluorescence classique).

Afin de calibrer correctement les quantités de sels à insérer et la procédure, des premières expériences en fluorescence linéaire sont effectuées (Figure IV-11). On constate que les niveaux de fluorescence évoluent suivant les mécanismes qui ont été décrit plus haut. On peut donc en déduire que nous réalisons bien l'imagerie du NADH et du FAD. On note que l'effet du FCCP sur le FAD est très réduit par rapport aux autres réactions.

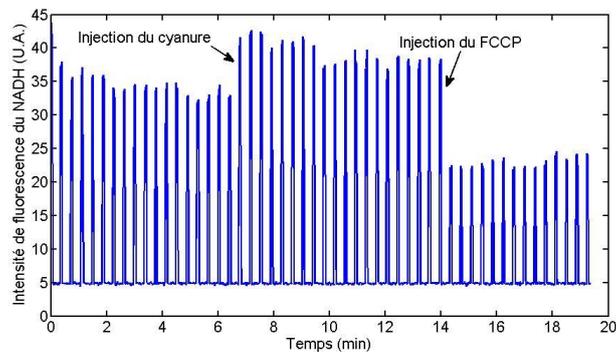


Figure IV-12 : Modification du niveau de fluorescence du NADH à 2 photons.

Par la suite cette expérience a été reproduite en excitation multiphotonique fibrée. La Figure IV-12 représente l'évolution de l'intensité de fluorescence du NADH. On constate une évolution du niveau de signal en accord avec les résultats attendus et l'expérience au microscope de fluorescence classique. Cette expérience confirme que nous mesurons bien le NADH sur le canal de fluorescence qui lui est réservé.

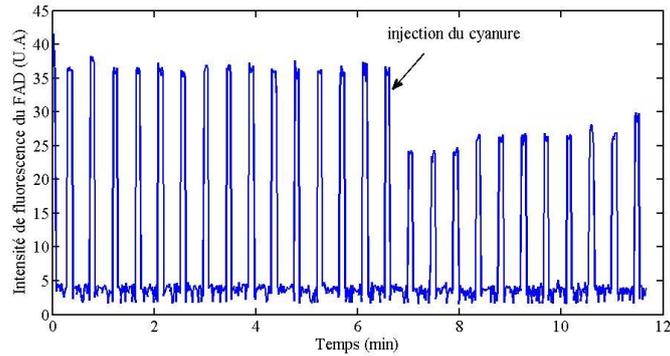


Figure IV-13 : Modification du niveau de fluorescence du FAD à 2 photons.

De même, sur le canal réservé à la fluorescence du FAD on constate l'effet antagoniste du cyanure. En revanche les expériences avec le FCCP ne nous ont pas permis de constater d'évolution marquée. En effet, après l'injection du cyanure cet effet est indiscernable de la régénération du niveau du FAD. L'action du cyanure, elle, est très visible et confirme que nous imageons bien le FAD sur le canal qui lui est alloué.

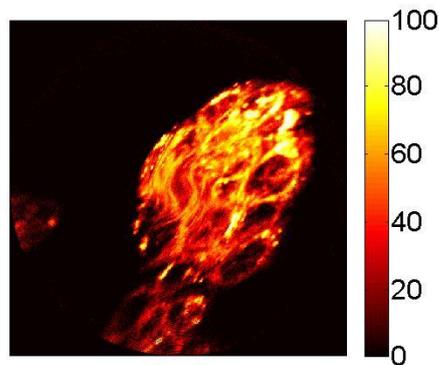


Figure IV-14 : Image en ratio d'oxydo-réduction optique de l'image présenté en Figure IV-9. Champ de 50 μm

Ces expériences présentent deux résultats fondamentaux :

- En premier lieu, on confirme l'excitation sélective du NADH et du FAD au travers de 5 m de fibre.
- Plus encore nous collectons suffisamment de photons pour avoir une réponse quantitative, propriété fondamentale pour le rapport d'oxydo-réduction. Par conséquent nous sommes bien en capacité de fournir des images du rapport d'oxydo-réduction optique en endomicroscopie (Figure IV-14).

4. Mise en évidence de la capacité du microscope fibré à distinguer entre un phénotype sain et cancéreux au sein d'un tissu.

Dans le cadre du stage de Master 2 de Tiffany Guerrenne de l'unité de Génétique Moléculaire Animale (UMR1061, université de Limoges), nous avons utilisé le microscope multiphotonique afin de distinguer, dans une population de cellules en culture, deux phénotypes (sain et cancéreux) au sein d'un tissu à l'aide de la fluorescence du NADH seul (pour des raisons pratiques, à l'époque de ces mesures la voie d'excitation du FAD n'était pas disponible).

Ce sujet de stage porte sur un marqueur cancéreux : le récepteur TrkB (Tropomyosin receptor kinase B). Il appartient à la famille des neurotrophines et leur récepteur serait impliqué dans la carcinogenèse en permettant la progression tumorale, et le développement de métastases de plusieurs cancers tels que ceux de l’ovaire (Au et al. 2009), de la prostate (Sato et al. 2001), et des tumeurs cérébrales (Pinet et al. 2014). Ainsi, les récepteurs aux neurotrophines peuvent être considérés comme des marqueurs cancéreux dont l’expression signe la présence de cellules tumorales. Ces observations se font sur des cellules HEK (Human embryonic kidney cells : cellules de rein humain embryonique), très classiques en laboratoire et souvent utilisées pour réaliser des sur- ou sous-expressions de gènes, car facilement manipulables.

Cette expérience a pour but de démontrer que si on surexprime le récepteur TrkB dans des cellules saines (qui ne l’expriment pas naturellement), il est possible que ces cellules acquièrent un profil cancéreux avec une augmentation de leur métabolisme et donc une forte synthèse de NADH. Dans ce but, les cellules HEK ont été transfectées avant un gène qui permet la surexpression transitoire du TrkB. Ces cellules ont l’avantage de ne pas présenter le récepteur TrkB naturellement. Cette transfection va concerner 5 à 10% des cellules en culture. En conséquence on obtient dans une même boîte de pétri des cellules présentant un phénotype sain (HBK Trk-) et 5 à 10% de cellules présentant un phénotype cancéreux (HBK Trk).

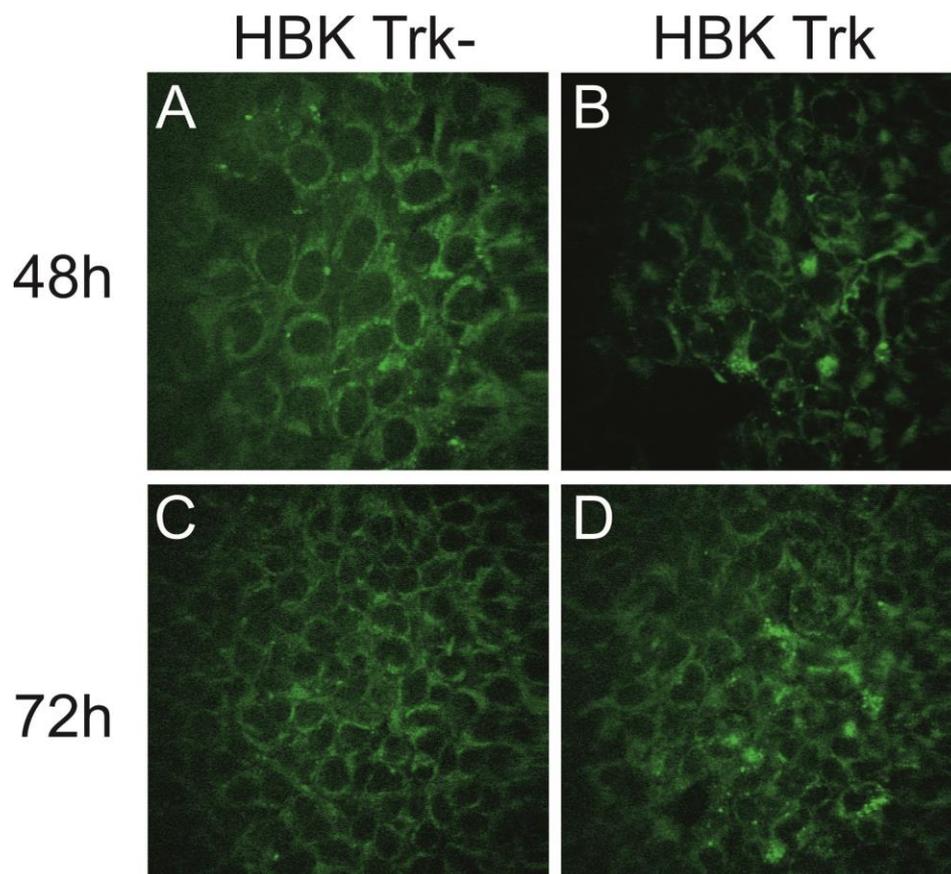


Figure IV-15 : Images au microscope fibré de cellules HEK contrôle à 48h (A) et 72h (C) et des cellules HEK transfectées après 48h (B) et 72h (D) de transfection. Excitation à 760 nm Puissance moyenne incidente de 40 mW

On voit nettement sur la Figure IV-15 ci-dessus que nous pouvons discriminer entre cellules présentant un phénotype sain et cancéreux en étudiant l’expression du NADH seul dans ces cultures.

En effet, dans les cultures transfectées, on constate que certaines cellules présentent une fluorescence significativement plus forte et conduit à observer deux populations différentes. A l'inverse dans les cellules contrôles Trk- la fluorescence est homogène pour toute la population cellulaire. Ce résultat met donc en évidence dans un cas pratique de recherche biomédicale la capacité du microscope à pouvoir discriminer entre des cellules présentant un métabolisme sain ou cancéreux.

II. Validation sur animal *in vivo, in situ*

Cette étape de validation représente une imagerie en conditions quasi réelles d'une imagerie sur patient. Afin de confirmer la capacité de l'appareil d'évaluer les fluorescences intrinsèques au cœur des matières vivantes, nous avons cherché à imager le NADH de cellules sur petit animal, *in vivo, in situ*. Afin de réduire la complexité de ces manipulations, nous nous sommes astreints à l'imagerie du NADH seul à 760 nm.

L'utilisation d'animaux a été autorisée par le comité d'éthique (autorisation : 15-2015-15, MoNaPulse) et placé sous la responsabilité de SM Bardet. Les expériences sur les souris ont été réalisées dans le respect de la réglementation européenne, appliquée en France selon le décret n° 2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

1. En microscopie fibrée à deux photons

Dans un premier temps nous avons cherché à imager le NADH dans un cerveau de souris. Ce travail a été effectué en partenariat avec l'Equipe BioEM de Xlim. Ces souris ont été opérées un an avant ces manipulations afin de remplacer un fragment du crâne par une fenêtre optique de 200 μm d'épaisseur.

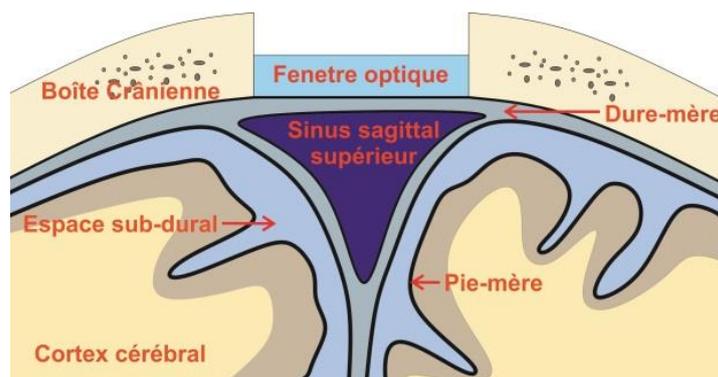


Figure IV-16 : Coupe de cerveau et structures de celui-ci.

Ces observations nous ont permis d'observer le NADH des cellules gliales en surface, au niveau de la dure-mère, qui constitue une enveloppe au cerveau (images de gauche sur la Figure IV-17). Puis nous sommes descendus sous l'espace sub-dural, où nous avons imagé la pie-mère que nous avons pu détecter en SHG grâce aux fibres de collagènes la constituant. Celle-ci est située environ 200 μm sous la fenêtre optique. Enfin juste en dessous de cette pie-mère nous avons vu des cellules correspondant aux neurones du cortex cérébral.

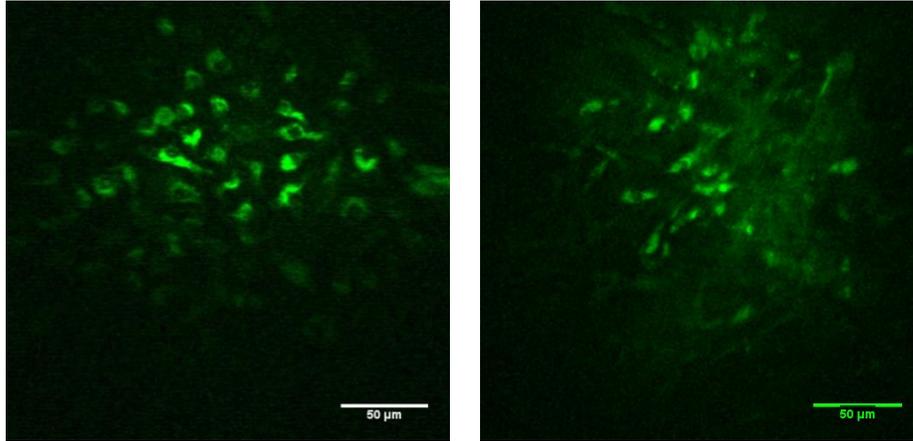


Figure IV-17 : Image de NADH dans le cerveau de souris. A gauche on observe les cellules gliales de l'espace sub-dural (en surface) (moyennée 4 fois). A droite des neurones observés en profondeur (sous la pie-mère repérée grâce à son collagène) (moyennée 10 fois). La profondeur de pénétration est d'environ 200 μm . Puissance moyenne incidente de 70 mW à 760 nm. Lien vidéo vers l'observation en directe de la **surface** du cerveau et **les neurones**

Lors de cette séance d'imagerie la souris a été sacrifiée et nous avons pu prendre une séquence de l'évolution du signal à la mort de la souris :

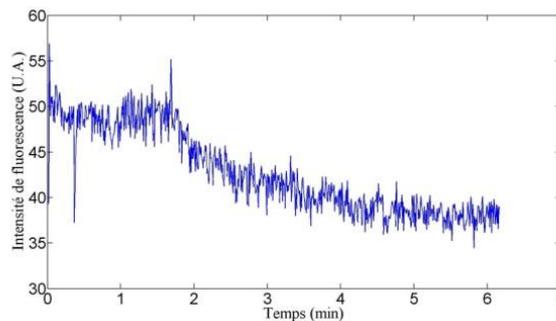


Figure IV-18 : Mort de la souris à $t = 0$. A $t = 2$ min le signal disparaît progressivement.

On constate une disparition progressive du signal de fluorescence du NADH au cours du temps en l'absence d'oxygénation du cerveau (Figure IV-18). Cette baisse n'est pas due à un éventuel photoblanchiment, comme on peut le constater par la constance du signal entre 0 et 2 minutes. Afin de confirmer que le signal observé était bien du NADH nous avons par la suite imagé directement une coupe de ce même cerveau *post-mortem*. Cette coupe ne présentait aucun signal de fluorescence. Ces résultats confirment que nous imageons bien le NADH des cellules en profondeur jusqu'à 200 μm sous des tissus.

2. En endomicroscopie non linéaire

- Expérience sur cerveau

Dans le but d'obtenir des résultats comparables au microscope et à l'endoscope, nous avons tenté d'imager le cerveau de souris *in vivo, in situ*. Lors de cette expérimentation, une goutte de sang s'est déposée sur le micro-objectif de la sonde lors de l'expérimentation et a été brûlée par le faisceau de puissance incidente 120 mW. Les propriétés optiques du micro-objectif ont été profondément altérées et l'expérience annulée. Nous avons par la suite remplacé les optiques mais l'expérience n'a pas pu être reconduite.

- Expérience sur cœur

Le cœur est une cible d'intérêt pour l'imagerie du NADH. Les cardiomyocytes, cellules responsables des contractions cardiaques, présentent un fort niveau de NADH. Ils sont cependant une cible très difficile à imager. Même si les cellules sont théoriquement riches en NADH, le tissu est lui-même très riche en sang oxygéné. Cela va induire une absorption et une diffusion importante, en particulier pour les photons issus de la fluorescence du NADH (Steinke & Shepherd 1988). Cette propriété nous force à réduire la puissance moyenne incidente pour éviter l'endommagement du cœur (Figure IV-19) et va conduire à une réduction du nombre de photons collectés. La puissance a donc été fixée à une puissance moyenne de 50 mW à 770 nm.

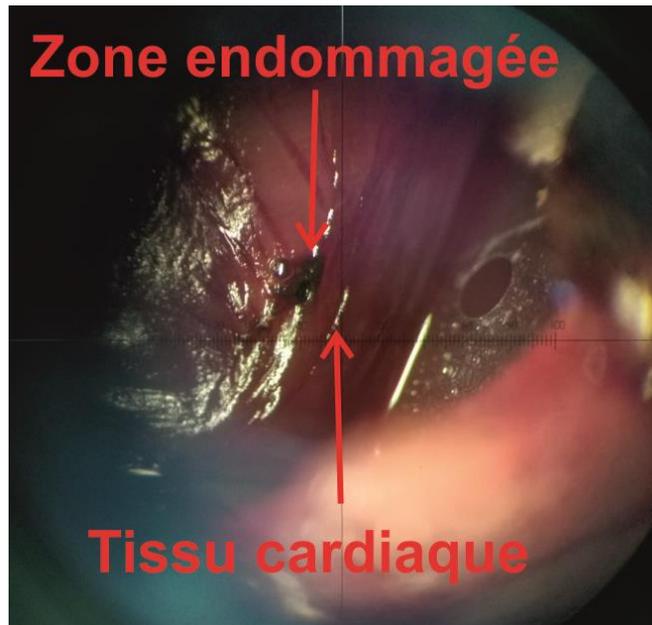


Figure IV-19 : Endommagement du tissu cardiaque sous l'effet d'une puissance trop importante lors de l'imagerie. Le cercle rouge permet d'identifier la zone qui a été endommagée par l'EMMP

Le cœur représente aussi un véritable challenge à l'observation du fait de ses mouvements périodiques. Chez la souris, le modèle que nous avons étudié, le rythme cardiaque est de 250 à 450 battements par minutes (4-7.5 battements/s). Afin de réduire les artefacts dus aux mouvements nous nous sommes inspirés du travail de (Jung et al. 2013). Un système de pompe à vide par circulation d'eau, crée une dépression de quelques dizaines de millimètres de mercure (entre 10 et 30 mm HG) dans deux tuyaux que l'on applique sur le cœur. Le phénomène de succion qui s'en suit permet de réduire les mouvements au voisinage des tubes d'aspiration (Figure IV-20).

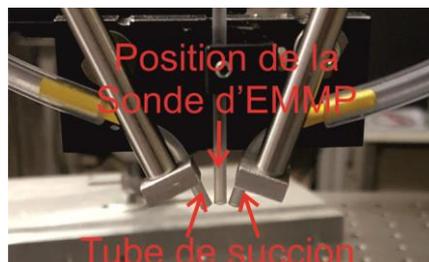


Figure IV-20 : Partie distale du dispositif de diminution des mouvements parasites par succion.

La sonde est montée sur un bras de support mécanique, lui-même fixé sur une platine 3 axes motorisée, au plus près du tuyau de succion. Afin de chercher à réduire au maximum l'influence des mouvements parasites, la sonde fonctionne à 25 images par seconde.

Les opérations sur ces souris ont été réalisées par Gabriel Bidaux (biologiste) et Lionel Augeul (Ingénieur) du laboratoire CarMeN (Inserm U1060) de l'université de Lyon 1. Les souris ont été fournies par Sylvia Bardet-Coste (maître de conférences, Equipe BioEM, université de Limoges). Le protocole consistait à opérer les souris anesthésiées pour ouvrir la cage thoracique afin de pouvoir accéder au cœur et réaliser son observation *in vivo, in situ*.

Dans un second temps, à l'aide d'un fil constricteur placé autour d'un ventricule, on réalise une ischémie, c'est-à-dire une privation d'oxygène, de celui-ci. Pour cela on va tendre le fil, qui va alors bloquer la circulation sanguine. Il en résulte que les cellules sont alors privées d'O₂, ce qui va modifier la concentration relative en NADH. Lors de cette expérience le canal alloué normalement au FAD n'était pas filtré et correspond donc à l'ensemble des fluorescences sur la bande (495 nm-720 nm).

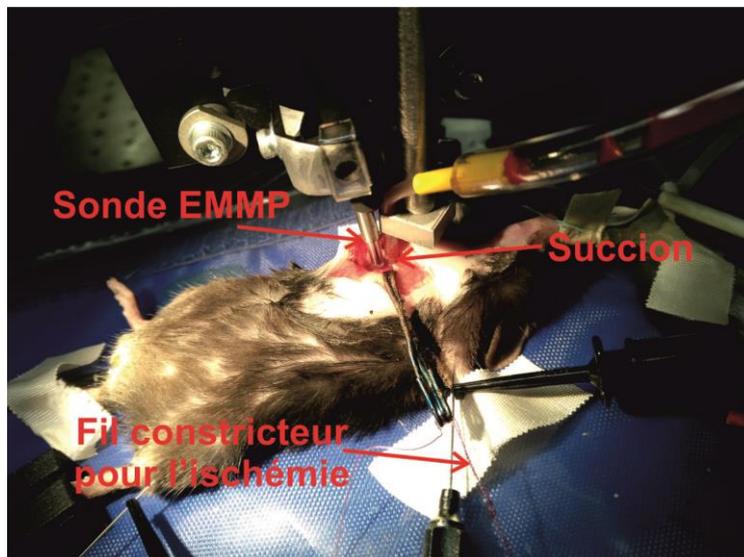


Figure IV-21 : La souris observée grâce à l'EMMP. On voit la souris anesthésiée placée sur un tapis chauffant. La cage thoracique a été ouverte pour pouvoir passer les différents instruments

Les résultats ne permettent pas de conclure directement grâce à l'observation des images, le niveau de signal n'était pas assez important pour observer des structures (Figure IV-22). De plus, et malgré la stabilisation du cœur grâce à un tube de succion et la dynamique d'imagerie élevée, les mouvements sont toujours très importants ce qui nuit à la qualité de l'image finale. On note cependant que lors de ces mesures un signal a été obtenu sur 4 des 6 souris imagées. Les deux autres souris sont mortes avant le début ou pendant l'observation. Post-mortem le cœur ne présentait pas de fluorescence dans le canal attribué au NADH.

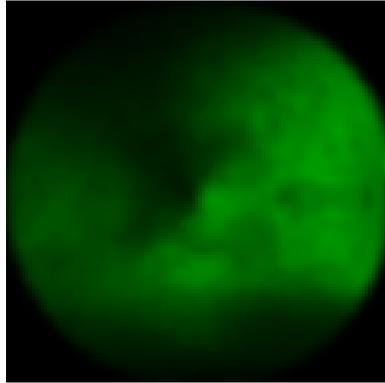


Figure IV-22 : Image de cœur de souris de 50 μm de champ à 25 image/sec. On ne distingue rien sur cette image moyennée 5 fois.

Nous avons cherché dans les séquences enregistrées à mettre en évidence le NADH. Pour cela les chronogrammes de celle-ci ont été tracés à l'aide des logiciels ImageJ. Puis sur Matlab j'ai calculé les transformées de Fourier dans le but d'isoler les composantes fréquentielles présentes qui ne soit pas imputables au mouvement de la respiration ou au respirateur de l'appareil d'anesthésie.

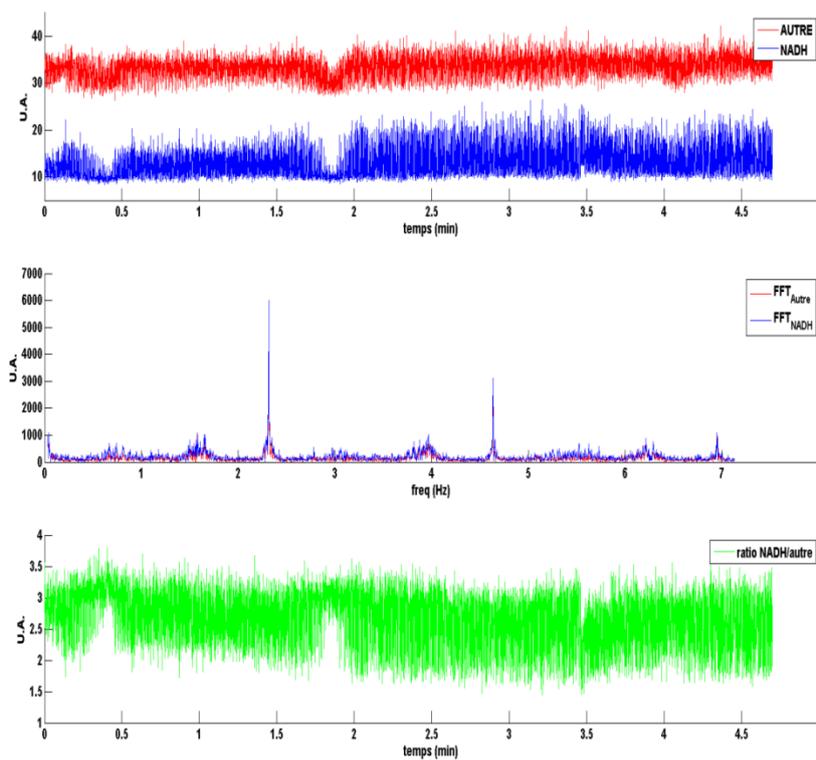


Figure IV-23 : Chronogramme du signal observé dans le cas d'une souris qui respire. De haut en bas : chronogramme, Transformée de Fourier associée et rapport entre les deux canaux de fluorescence.

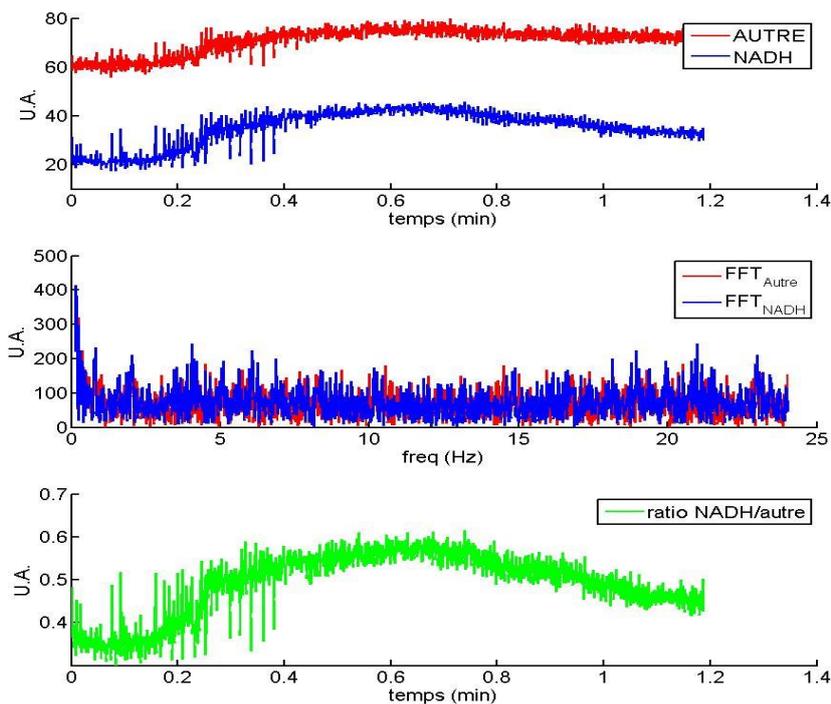


Figure IV-24 : Chronogramme du signal observé dans le cas de la mort d'une souris. De haut en bas : chronogramme, Transformée de Fourier associée et rapport entre les deux canaux de fluorescence.

On constate, en cas de respiration, une variation du niveau de signal (Figure IV-23). L'analyse fréquentielle révèle deux pics distincts. L'un correspond à la fréquence de respiration de la souris, l'autre à la fréquence du respirateur. Les tentatives d'induire une ischémie n'ont pas permis d'observer un comportement différent. L'une de ces tentatives a entraîné la mort de la souris ce qui nous a permis de faire une observation *Post mortem*, donc en l'absence de mouvement. On obtient bien un signal qui évolue avec le temps (Figure IV-24). Cette évolution correspond théoriquement à l'évolution du signal de NADH, qui en cas de mort s'accumule dans les cellules avant de s'oxyder. Ces observations, bien qu'encourageantes car fortement corrélées au NADH, ne permettent par contre pas d'être catégoriques sur la nature du signal obtenu. De plus, les tentatives d'induire une ischémie n'ont pas permis d'observer un comportement différent du signal mesuré du fait de difficultés expérimentales : la traction sur le fil entraînant un mouvement, et donc un changement du plan d'observation prévenant l'étude de variation du niveau de signal.

Ce résultat est la conséquence d'une série de problèmes qui ne nous ont pas permis de garantir un fonctionnement optimal du système durant les expériences d'imagerie sur animal. Parmi ces problèmes on peut citer que le milieu de culture cellulaire a érodé la colle qui retient les lentilles en bout de sonde et imperméabilise celle-ci. Lors d'une séance d'imagerie de cellules préalable, le milieu de culture a ainsi pu, par capillarité, infiltrer la sonde et nuire aux propriétés optiques du micro-objectif. Un changement du triplet de lentilles a été nécessaire un jour avant les expériences et a contraint à utiliser une configuration sous-optimale. De plus comme cela a été abordé au chapitre III, le laser est utilisé à 760 nm en bord de bande ce qui implique que le modelock du laser est instable. Le système automatisé de Coherent de suivi de modelock (modelock tracking) va induire un glissement vers des longueurs d'onde plus hautes lorsqu'il établit à nouveau celui-ci afin d'obtenir une stabilité accrue. Peu avant cette séance d'imagerie ce phénomène a entraîné un glissement de la

longueur centrale à 770 nm, qui a réduit la capacité du système à exciter correctement le NADH (Figure I-5). En conséquence, il est possible qu'avec un système présentant des performances optimales les résultats obtenus soient de meilleure qualité.

Afin de répondre à cette question une autre campagne d'imagerie du petit animal doit être menée. Cependant au vu des résultats présentés au chapitre IV.I on peut s'attendre à des résultats beaucoup plus concluants.

En conclusion, nous avons vu que nous sommes à même, *in vitro*, d'imager les fluorescences cellulaires intrinsèques au travers de 5 mètres de fibre optique. Parmi celles-ci nous sommes capables d'exciter et de collecter spécifiquement les fluorescences du NADH et du FAD. Enfin nous détectons assez de photons pour disposer d'informations quantitatives et donc de proposer une image du rapport d'oxydo-réduction optique.

De plus, nous avons vu que nous pouvons différencier un phénotype cancéreux d'un phénotype sain au sein d'une population de cellules HEK transfectées ou non avec un gène codant TrKB.

Enfin, en microscopie multiphotonique fibré nous avons mis en évidence la capacité de l'instrument à détecter ce signal en profondeur dans un cerveau, qui est une cible peu coopérative qui présente une forte diffusion car il possède une très forte concentration en lipides.

Ces résultats, obtenus pour la première fois dans le cadre de l'endomicroscopie multiphotonique, montrent la pleine applicabilité de notre instrument au vivant et permettent d'imaginer des perspectives futures à ce travail, notamment comme perspective proche de validation complète, la détection *in situ* chez un animal d'une tumeur implanté par xénogreffe.

Dans un futur plus lointain on peut imaginer l'utilisation de cet instrument en clinique pour la discrimination des marges tumorales dans le cadre d'une opération chirurgicale ou la détection de cancer.

Chapitre V. Imagerie non linéaire fibrée résolue en temps de vie du métabolisme

I. Intérêt de l'imagerie de fluorescence résolue en temps de vie du métabolisme cellulaire

1. Avant-propos : sur les limitations de l'imagerie d'intensité

Si l'ORR présente un intérêt indéniable dans l'étude de nombreuses pathologies et pour de nombreuses applications son étude au travers du seul ratio d'intensité, n'est pas exempt de limitations (Skala et al. 2007). En effet, toute la fluorescence issue du NADH n'est pas uniquement imputable à la phosphorylation oxydative. Il existe d'une part du NADH libre dans le cytosol, et d'autre part le nicotinamide nucléotide phosphaté (NAPH et NADPH₂) qui ne possède pas les mêmes fonctions biologiques. Ces molécules présentent les mêmes caractéristiques spectrales de fluorescence et peuvent par conséquent être sources d'erreurs dans la mesure intensimétrique. Cela ne remet pas en cause la validité du rapport optique d'oxydo-réduction car ces fluorescences sont souvent considérées comme négligeables, la majorité du signal étant dû au NADH lié dans les mitochondries (Georgakoudi & Quinn 2012). De même, la fluorescence du FAD n'est pas non plus uniquement imputable à la fluorescence du FAD liée à LipDH, qui nous a intéressée jusqu'ici. Il peut aussi être lié à d'autres enzymes, les flavoprotéines, et jouer un autre rôle métabolique. Cependant, de la même façon que pour le NADH, la majorité de la fluorescence liée au FAD est souvent considérée comme liée à la respiration cellulaire (Georgakoudi & Quinn 2012).

Si les différentes sources de fluorescence imputables au NADH et au FAD sont indiscernables spectralement, ces molécules ne présentent en revanche pas le même temps de vie de fluorescence, c'est-à-dire le temps au bout duquel, après excitation, un photon est émis. Lakowicz et al. 1992 ont démontré que le temps de vie de fluorescence du NADH libre, d'environ 0.4ns était augmenté en cas de liaison à une protéine (3.4 ns) mais aussi que NADH et NADPH était dissociable en FLIM. De la même façon le FAD libre présente un temps de vie de 2.8 ns et de 0.6 ns s'il est lié à une enzyme. Ces résultats ont aussi été confirmés dans des mitochondries *in vitro* par Vishwasrao et al. 2005. Il en résulte qu'en temps de vie de fluorescence l'erreur due aux fluorescences parasites est moins importante, et donc la mesure du rapport d'oxydo-réduction optique plus sensible. De plus, ce temps de vie est relativement peu sensible aux variations de concentration ou aux phénomènes d'absorption linéaire par les tissus, rendant cette information encore plus robuste.

Afin de prendre en compte ces sources de fluorescence parasite, il faut alors distinguer les fluorescences issues du NADH/FAD libre ou lié. Le ratio intensimétrique ne permettant pas cette distinction, il faut ainsi faire appel à un contraste optique différent : la mesure de temps de vie de fluorescence ou « FLIM » (Fluorescence lifetime imaging microscopy).

2. Définition de la microscopie par mesure du temps de vie de fluorescence

Le FLIM consiste à ne plus mesurer le nombre de photons incident sur le détecteur mais leurs temps d'arrivée par rapport au temps où l'impulsion excitatrice a été émise, afin de discriminer ces photons différemment.

Ce processus tire parti d'un constat physique simple : si le temps au bout duquel un photon est réémis par une molécule fluorescente est un processus stochastique, si l'on considère un grand nombre de photons, ceux-ci répondent à une distribution mathématique déterministe telle que :

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$$

Où :

- $I(t)$ correspond à l'intensité de fluorescence à l'instant t
- τ : le temps de vie associé à la molécule fluorescence

Ainsi, par l'acquisition d'un grand nombre d'évènements et l'analyse d'un histogramme de temps d'arrivée des photons, on trouve que chaque molécule peut être associée à un temps de vie qui lui est propre, et donc discriminer deux molécules de cette manière.

Ce type de contraste présente par contre des inconvénients majeurs, qui font aujourd'hui le sujet d'intensifs travaux de recherche. L'information ne pouvant être obtenue qu'au travers d'un processus statistique, elle demande qu'un grand nombre d'évènements soient comptés, typiquement supérieur à 100-1000 (i.e. un grand nombre de photons incidents sur le détecteur).

En pratique, nous utilisons un système de comptage de photons résolu en temps (time correlated single photon counting, TCSPC), qui enregistre le temps d'arrivée d'un photon sur le détecteur par rapport au temps où a été émise l'impulsion excitatrice. La Figure V-1 représente le principe de cette mesure. Sa répétition permet de reconstituer un histogramme, qui permet de retrouver le temps de vie. Ce système de mesure TCSPC est d'emploi très répandu pour la mesure de temps de vie. En revanche, les systèmes électroniques actuels imposant un temps de latence de quelques dizaines de nanosecondes après détection d'un photon, le système étant « aveugle » aux photons incidents durant ce temps.

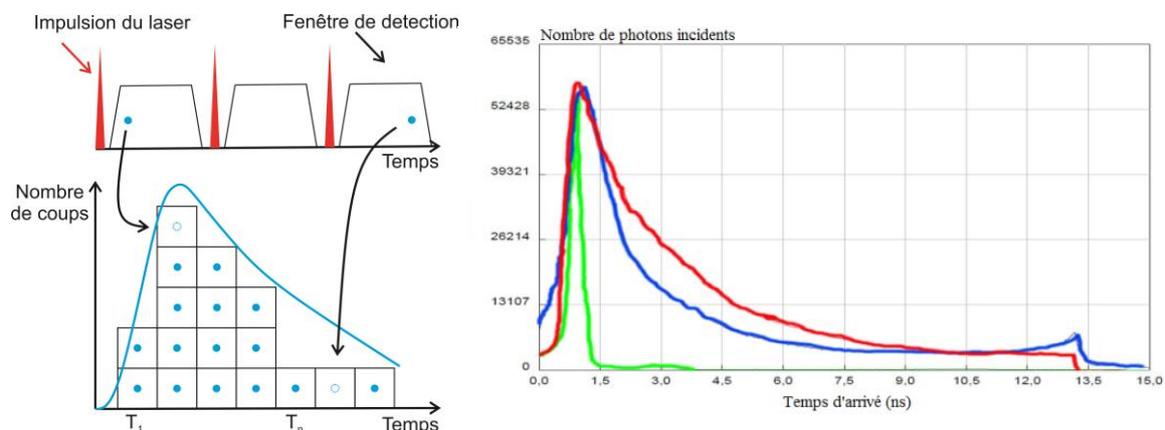


Figure V-1 : Gauche : principe de fonctionnement d'un TCSPC. Droite : histogramme donné par un TCSPC. En vert l'IRF du système de mesure (tel que mesuré par le TCSPC). En bleu l'historgramme de la coumarine ($\tau_{mes} = 2.3$ ns) et en rouge la rhodamine ($\tau_{mes} = 4.3$ ns).

De plus le détecteur impose un flux photonique inférieur à 1 photon pour 20 impulsions excitatrices, pour éviter statistiquement l'arrivée de plusieurs photons durant le même temps. En effet dans ce cas seul le premier photon après excitation est chronométré et ainsi les temps long sont désavantagés par la mesure par rapport aux temps courts. Cet effet, dit de « pile-up », associé à la nécessité de travailler avec un nombre de photons suffisant pour assurer la statistique conduit à une mesure du temps de vie intrinsèquement longue de l'ordre de 1 s par point de mesure.

L'histogramme que l'on acquiert correspond à la réponse du ou des fluorophores excités convolué par la réponse impulsionnelle du système global (Instrument Response Fonction, IRF). Afin d'obtenir un temps de vie avec l'erreur la plus faible possible, il est nécessaire de déconvoluer cette réponse. Dans notre cas, pour des raisons pratiques on assimile la réponse en SHG, qui est immédiate, à cette IRF.

Dans le cas où on excite simultanément plusieurs fluorophores, l'histogramme se présente alors non plus comme une courbe mono-exponentielle mais comme une multi-exponentielle. Cette réponse est la somme des réponses des différents fluorophores, dont les composantes doivent être séparées mathématiquement afin de connaître les temps de vie de chaque composé.

II. Résultat préliminaire de mesure du temps de vie par fibre optique

Il existe très peu de démonstrations de mesure du temps de vie par excitation non-linéaire au travers d'une fibre, et aucune employant une longueur pertinente pour l'imagerie en conditions réelles ($> \approx 3\text{m}$) (Knorr et al. 2012). Lors d'un travail préliminaire, nous avons cherché dans un premier temps à démontrer la possibilité de ces mesures et comment implémenter cette modalité d'imagerie en endomicroscopie.

Le système de mesure utilisé est un système TCSPC de modèle PicoHarp 300 (société PicoQuant) qui permet de reconstruire la courbe de déclin de fluorescence. La référence temporelle est constituée par le signal de monitoring du laser issu d'une photodiode, relié à un discriminateur électronique qui fournit une impulsion de 6.5 ns quand l'amplitude du signal dépasse un certain seuil. La sortie du photomultiplicateur de mesure est reliée à un amplificateur rapide (ref. HCA-200M-20K-C de chez Femto-Messtechnik GmbH) puis à un autre discriminateur. Cet ensemble est directement ajouté au banc de microscopie/endomicroscopie présenté dans cette thèse, le signal des PMTs est alors recueilli par le PicoHarp 300. Je remercie Alessandro Tonello d'Xlim, qui nous a prêté le PicoHarp 300.

Note : Ce travail a été conduit au cours de mon stage de master. Les systèmes optiques utilisés ne sont pas ceux présentés dans ce manuscrit mais dans la thèse de G.Ducourthial. (i.e : une excitation à 810 nm avec l'étireur à GRISM en réflexion)

1. Imagerie du temps de vie en microscopie fibrée

a. Mesure ponctuelle

L'interfaçage du module TCSPC a été réalisé sous LabVIEW, afin de pouvoir être utilisé en complément du programme d'imagerie intensimétrique. La méthode de calcul du temps de vie qui a été choisie est une méthode de moyenne pondérée sur le temps :

$$\tau \approx \frac{\sum Photons_i * \Delta t_i}{\sum Photons_i}$$

Avec i l'indice de la colonne dans un histogramme de déclin de fluorescence (soit Δt_i un intervalle temporel) et $Photons_i$, le nombre de photons comptés durant le temps correspondant à la colonne i . Ce calcul est très limité, uniquement valable dans le cas d'un déclin mono-exponentiel et ne permet pas une mesure de qualité du temps de vie. Elle est par contre extrêmement simple et permet de vérifier le fonctionnement du banc avant une optimisation vers une méthode plus sensible.

Dans un premier temps nous avons vérifié avec des solutions de produits purs, au temps de vie bien renseigné dans la littérature, si les résultats étaient en accords avec celle-ci (Figure V-1). Nous avons notamment mesuré le temps de vie de la coumarine et la rhodamine dans un solvant d'éthanol. L'expérimentation m'a permis de montrer que les résultats obtenus étaient répétables et cohérents avec les mesures issues de la littérature (Berezin & Achilefu 2011):

	Littérature (ns)	Mesure (ns)
Collagène (SHG)	-	0.4
Rhodamine 101 (solvant : eau)	4.1	4.3
Coumarine (solvant : éthanol)	2.5	2.3

En revanche il subsiste une erreur assez importante, de plus ou moins 20%, sur la mesure de temps de vie. Cette erreur confirme l'aspect simpliste et insuffisant de la méthode de la moyenne pondérée.

b. **Imagerie de temps de vie de fluorescence au microscope multiphotonique fibré**

Une fois assuré que le banc permettait des mesures de temps de vie correctes, j'ai fait une image FLIM, soit une mesure du temps de vie pour chaque pixel d'une image. Pour cela nous avons choisi comme cible un mélange de billes fluorescentes de diamètre $4\mu\text{m}$.

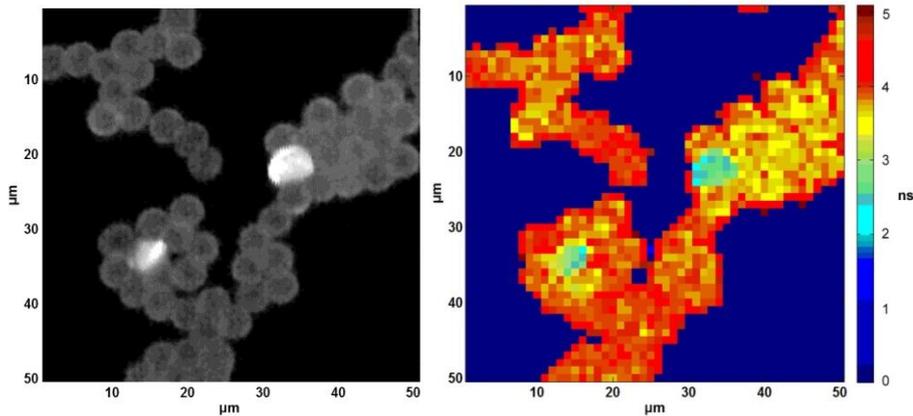


Figure V-2 : Imagerie de temps de vie de fluorescence sur billes fluorescentes; à gauche : Image intensimétrique à 2P; à droite : Image 2P FLIM

Cette toute première image démontre que le programme fonctionne et permet de réaliser au travers de 5 m de fibre optique une image de fluorophores résolue en temps. Il s'agit de plus de la première image de ce type sur une fibre longue d'après la littérature. Nous avons ensuite cherché à obtenir une image sur une cible moins coopérative : des cellules non marquées (de lignée U87) :

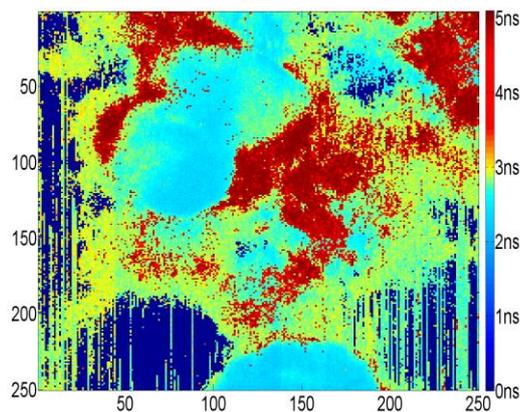


Figure V-3 : Cellules U87 non marquées. En bleu ciel les noyaux cellulaires ; en rouge les mitochondries ; en jaune-vert le cytosol ; en bleu foncé aucun fluorophores. L'absence de marquage nécessite de travailler avec peu de photons et d'avoir un déclenchement très bas (3 photons pour une colonne d'histogramme), d'où un bruit assez élevé.

Nous disposons donc d'assez de photons pour faire une image FLIM au microscope fibré non linéaire. Cependant on constate un niveau de bruit très important. Le temps d'acquisition est lui aussi extrêmement élevée : 5 minutes pour cette image en 500x500 pixels. Cette limitation est en grande partie due au TCSPC qui limite la fréquence d'acquisition des histogrammes à 1KHz.

Ces résultats intracellulaires préliminaires montrent que nous sommes capables de discriminer entre différents temps de vie et sont encourageants. Ce constat est renforcé si l'on passe à une échelle tissulaire où l'étude du Flim sur tissus sain/pathologique se fait par la discrimination de grande variation de temps de vie moyen sur une surface (cf chap I-III-1 (Knorr et al. 2012),(Fatakawala et al. 2013)). Dans ce cas la zone pathologique va présenter un temps de vie de fluorescence moyenne très supérieur à une zone saine (>2 ns). En l'état, ces résultats ouvrent donc de nombreuses perspectives pour le diagnostic et l'étude de tissus.

c. Mesure de temps de vie à l'endomicroscope

Contrairement au microscope fibré où le système de balayage par miroirs permet de fixer un temps d'intégration arbitraire entre chaque pixel, l'endomicroscope fixe ce temps par les propriétés mécaniques du balayage résonant. Ce temps est beaucoup trop court pour acquérir un histogramme de temps d'arrivée de photons au PicoHarp 300, qui nécessite 1 ms. Par conséquent aucune image n'a été prise sur l'endomicroscope.

Afin de savoir si des mesures de temps de vie de fluorescence sont possibles avec l'endoscope, le premier test qui a été réalisé est une mesure FLIM au centre de l'image intensimétrique. Cette mesure a donné des temps de vie en accord avec la littérature sur la fluorescence de l'élastine. De plus, une mesure à partir du signal de SHG du collagène permet de disposer d'un signal ultracourt (durée \approx des impulsions excitatrices, soit environ 70 fs) utilisable pour la mesure de l'IRF de notre système. Nous trouvons une IRF raisonnable (cf réponse de la SHG) (< 500 ps), qui peut tout à fait être déconvoluée et montre la faisabilité de l'intégration du FLIM dans notre système.

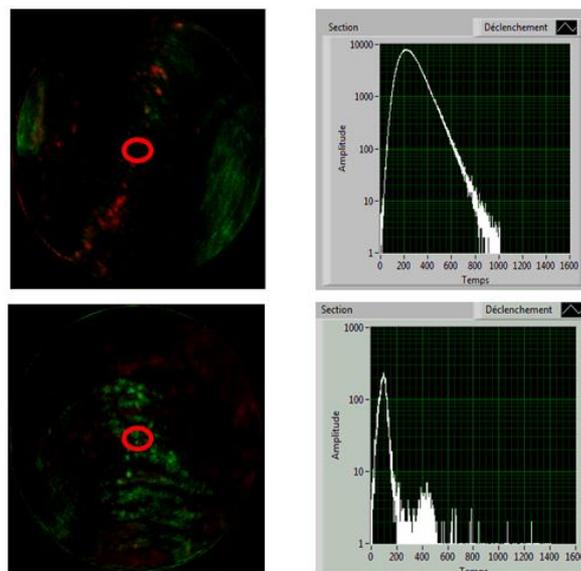


Figure V-4 : Mesure au centre de l'image utilisée en supplément de l'imagerie multiphotonique; En vert : collagène (SHG, $\tau_{\text{mesuré}} = 0.4\text{ns}$), cette mesure correspond à l'IRF du système de mesure; En rouge élastine ($\tau_{\text{mesuré}} = 2,3 \text{ ns} // \tau_{\text{théorique}} = 2.3. \text{ ns}$ (Berezin & Achilefu 2011)). (Echelle de temps 200 = 1.6 ns)

Ces résultats démontrent donc la possibilité d'une mesure FLIM au travers une longueur de fibre significative ($>3\text{m}$) en endomicroscopie. Il s'agit de plus des premières mesures de la littérature en endomicroscopie non-linéaire à travers une fibre de cette longueur. Cette première approche m'a permis de dégager des pistes de réflexion pour l'implémentation de cette technique :

- Le TCSPC utilisé est trop lent. Contrairement au microscope où le raster scan permet de fixer un temps d'intégration arbitraire entre chaque pixel, l'endomicroscope fixe ce temps par les propriétés mécaniques du balayage. Ce temps est beaucoup trop court pour acquérir un histogramme de temps d'arrivée de photons au PicoHarp 300, qui nécessite 1 ms. Il nous faut donc un nouvel appareil.

- Pour la mesure du NADH et du FAD les implémentations décrites au long de ce manuscrit étaient, comme nous l'avons vu, nécessaires (étireur à Grism en transmission, laser à 760 nm/860 nm...)
- Un traitement informatique de l'information plus rigoureux doit être utilisé pour éviter les erreurs de mesures.
- Enfin, comme nous allons le voir, la question de l'influence de la fibre sur la mesure nécessite une investigation.

Note : Le travail qui est présenté par la suite a été conduit au cours de ma thèse. Les systèmes optiques utilisés sont donc ceux présentés dans ce manuscrit.

2. Viabilité de la mesure résolue en temps de vie par fibre optique à double gaine

La mesure du temps de vie de fluorescence est une mesure de temps d'arrivée de photons par rapport à l'impulsion du laser. Cette mesure mène à la création d'une statistique qui permet de calculer le temps de vie. Dans notre cas la statistique mesurée peut être affectée par la fibre. En effet les photons signal sont collectés par une fibre en silice fortement multimodale, ce qui induit à la fois un effet de dispersion chromatique et de dispersion multimodale. Ces dispersions vont impacter la statistique et donc induire une erreur de mesure et, malgré les premières mesures encourageantes d'IRF, il peut être nécessaire de mieux étudier/quantifier cette erreur.

Nous avons vu que les différences permettant la discrimination entre les constituants qui nous intéressent était de l'ordre de quelques centaines de picosecondes. Il est donc nécessaire de voir quel est l'impact de la dispersion sur les mesures de temps de vie. Ce travail a été effectué par C.H. Hage, chercheur post-doctorant à Xlim.

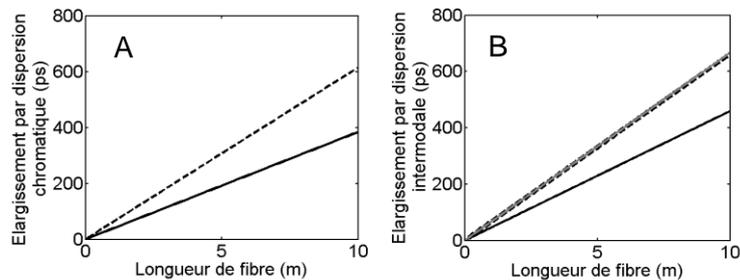


Figure V-5 : (A) Simulation de l'impact de la dispersion chromatique sur le temps de vie simulé pour un signal de 50 (trait plein) et 80 (tirets) nm de largeur de bande autour de 450 nm. (B) Impact de la dispersion intermodale sur le temps de vie simulé pour une fibre d'ouverture numérique de collection de 0.2 (trait plein noir, longueur d'onde 450 nm) et de 0.24 à 400 (tirets noirs) et 500 nm (trait plein gris).

L'effet de la dispersion intermodale est étudié par la propagation dans des fibres, de longueur et d'ouvertures numériques différentes, d'impulsions d'environ 100 femtosecondes de différentes longueurs d'onde. Ces impulsions provenant d'un titane:saphire (860-1060 nm) sont ensuite doublées (430-530 nm) en fréquence dans un cristal non-linéaire d'ordre 2. Cette architecture nous permet d'accéder aux longueurs d'onde typiques de fluorescence du NADH (430-530 nm). Le spectre relativement étroit (7 nm) de ces impulsions (proche de 400 fs) nous permet de négliger la dispersion chromatique et la durée des impulsions nous permet de les assimiler à une

fonction de Dirac dans les domaines spectral et temporel. La réponse obtenue représente donc la fonction de transfert de la fibre en absence de dispersion chromatique soit la contribution de la dispersion intermodale

La dispersion totale (chromatique et intermodale) est mesurée à l'aide d'un supercontinuum court (<2 ps, 800-1020 nm) généré dans une fibre microstructurée pompée par un laser titane:saphir. Ce continuum est ensuite doublé dans un cristal non-linéaire (400-510 nm). Cette architecture nous permet d'obtenir des longueurs d'onde typiques de fluorescence du NADH (430-530 nm). Le signal collecté en sortie de fibre est détecté par un photomultiplicateur rapide et son temps de vie est mesuré par le TCSPC (« PicoHARP 300 », Picoquant). La référence temporelle nécessaire à la mesure est fournie par le laser.

Ouverture numérique de collection	0.24	0.24	0.2
Longueur	4 m	8.15 m	6 m
Réponse à la dispersion intermodale @ 430 nm - calc. / mes. (ps)	266 / 210 ± 6	546 / 294 ± 2	276 / 280 ± 2
Réponse à la dispersion totale calc. / mes. (ps)	510 / 275 ± 8	1100 / -	650 / 258 ± 9
τ_m coumarine, après déconvolution par l'IRF du système (ns) Air libre / fibre	1.88 ± 0.04 / 1.81 ± 0.26	1.99 ± 0.04 / 1.91 ± 0.04	1.99 ± 0.04 / 1.86 ± 0.08

La déconvolution de l'IRF totale ({fibre + détecteur + TCSPC}) par l'IRF du système de mesure ({détecteur + TCSPC}) montre une influence de la fibre en deçà des valeurs attendues, due à une surévaluation de la dispersion intermodale. Cette réponse ($\approx < 300$ ps) reste faible et permet notamment de résoudre le temps de vie de la molécule de coumarine (≈ 1.9 ns, voir le tableau 1) et de le discerner de l'IRF totale du système de mesure (≈ 400 ps).

Ces résultats permettent d'envisager de distinguer, après déconvolution, des évolutions de ce temps de vie typique d'états métaboliques cellulaires, qui sont de quelques centaines de picosecondes autour de 2 ns.

3. Implémentation d'un modèle de traitement et représentation de l'information issus de la mesure de temps de vie de fluorescence

Le FLIM étant une mesure stochastique, il nécessite un traitement mathématique afin de traiter les acquisitions pour en déduire l'information utile. Pour répondre à ce besoin nous avons implémenté le traitement non itératif dit du «FLIM Phasor» (Stringari et al. 2011). Ici, chaque histogramme est transformé par transformée de Fourier en un Phasor qui est un vecteur appartenant au plan complexe dans une représentation de Fresnel. Puisque toutes les molécules ont un Phasor spécifique, la position d'un point dans le diagramme du Phasor est corrélée à une molécule spécifique. Avec cette méthode, le calcul de la valeur du temps de vie n'est pas nécessaire.

Sa seule restriction se limite à la nécessité d'obtenir de 100 à 1000 photons comptés pour chaque pixel de l'image afin de disposer d'une discrimination spatiale suffisante entre les composés.

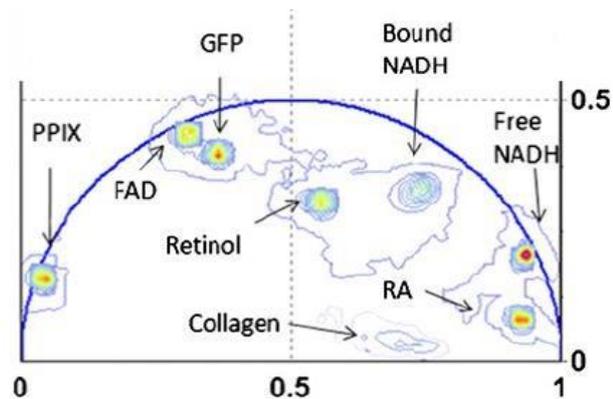


Figure V-6 : Position sur la représentation PHASOR de différents constituants fluorescents. On remarque une discrimination nette entre NADH libre dans le cytosol et lié (Stringari et al. 2011).

Cette technique graphique ne nécessite pas l'utilisation d'un algorithme itératif lourd, de déconvolution ou d'ajustement pour résoudre des structures de temps de vie complexes, ni d'un nombre de photons trop important, ce qui en fait un outil rapide et donc adapté pour l'imagerie d'un organisme vivant et donc mobile (respiration, battement du cœur), qui requiert une exécution rapide. Un autre avantage du Phasor est qu'il permet l'étude du transfert d'énergie par résonance Förster (FRET). Sur le diagramme Phasor le FRET se représente comme un glissement de la molécule inhibée vers l'inhibiteur (Leray et al. 2013).

III. Premières validations en microscopie du FLIM Phasor rapide

Une première démonstration en imagerie a été effectuée en microscopie non linéaire fibrée. Un nouveau système de mesure de temps de vie dédié (MCS6A, Fast ComTEC) est utilisé. Il présente l'avantage d'une méthode d'acquisition adaptable aux temps et nombre de pixels de notre endoscope pour un flux photonique moyen conséquent (environ 15 MHz moyen, parmi les plus élevés pour ce type de système), d'une mémoire interne conséquente (1GB), ainsi que d'une acquisition multicanaux.

Cette vitesse lui permet de travailler en parallèle de l'imagerie intensimétrique par l'accumulation dans le temps des histogrammes issus des balayages successifs. Chaque histogramme de chaque image est acquis, puis sommé aux histogrammes précédents.

Cette méthode présente l'avantage de fonctionner avec des temps d'acquisition très courts et de pouvoir tout de même acquérir suffisamment de photons pour créer une statistique exploitable. Cette implémentation du FLIM permettra, dans le futur, de travailler avec la sonde d'endomicroscopie sans devoir modifier son temps d'intégration et donc sa fréquence de résonance.

Les problèmes que j'ai identifiés précédemment ayant été résolus, nous avons utilisé cette méthode sur le banc de microscopie non linéaire du métabolisme. Ce travail est donc la convergence de l'avancée sur l'imagerie du métabolisme et du FLIM. Nous avons donc cherché à imager en temps de vie de fluorescence du NADH intracellulaire :

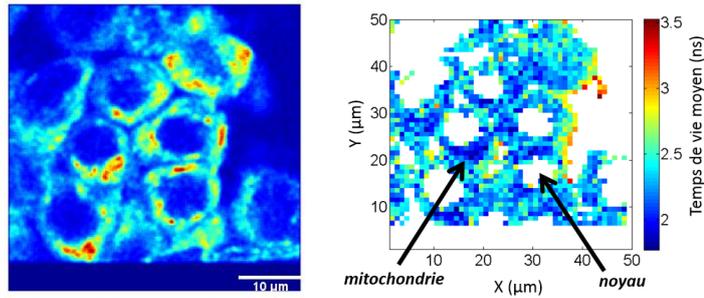


Figure V-7 : Gauche : Image Intensimétrique de cellules HT29 obtenue au microscope fibré à 1 image/sec. Droite : Image FLIM obtenue à partir 10 images intensimétriques, obtenue par binning d'une image de 200x200 px. Champ : 50x50 μm .

Des premières images sur cellules de cancer colorectal (HT29, Figure V-7) permettent de valider notre configuration en constatant des temps de vie typiques du NADH, situé dans les mitochondries préférentiellement autour des fantômes de noyaux cellulaires.

Un nombre important de photons (>100) par pixel est nécessaire pour obtenir une information pertinente. De plus chaque pixel représente la somme des courbes de temps de vie pour un carré initial de 4 pixels de côté (« binning ») ce qui réalise un compromis entre rapidité et résolution (spatiale et temporelle) de l'imagerie de temps de vie tout en permettant une imagerie d'intensité (somme des photons acquis pour chaque pixel) optimale et rapide.

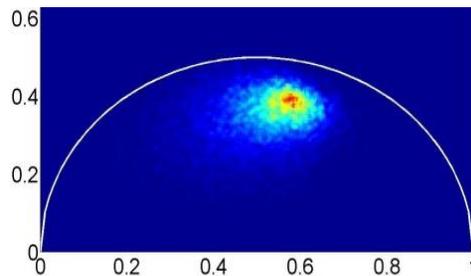


Figure V-8 : Phasor associé à l'image présentée en Figure V-7. On remarque un nuage qui correspond au NADH lié (Figure V-6)

L'étude du Phasor permet de mettre en évidence que la majorité du signal provient bien du NADH lié (Figure V-6). Nous imageons donc dans nos cellules très majoritairement la molécule d'intérêt du rapport d'oxydo-réduction optique. Cette information, en complément des variations de niveaux de fluorescence présentées au chapitre 4 valide donc les objectifs qui ont été présentés dans les premiers chapitres de la thèse.

L'implémentation du FLIM en endomicroscopie permettrait de bénéficier d'un nouveau contraste riche en information. Nous avons démontré que malgré l'influence des dispersions chromatique et intermodale, notre architecture d'endomicroscopie est adaptée aux contraintes de cette mesure.

En conclusion nous avons implémenté un système de mesure de temps de vie de fluorescence. Des résultats préliminaires ont été démontrés aussi bien en microscopie fibrée qu'en endomicroscopie. Ce travail nous a permis d'identifier les limites du système, qui ont été adressées au cours de ma thèse. Enfin la convergence de toutes les améliorations apportées au microscope fibré nous a permis d'obtenir une image FLIM de fluorescence intrinsèque du NADH, au travers de 5m de fibre optique double gaine, avec une dynamique d'imagerie FLIM élevée : 1 image/sec en 200*200 pixels.

Ce résultat nous permet de valider d'une part la pertinence des choix de l'architecture de l'instrument (rapidité, flux photonique important...) mais aussi de montrer que nous excitions bien spécifiquement le NADH lié dans les mitochondries. Ce travail doit être poursuivi en endomicroscopie ou seule des mesures ponctuelles de fluorescence intrinsèque ont pour le moment été obtenues.

Comme nous l'avons vu, cette modalité présente une bonne complémentarité avec l'imagerie du rapport d'oxydo-réduction optique et offre un degré de discrimination supplémentaire à l'imagerie intensimétrique. Ce chapitre valide donc la faisabilité d'intégrer la modalité FLIM dans le cadre d'une dans le cadre d'activités endomicroscopique cliniques.

Conclusion

Cette thèse porte sur la visualisation par fibre optique du métabolisme énergétique cellulaire. Celui-ci est connu pour permettre la détection et le suivi de diverses pathologies dont principalement le cancer mais aussi l'athérosclérose ou le diabète. Nous avons défini pour cela quels sont les signaux lumineux utiles pour cette étude, quelle est leur origine et comment ils sont traités afin de permettre une lecture du métabolisme. Plus exactement j'ai présenté une modalité de visualisation de l'évolution de la respiration cellulaire : le rapport optique d'oxydo-réduction. Nous avons par la suite vu que les systèmes d'endomicroscopie commerciaux ne se prêtent pas à cette mesure et qu'il serait particulièrement judicieux d'utiliser ce contraste en endomicroscopie non linéaire.

Cette thèse s'inscrit dans la continuité des thèses de mes prédécesseurs, Eric Suran, Mickaël Lelek, Claire Lefort, Meri Kalashyan et Guillaume Ducourthial. Ces derniers ont permis la mise au point d'un premier prototype d'EMMP restreint à l'imagerie morphologique. Mon travail a consisté à le faire évoluer afin qu'il devienne capable d'imager le métabolisme cellulaire. Cet endomicroscope se basait sur une architecture qui comprend un laser femtoseconde, suivi d'un système étireur-compresseur à fibre optique. J'ai présenté pourquoi l'architecture étireur-compresseur a été utilisée et comment elle devait évoluer. Nous avons vu que l'étireur utilisé précédemment limitait la bande spectrale accessible à 790-820 nm et l'efficacité énergétique à 30% en dehors de la longueur d'onde prévue de 800 nm. L'élaboration d'un étireur à GRISM en transmission utilisant des réseaux holographiques photo-inscrits nous a permis d'augmenter la bande passante de l'étireur de 760 nm à 860 nm, ainsi que sa transmission à 75% en double passage.

Par la suite, j'ai présenté l'architecture globale de l'endomicroscope, reprise de la thèse de Guillaume Ducourthial, et comment cette architecture a évolué pour les besoins de l'imagerie du rapport d'oxydo-réduction. On utilise désormais deux voix d'excitation distinctes à 760nm et 860 nm utilisables de manière séquentielle. Enfin j'ai contribué à perfectionner le système d'imagerie, notamment par une optimisation du programme de contrôle de la sonde qui a permis d'obtenir une vitesse d'imagerie de 25 images/s.

Afin de valider ce système nous avons procédé à des tests de visualisation du métabolisme sur culture cellulaire en endomicroscopie multiphotonique, avec une fibre endoscopique de longueur significative (supérieure à 3m). Les résultats présentés sur cellules permettent d'affirmer que nous pouvons faire la mesure du métabolisme cellulaire *in vitro* au travers de 3m de fibre endoscopique et que nous obtenons une information quantitative de ces fluorescences intrinsèques faibles. Les expériences d'imagerie du NADH *in vivo*, *in situ* sur petit animal en endomicroscopie ne nous ont cependant pas permis de confirmer ces résultats. Cet écueil est le résultat d'impondérables qui ont conduit à une utilisation largement sous-optimale du dispositif. Les expériences sur souris doivent être reconduites à l'avenir, avec un système optimisé, pour conclure définitivement sur la capacité de l'endomicroscope à suivre le métabolisme énergétique cellulaire *in vivo*, *in situ*.

Dans un second temps des pistes d'améliorations peuvent être explorées comme :

- La fabrication et l'utilisation d'une sonde utilisant une lentille GRIN (ON = 0,8). Cette sonde permettrait de collecter plus de photons issus des fluorescences du NADH et du FAD. En contrepartie elle réduirait le champ de vue et la frontale du dispositif mais, comme nous l'avons vu, une taille de champ réduite est nécessaire plus

discerner les structures internes de la cellule en endomicroscopie, et une frontale de 200 μm pourrait suffire à balayer entièrement un épithélium en profondeur.

- L'utilisation de fibre LMA, associé à la technique de nanojet photonique permettrait de réduire les effets non linéaires dans la fibre par l'augmentation de l'aire effective et donc, comme nous l'avons vu, d'obtenir pour de fortes puissances des durées d'impulsions plus courtes
- Cette technique s'accompagnerait du développement de GRISMs moins dispersif qui permettraient de réduire l'influence de l'ordre 4 et d'obtenir des durées d'impulsions plus courtes
- L'implémentation du FLIM en endoscopie. Ce travail est en cours et mené par C. H. Hage au laboratoire. Nous avons vu dans le chapitre 5 quel en est l'intérêt et pourquoi cette mesure est contraignante. Utilisée avec les lentilles GRIN pour augmenter les flux de photons collectés et en parallèle de l'imagerie intensimétrique, cette mesure permettrait à l'endomicroscope de donner un surcroit d'information complémentaire.
- Enfin, un système de balayage axial de la sonde serait un ajout important dans le cadre d'une activité clinique, où les besoins de tomographie peuvent survenir. Compte tenu de la résolution axiale de l'appareil (10 μm) celle-ci n'est possible à l'heure actuelle qu'à l'aide d'une platine motorisée.

A moyen terme, des optimisations sur l'architecture sont possibles : on peut imaginer en particulier utiliser des fibres creuses. A l'instar de (Lombardini 2016), utiliser une fibre creuse supprime le besoin de l'architecture étireur-compresseur. Cette suppression de la première fibre et de l'étireur permettrait au système de gagner en simplicité et donc *in fine*, pour un prototype industriel, de réduire les contraintes de développement en automatisation.

A plus long terme, cet instrument pourrait être utilisé en clinique. Cette étape s'accompagne, en plus des nécessaires évolutions du prototype et du travail d'ingénierie pour la simplification de son utilisation, à des études biologiques sur différentes pathologies et différents tissus. Ces études doivent aboutir sur l'élaboration d'un atlas d'endomicroscopie à deux photons afin de faciliter l'utilisation de celui-ci par des chirurgiens et d'établir quels sont les informations et usages pertinents de cet appareil.

Références bibliographiques

- Agrawal, G.P., 2006. *Nonlinear Fiber Optics*,
- Andresen, E.R. & Monneret, S., 2013. Two-photon lensless endoscope Abstract : *Optics express*, 21(18), pp.1027–1032.
- Au, C.W.H. et al., 2009. Tyrosine kinase B receptor and BDNF expression in ovarian cancers - Effect on cell migration, angiogenesis and clinical outcome. *Cancer letters*, 281(2), pp.151–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19307055>.
- Balu, M. et al., 2013. In vivo multiphoton NADH fluorescence reveals depth-dependent keratinocyte metabolism in human skin. *Biophysical journal*, 104(1), pp.258–67. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3540245&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 6, 2015].
- Bao, H. et al., 2008. Fast handheld two-photon fluorescence microendoscope with a 475 m Å 475 m field of view for in vivo imaging. , 33(12), pp.1333–1335.
- Bao, H. et al., 2010. Nonlinear endomicroscopy using a double-clad fiber coupler. *Optics letters*, 35(7), pp.995–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20364195>.
- Berezin, M.M.Y. & Achilefu, S., 2011. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. *Chemical Reviews*, 110(5), pp.2641–2684. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/cr900343z>.
- Boyd, R.W., 2003. *Nonlinear optics*,
- Brown, C.M. et al., 2012. In vivo imaging of unstained tissues using a compact and flexible multiphoton microendoscope. *Journal of biomedical optics*, 17(4), p.040505. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3382343&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 6, 2015].
- Campbell, N., 2012. *Biologie*,
- Chance B Estabrook R Ghosht A, 1964. DAMPED SINUSOIDAL OSCILLATIONS OF CYTOPLASMIC REDUCED PYRIDINE NUCLEOTIDE IN YEAST CELLS. *PNAS*, pp.1244–1251.
- Combs, C.A. & Balaban, R.S., 2001. Direct Imaging of Dehydrogenase Activity within Living Cells Using Enzyme-Dependent Fluorescence Recovery after Photobleaching (ED-FRAP). *Biophysical Journal*, 80(4), pp.2018–2028. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76172-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76172-3).
- Cregan, R.F., 1999. Single-Mode Photonic Band Gap Guidance of Light in Air. *Science*, 285(5433), pp.1537–1539. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.285.5433.1537>.
- Debord, B. et al., 2016. Guiding Hollow - Core Photonic Crystal Fibers With a Single Ring of Tubular Lattice Cladding. *arXiv*. Available at: <https://arxiv.org/abs/1610.01513>.

- Denk, W. et al., 1990. Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy. *Science*, 248(4951), pp.73–76.
- Ducourthial, G. et al., 2015. Development of a real-time flexible multiphoton microendoscope for label-free imaging in a live animal. *Scientific reports*, 5, p.18303. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4682136&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ducourthial, G., 2014. *Développement d'un endomicroscope multiphotonique compact et flexible pour l'imagerie in vivo haute résolution de tissus biologiques non marqués*.
- Fatakawala, H. et al., 2013. Multimodal in vivo imaging of oral cancer using fluorescence lifetime, photoacoustic and ultrasound techniques. *Biomedical optics express*, 4(9), pp.1724–41. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3771843&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 21, 2014].
- Ferrand, P. et al., 2008. Direct imaging of photonic nanojets. *Optics Express*, 16(10), p.6930. Available at: <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=oe-16-10-6930>.
- Flusberg, B. a et al., 2005. Fiber-optic fluorescence imaging. *Nature methods*, 2(12), pp.941–50. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2849801&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 14, 2014].
- Forget, N., Crozatier, V. & Tournois, P., 2012. Transmission Bragg-grating grisms for pulse compression. *Applied Physics B: Lasers and Optics*, 109(1), pp.121–125.
- Fu, L. et al., 2006. Nonlinear optical endoscopy based on a double-clad photonic crystal fiber and a MEMS mirror. , 14(3), pp.1027–1032.
- Fu, L. & Gu, M., 2007. Fibre-optic nonlinear optical microscopy and endoscopy. , 226(January), pp.195–206.
- Fujimoto, J.G., 1991. Optical Coherence Tomography. *Science*, 254(5035), pp.1178–1181.
- Garrett, C.G.B., Laboratories, B.T. & Hill, M., 1961. Two-Photon Excitation in CaF₂: Eu²⁺. *Phys. Rev. Lett.*, 7(6), pp.229–232.
- Georgakoudi, I. & Quinn, K.P., 2012. Optical Imaging Using Endogenous Contrast to Assess Metabolic State.
- Gorpas, D. et al., 2016. Real-Time Visualization of Tissue Surface Fluorescence Lifetime Measurements. , 35(8), pp.1802–1811.
- Gu, M., Bao, H. & Kang, H., 2014. Fibre-optical microendoscopy. *Journal of microscopy*, 254(1), pp.13–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24593142> [Accessed December 31, 2014].
- Hamidi, E. et al., 2016. Clinical Characterization of Coronary Atherosclerosis With Dual-Modality OCT and Near-Infrared Auto fluorescence Imaging. , 093717, pp.1–11.

- Helmchen, F. et al., 2001. A Miniature Head-Mounted Neurotechnique Two-Photon Microscope : High-Resolution Brain Imaging in Freely Moving Animals. , 31, pp.903–912.
- Hopt, A. & Neher, E., 2001. Highly Nonlinear Photodamage in Two-Photon Fluorescence Microscopy. , 80(April), pp.2029–2036.
- Huhner, J. et al., 2015. Quantification of riboflavin, flavin mononucleotide, and flavin adenine dinucleotide in mammalian model cells by CE with LED-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, 36(4), pp.518–525.
- Huo, L. et al., 2010. Forward-viewing resonant fiber-optic scanning endoscope of appropriate scanning speed for 3D OCT imaging. *Optics express*, 18(14), pp.14375–84. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3408911&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Jung, K. et al., 2013. Endoscopic time-lapse imaging of immune cells in infarcted mouse hearts. *Circulation Research*, 112(6), pp.891–899.
- Kalashyan, M., 2012. *Novel nonlinear optic methods for signal processing and delivery on femtosecond timescale*.
- Kalashyan, M. et al., 2012. Ultrashort pulse fiber delivery with optimized dispersion control by reflection gratings at 800 nm. *Optics Express*, 20(23), pp.25624–25635. Available at:
<http://www.opticsexpress.org/abstract.cfm?URI=oe-20-23-25624>.
- Knorr, F. et al., 2012. Two-photon excited fluorescence lifetime measurements through a double-clad photonic crystal fiber for tissue micro-endoscopy. *Journal of biophotonics*, 5(1), pp.14–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22045513> [Accessed January 7, 2014].
- Krauss, N. et al., 2015. Fiber-coupled high-speed asynchronous optical sampling with sub-50 fs time resolution. *Optics express*, 23(3), pp.2145–56. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25836085>.
- Krupa, K. et al., 2017. Spatial beam self-cleaning in multimode fibres. *Nature Photonics*, 11(4), pp.237–241. Available at:
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nphoton.2017.32>.
- Kundrat, M.J. et al., 2011. High Performance Open Loop Control of Scanning with a Small Cylindrical Cantilever Beam. *Journal of sound and vibration*, 330(8), pp.1762–1771. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3045204&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 6, 2015].
- Kuznetsov, A. V et al., 1998. Functional Imaging of Mitochondria in Saponin-permeabilized Mice Muscle Fibers. , 140(5), pp.1091–1100.
- Lakowicz, J.R. et al., 1992. Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(4), pp.1271–5. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=48431&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Latour, G. et al., 2016. Correlative nonlinear optical microscopy and infrared nanoscopy reveals collagen degradation in altered parchments. *Scientific Reports*, 6(1), p.26344. Available at: <http://www.nature.com/articles/srep26344>.
- Lefort, C., 2012. *Transport d'impulsions femtosecondes par fibre optique pour des applications à la biophotonique*.
- Lelek, M., 2006. *Caractérisation d'impulsions brèves. Mise en forme temporelle et Spectrale pour une application à l'endomicroscopie bi-photonique*.
- Leray, A. et al., 2013. Spatio-Temporal Quantification of FRET in living cells by fast time-domain FLIM: a comparative study of non-fitting methods [corrected]. *PloS one*, 8(7), p.e69335. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3715500&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 6, 2015].
- Levitt, J.M. et al., 2011. Automated biochemical, morphological, and organizational assessment of precancerous changes from endogenous two-photon fluorescence images. *PloS one*, 6(9), p.e24765. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3170385&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 6, 2015].
- Liu, X. et al., 2004. Rapid-scanning forward-imaging miniature endoscope for real-time optical coherence tomography. *Optics Letters*, 29(15), p.1763. Available at: <http://www.opticsinfobase.org/abstract.cfm?URI=OL-29-15-1763>.
- Lombardini, A., 2016. *Nonlinear optical endoscopy with micro-structured photonic crystal fibers*.
- M. Goppert-Mayer, 1931. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annales der Physik*, 401(3), pp.273–294.
- Mayevsky, A. & Rogatsky, G.G., 2007. Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence : from animal models to human studies. *American Journal of Cell Physiology*, 292(2), pp.C615–C640. Available at: <http://ajpcell.physiology.org/content/292/2/C615.short>.
- Ouzounov, D.G. et al., 2013. Dual modality endomicroscope with optical zoom capability. *Biomedical optics express*, 4(9), pp.1494–503. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3771821&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 26, 2014].
- Peyrot, D. a et al., 2012. Development of a nonlinear fiber-optic spectrometer for human lung tissue exploration. *Biomedical optics express*, 3(5), pp.840–53. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3342191&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Pinet, S. et al., 2014. TrkB-containing exosomes promote the transfer of glioblastoma aggressiveness to YKL-40-inactivated glioblastoma cells. *Oncotarget*, 7(31). Available at: <http://www.oncotarget.com/abstract/10387>.
- Quinn, K.P. et al., 2012. Characterization of metabolic changes associated with the functional development of 3D engineered tissues by non-invasive, dynamic measurement of individual cell redox ratios. *Biomaterials*, 33(21), pp.5341–8. Available

at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3387752&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 6, 2015].

Quinn, K.P. et al., 2013. Quantitative metabolic imaging using endogenous fluorescence to detect stem cell differentiation. *Scientific reports*, 3, p.3432. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3851884&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 11, 2014].

Ricci, a et al., 2012. Grism compressor for carrier-envelope phase-stable millijoule-energy chirped pulse amplifier lasers featuring bulk material stretcher. *Optics letters*, 37(7), pp.1196–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22466193>.

Rice, W.L., Kaplan, D.L. & Georgakoudi, I., 2010. Two-photon microscopy for non-invasive, quantitative monitoring of stem cell differentiation. *PloS one*, 5(4), p.e10075. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2855700&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 13, 2014].

Rosen, S. et al., 2015. Focusing and Scanning through Flexible Multimode Fibers without Access to the Distal End. *arXiv preprint arXiv:1506.08586.*, pp.1–8.

Russell, P.S.J. et al., 2014. Hollow-core photonic crystal fibres for gas-based nonlinear optics. *Nature Photonics*, 8(April).

Satoh, F. et al., 2001. Autocrine expression of neurotrophins and their receptors in prostate cancer. *International Journal of Urology*, 8(7), pp.S28–S34.

Scholz, R. et al., 1969. Flavin and Pyridine Nucleotide Oxidation-Reduction Changes in Perfused Rat Liver. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 244(9), pp.2317–2324. Available at: <http://www.jbc.org/content/244/9/2317.full.pdf> [Accessed March 23, 2017].

Scholz, R., 1969. Flavin and Pyridine Perfused Rat Liver Changes in. *Journal of biological Chemistry*, 244(9), pp.2317–2324.

Seibel, E.J. et al., 2003. Microfabricated optical fiber with microlens that produces large field-of-view, video rate, optical beam scanning for microendoscopy applications I. Gannot, ed. , 4957(2003), pp.46–55. Available at: <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?articleid=891045>.

Skala, M.C. et al., 2007. In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), pp.19494–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2148317&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Steinke, J.M. & Shepherd, a P., 1988. Diffusion model of the optical absorbance of whole blood. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics and image science*, 5(6), pp.813–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3404316>.

Stringari, C. et al., 2011. Phasor approach to fluorescence lifetime microscopy distinguishes different metabolic states of germ cells in a live tissue.

- Szameit, A. et al., 2008. Image reconstruction in segmented femtosecond laser-written waveguide arrays. *Applied Physics Letters*, 93(18), pp.2006–2009.
- Udovich, J.A. et al., 2008. Spectral background and transmission characteristics of fiber optic imaging bundles. *Applied Optics*, 47(25), pp.4560–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18758526>.
- Verhoeckx, K. et al., 2015. The impact of food bioactives on health: In vitro and Ex Vivo models. *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*, pp.1–327.
- Vishwasrao, H.D. et al., 2005. Conformational dependence of intracellular NADH on metabolic state revealed by associated fluorescence anisotropy. *The Journal of biological chemistry*, 280(26), pp.25119–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15863500> [Accessed February 19, 2014].
- Warburg, O., 1956. On the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123(3191), pp.309–314.
- WILSON John, H.T., 2011. *Biologie moléculaire de la cellule (5^e Éd.)*,
- Wu, T. et al., 2009. Two-dimensional scanning realized by an asymmetry fiber cantilever driven by single piezo bender actuator for optical coherence tomography. *Optics Express*, 17(16), p.13819. Available at: <http://www.opticsinfobase.org/abstract.cfm?URI=oe-17-16-13819>.
- Wu, Y. et al., 2009. Scanning all-fiber-optic endomicroscopy system for 3D nonlinear optical imaging of biological tissues. *Optics Express*, 17(10), p.7907. Available at: <http://www.opticsinfobase.org/abstract.cfm?URI=oe-17-10-7907>.
- Wu, Y. & Li, X., 2010. Combined influences of chromatic aberration and scattering in depth-resolved two-photon fluorescence endospectroscopy. *Biomedical optics express*, 1(4), pp.1234–1243. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3018084&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Xi, J. et al., 2012. Integrated multimodal endomicroscopy platform for simultaneous en face optical coherence and two-photon fluorescence imaging. *Optics letters*, 37(3), pp.362–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3879685&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Xu, C. & Webb, W.W., 1996. Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. , 13(3), pp.481–491.
- Zhang, Y. et al., 2012. A compact fiber-optic SHG scanning endomicroscope and its application to visualize cervical remodeling during pregnancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(32), pp.12878–83. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3420182&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 6, 2015].
- Zhao, Y., Nakamura, H. & Gordon, R.J., 2010. Development of a versatile two-photon endoscope for biological imaging. *Biomedical optics express*, 1(4), pp.1159–1172. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3018080&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Zipfel, W.R., Williams, R.M. & Webb, W.W., 2003. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature biotechnology*, 21(11), pp.1369–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14595365> [Accessed July 13, 2014].

Annexes

Annexe 1. : Acquisitions diverse : Parchemin :.....	110
Annexe 2. : Acquisitions diverse : Peau :.....	111
Annexe 3. : Acquisitions diverse : Nerf :.....	112
Annexe 4. : Acquisitions diverse : Cœur fixé :.....	114

Annexe 1. : Acquisitions diverses : Parchemin :

Cadre : collaboration avec Gael Latour de l'IMNC, UMR 8165, Université Paris Sud

Objectif : obtenir des images de parchemin en génération de seconde harmonique et fluorescence à deux photons. Révéler les différences structurales entre un parchemin altéré et un parchemin préservé. Ref : (Latour et al. 2016). Les platines de microscope ne sont pas adaptées pour ce genre d'observation, le déport d'une tête de microscope par fibre est donc très pertinent dans ce cas.

Conditions d'expérimentation : Observation d'un parchemin altéré sur ses deux faces, puis du parchemin préservé sur ses deux faces. Images réalisées à 860 nm (Mira), au microscope avec un Objectif Euromex Holland 40X 0.65 inf/0 (air). Image en 500x500, dwelltime 2 μ s. Filtre SHG : FFO2 427/10. Filtre Fluo : FF01 578/105 (l'objectif à immersion utilisée habituellement ne se prête pas à ces observations).

Code couleur : Vert = SHG, rouge = 2PEF

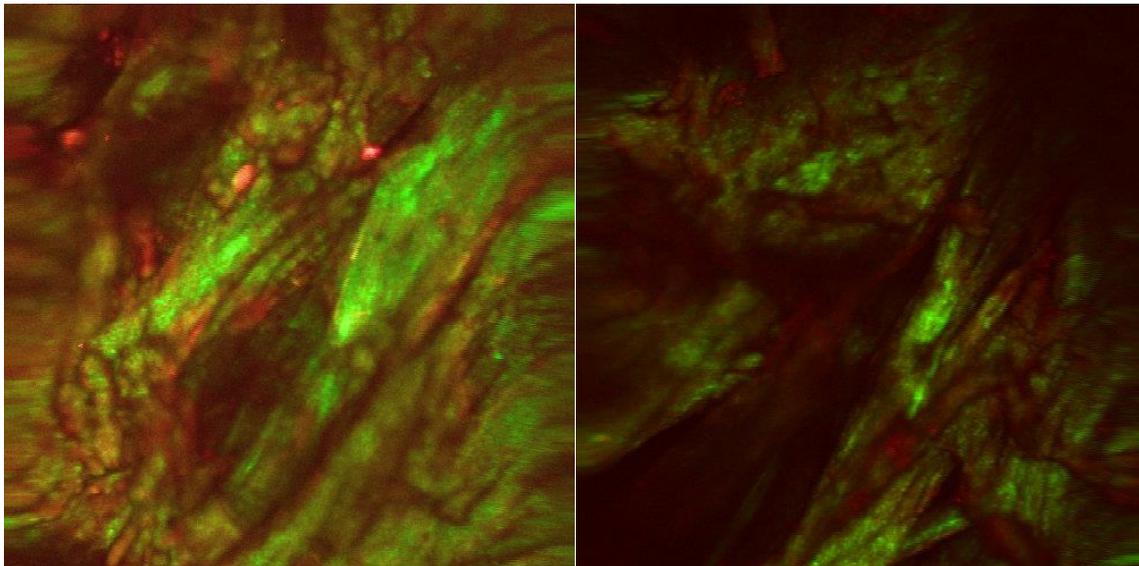


Figure V-9 : Observation de parchemin non-altéré sur sa surface externe. On note une légère altération des fibres de collagènes par la présence de fluorescence à deux photons

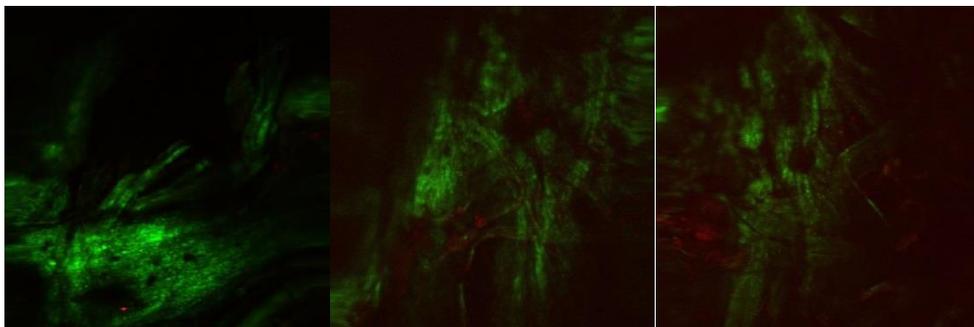


Figure V-10 : Observation de parchemin non-altéré sur sa surface interne.

Annexe 2. : Acquisitions diverses : Peau :

Cadre : collaboration avec le Pr Bédane, Dermatologiste au CHU de Limoges.

Objectif : obtenir des images de NADH et de FAD dans un tissu fraîchement prélevé de peau humaine à l'endomicroscope.

Conditions d'expérimentation : Cette observation n'a pas pu être menée à bien, L'échantillon ayant été prélevée à 11h, pour être imagé vers 1h. Le NADH et le FAD n'ont pas pu être observé dans ces conditions. On obtient donc des images de structure. (Échantillon préservé dans du PBS)

Code couleur : Vert = canal NADH, rouge = canal FAD



Figure V-11 : tissu fraîchement prélevé de peau humaine observé à l'endomicroscope observé à 760 nm (45mW). Image acquise à 16 images/sec et moyenné 10 fois.

Remarque : 1^{er} échantillon humain observé au laboratoire issu d'une activité clinique.

Annexe 3. : Acquisitions diverses : Nerf :

Cadre : collaboration avec Alexis Desmouliere.

Objectif : obtenir des images de en SHG et fluorescence à deux photon de nerf.

Conditions d'expérimentation : Observation d'un échantillon de nerf sciatique de souris dans du formol. Le nerf présente une pathologie de dépôt de collagène. L'échantillon, qui a été fixé dans du formol, est placé entier sous l'objectif de microscope multiphotonique, maintenu à l'aide de deux épingles sur son support. L'objectif étant à immersion, de l'eau est placée entre l'échantillon à nu et celui-ci. L'observation a eu lieu avec une puissance moyenne sur l'échantillon de 35mW, une durée d'impulsion de 92fs (durée autocorrélateur). Le laser a une longueur d'onde centrée autour de 810nm.

Code couleur : Vert = SHG, rouge = 2PEF



Figure V-12 : Photographie de l'échantillon de nerf sciatique

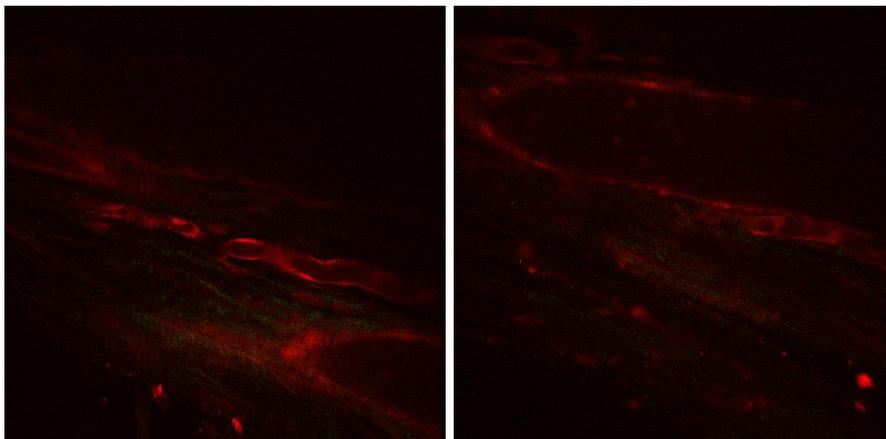


Figure V-13 : Coupe profonde du nerf. On note la présence de structure discernable sur le canal 2PEF.

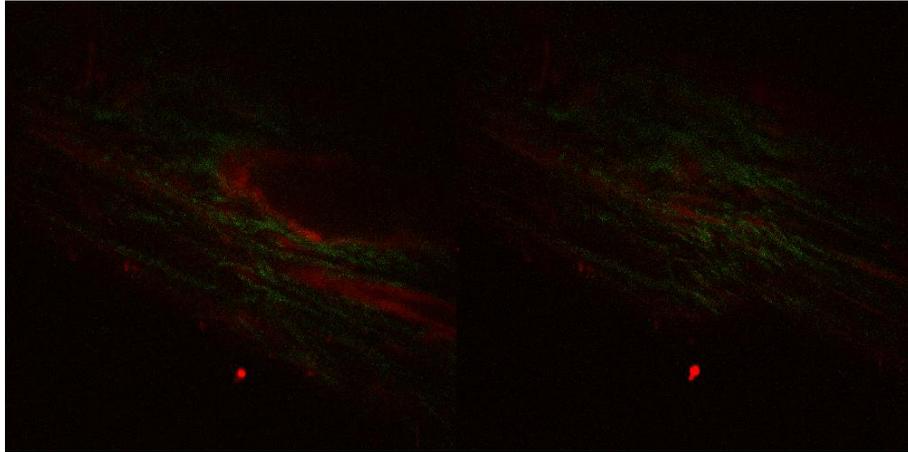


Figure V-14 : Coupe profonde du nerf. Un réseau de fibre de collagène est observable

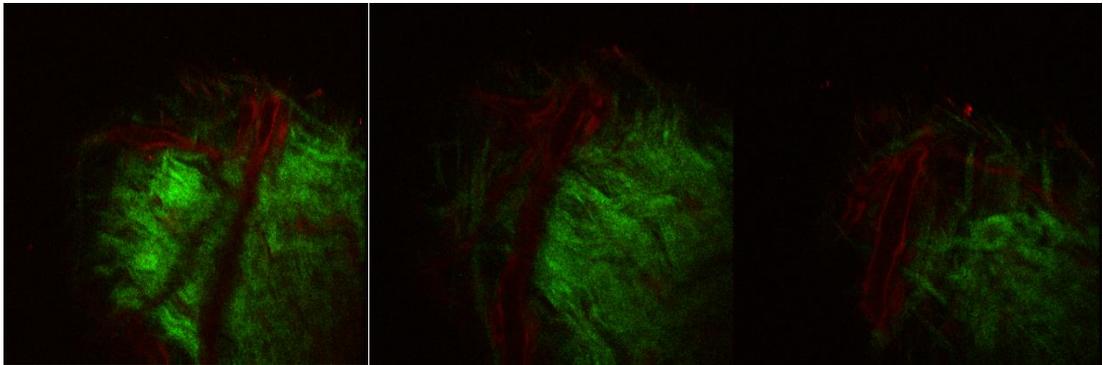


Figure V-15 : En surface du nerf, on observe une forte présence de collagène, autour d'une grosse structure tubulaire.

Remarque : l'échantillon est pollué par une substance très fluorescente, rendant le canal 2PEF très peu contrasté, car le gain a dû être réduit pour éviter d'endommager le PMT (point rouge sur les figure V-13 et V-14).

Remarque 2 : des faisceaux de myéline semblent être visibles sur ces images. Cette observation, impossible in vivo, est probablement due à l'effet du formol sur l'échantillon.

Annexe 4. : Acquisitions diverses : Cœur fixé :

Cadre : collaboration avec Christian Cognard, ImageUP, Poitiers

Objectif : obtenir des images de parchemin en génération de seconde harmonique et fluorescence à deux photons. Révéler une fibrose induite dans le tissu cardiaque.

Conditions d'expérimentation : Observation de 2 échantillons de cœur de souris dans du PFA 4% fibrosé d'épaisseur 1 à 2 mm. L'échantillon est placé entier sous l'objectif de microscope multiphotonique, maintenu à l'aide de deux épingles sur son support. L'observation a eu lieu avec une puissance moyenne sur l'échantillon de 35mW, une durée d'impulsion de 92fs (durée autocorrélateur). Le laser a une longueur d'onde centrée autour de 810nm.

Code couleur : Vert = SHG, rouge = 2PEF



Figure V-16 : Photographie de l'échantillon de cœur

Cœur 1 :

En rouge le canal 2PEF (2 photon excitation fluorescence), en vert le canal SHG (Second Harmonic Generation), signature de présence de collagène de type I qui peut être dû à de la fibrose. Il peut aussi s'agir de collagène structurel (artère, matrice extracellulaire, etc. ...).

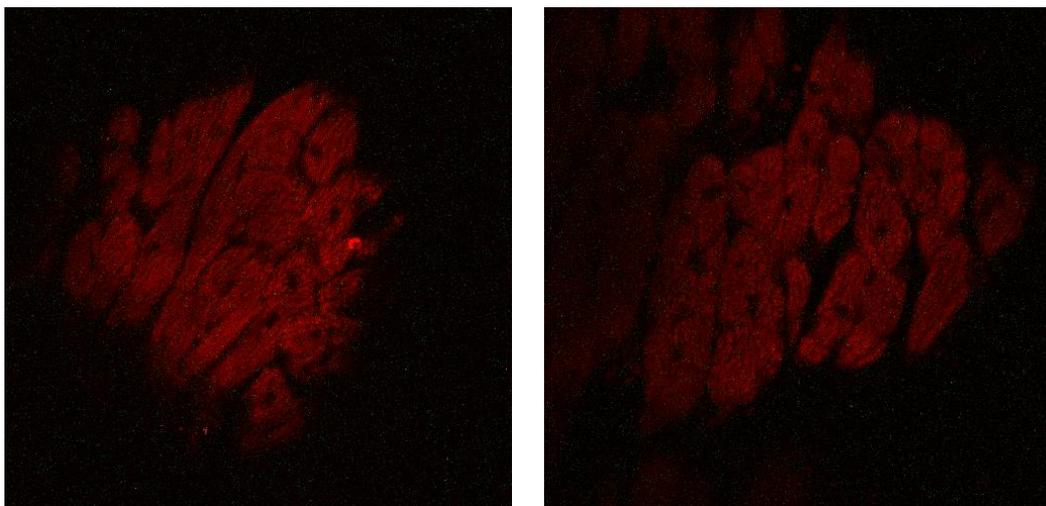


Figure V-17 : Coupe optique obtenue sur le 1^{er} cœur, taille de champs : 250 μ m

Cœur 2 :

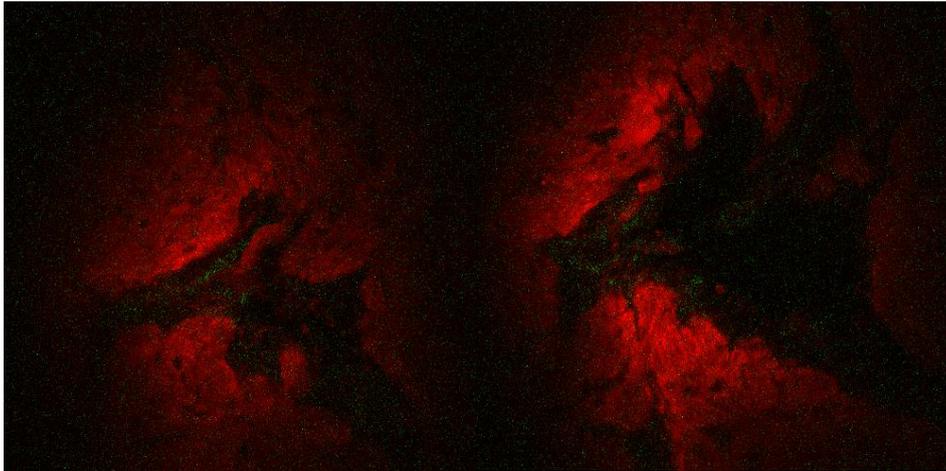


Figure V-18 : Image obtenue sur le 2nd cœur, taille de champs : 250 μ m. En vert : la SHG montrant la présence de collagène.

Le 2nd échantillon présente une faible réponse en SHG. Sans information supplémentaire sur l'échantillon il nous est difficile de déterminer la cause de cette faible réponse.

Table des illustrations

Figure I-1 : Représentation schématique d'une mitochondrie et des processus liée au NADH et FAD au cours de la respiration aérobie. Inspiré de (Quinn et al. 2012)	4
Figure I-2 : Représentation schématique des processus liée au NADH et FAD au cours de la fermentation lactique.	4
Figure I-3 : Niveau de concentration du NADH intramitochondrial en fonction de l'oxygénation des cellules. Inspiré de (Mayevsky & Rogatsky 2007).....	5
Figure I-4 : Exemple d'utilisation du ROOR pour le suivi de la différenciation de cellules souches. De gauche à droite : cellule indifférencié, cellules osseuses et cellules de tissus adipeux (Quinn et al. 2013). Ici le ratio est présenté sous la forme $[FAD]NADH + [FAD]$	6
Figure I-5. Spectre d'absorption (en pointillé) et d'émission (ligne pleine) du NADH (Bleu) et FAD (rouge).	7
Figure I-6 : Diagramme de Jablonski présentant la fluorescence par excitation à un et deux photons.	9
Figure I-7 localisation spatial de la fluorescence à deux photon (extrait de (Lelek 2006)).	9
Figure I-8 : Gauche : Section efficace de fluorescence à deux photon associé à différentes molécules fluorescente, incluant NADH et Flavines (Zipfel et al. 2003)	11
Figure I-9 : Exemple d'utilisation du rapport d'oxydo-réduction à deux photons : le suivi de cellules cancéreuses. De gauche à droite : a : cellules saines, b : cellules précancéreuse à un stade précoce, c : cellules précancéreuse à un stade avancé. De haut en bas, profondeur à l'intérieur du tissus (Skala et al. 2007).	12
Figure I-10 : Exemple d'utilisation du FLIM en réalité augmentée sur un tissus (Gorpas et al. 2016).....	15
Figure I-11 : Imagerie in vivo, sans marquage sur rein de souris. (a) souris anesthésiée sous la sonde multiphotonique (flèche rouge). (b-c) En vert SHG de la capsule rénale et fluorescence des tubules b : champs de 250 μm , c : champs de 450 μm . (d) Section optique du rein fibrotique de la souris, on observe une fluorescence jusqu'à 350-400 μm de profondeur. (Ducourthial et al. 2015)	17
Figure II-1 Effet des différents ordres de dispersion sur une impulsion. De haut en bas les effets des ordres 1 à 3.	22
Figure II-2 Schéma d'un système étireur-compresseur. La fibre endoscopique sert ici de compresseur	23
Figure II-3 Schéma de principe d'une ligne Treacy.....	24
Figure II-4 : Automodulation de la fréquence par effet Kerr en l'absence de dispersion.....	25
La solution retenue (figure II-5) tire parti de ces effets de la SPM. En amont du système étireur-compresseur on place une fibre monomode standard. Comme l'impulsion n'est pas préalablement dispersée en amont de cette fibre il se produit donc un élargissement spectral par SPM. Cet élargissement va venir compenser la compression spectrale qui a lieu plus tard dans la fibre endoscopique.....	26
Figure II-6 Etireur à GRISM en réflexion. (Extrait de (DUCOURTHIAL 2014)).....	27

Figure II-7 : Evolution normalisée par rapport au maximum de la puissance moyenne en sortie d'étireur à GRISM en réflexion. On constate que la puissance moyenne s'écroule en dehors d'une courte bande spectrale d'utilisation. Issus de (Lefort 2012).....	28
Figure II-8 : Transmission du GRISM en transmission en double passage. En bleu : Spectre en entrée de GRISM, en noir : spectre en sortie de GRISM. En rouge : la transmission des GRISM. Issue de Forget et al. 2012.	28
Figure II-9 Simulation de la propagation de l'impulsion dans un cas sans pertes et sans effets non linéaires. On voit en haut à gauche l'évolution temporelle de l'impulsion dans le système lors de la propagation. En bas on trouve l'évolution du spectre associé à cette impulsion. En haut à droite on voit un graphique représentant l'évolution LMHI de la durée de l'impulsion. On y distingue nettement les contributions de la première fibre de 0.5m suivi de l'apport de l'étireur suivi enfin par la compression temporelle dans la fibre endoscopique.	29
Figure II-10 Schéma de principe d'un étireur à GRISM en transmission.(Forget et al. 2012) 30	
Figure II-11 Transmission des réseaux holographiques IBSEN Photonics PCG-1250/800. Source : lbsen.com	31
Figure II-12 Simulation de la fibre T1628C. En rouge on peut voir les valeurs de références issues de la modélisation de la fibre à l'aide d'une méthode des éléments finis. En bleu les valeurs issus de la simulation. Le bon accord entre les mesures théorique et de l'interpolation me permet de calculer β_3 , indispensable pour dimensionner l'étireur.....	33
Figure II-13 : Profil de l'impulsion et de son spectre en sortie d'endoscope. A gauche : profil temporel en bleu et phase temporelle en vert. A droite : profil spectral associé à l'impulsion en bleu, phase spectrale en vert. Caractéristiques : durée d'impulsion LMHI $\delta t = 99.38$ fs ; $\Delta\lambda = 10$ nm ; $\delta t / \delta t_{\text{Fourier}} = 95\%$	35
Figure II-14 : Profil de l'impulsion et de son spectre en sortie d'endoscope. A gauche : profil temporel en bleu et phase temporelle en vert. A droite : profil spectral associé à l'impulsion en bleu, phase spectrale en vert. Caractéristiques : $\delta t = 37.04$ fs ; $\Delta\lambda = 60.19$ nm ; $\delta t / \delta t_{\text{Fourier}} = 43\%$	36
Figure II-15 : Profil de l'impulsion et de son spectre en sortie d'endoscope à 760 nm. A gauche : profil temporel en bleu et phase temporelle en vert. A droite : profil spectral associé à l'impulsion en bleu, phase spectrale en vert. Caractéristiques : $\delta t = 42,11$ fs ; $\Delta\lambda = 60,55$ nm ; $\delta t / \delta t_{\text{Fourier}} = 34\%$. L = 12 mm H =15.45 mm	36
Figure II-16 : Profil de l'impulsion et de son spectre en sortie d'endoscope à 860 nm. A gauche : profil temporel en bleu et phase temporelle en vert. A droite : profil spectral associé à l'impulsion en bleu, phase spectrale en vert. Caractéristiques : $\delta t = 36,18$ fs ; $\Delta\lambda = 57$ nm ; $\delta t / \delta t_{\text{Fourier}} = 53\%$. L = 44.3 mm H 41.4 mm.	37
Figure II-17 : Dimensionnement des composants constitutif des GRISMs. Les prismes sont taillés dans des blocs d'un pouce. La surface utile des réseaux est un rectangle de 20 mm par 10 mm gravé dans un substrat de 30 mm par 25,44 mm.....	37
Figure II-18 Photographies des GRISMs en transmission.	38
Figure II-19 Transmission mesurée de l'étireur à GRISM en transmission en double passage. Mesure pour des impulsions compressées en bout de 5 m de fibre endoscopique par pas de 10 nm	38

Figure II-20 : Exemple de profil temporel obtenu à 780 nm pour une puissance moyenne de 10 mW injecté dans la fibre endoscopique. On obtient une durée à l'autocorrélateur de 72 fs à mi-hauteur. Dans l'hypothèse d'un profil de la forme sech^2 on obtient une impulsion de durée à mi-hauteur réelle de 47 fs.....	39
Figure II-21 Evolution de la durée d'impulsion en sortie de l'endomicroscope en fonction de la longueur d'onde et de la puissance injectée dans la fibre endoscopique.	39
Figure II-22 : Evolution du spectre de l'impulsion à 810 nm, mesuré avec un spectromètre avaspec-2048 (avantes). En rouge et vert respectivement : spectre après la 1 ^{er} fibre puis l'étireur à GRIMs. En bleu : après la fibre endoscopique 5 mW injecté, en noir 60mW	40
Figure II-23 : Evolution de la taille du spectre mesurée en sortie de l'endomicroscope en fonction de la puissance injectée dans la fibre endoscopique à 800 nm.	40
Figure II-24 Evolution de la puissance carré sur la durée d'impulsion, qui nous sert d'image du signal non linéaire d'ordre 2 potentiels en sortie de l'endomicroscope en fonction de la longueur d'onde et de la puissance injectée dans la fibre endoscopique. La durée d'impulsion fixée pour le laser est de 120fs.	41
Figure II-25 : Profil de l'impulsion en sortie d'endoscope pour une FOD correspondant à l'étireur en reflexion. Profil temporel en bleu et phase temporelle en vert. Caractéristiques : $\delta t = 34.26$ fs ; $\Delta\lambda = 60.19$ nm ; $P = 2.712$ W ; $\delta t / \delta t_{\text{Fourier}} = 212\%$	42
Figure II-26 : Profil de l'impulsion en sortie d'endoscope pour une FOD correspondant à l'étireur en transmission. Profil temporel en bleu et phase temporelle en vert. Caractéristiques : $\delta t = 44.44$ fs ; $\Delta\lambda = 60.19$ nm ; $P = 1.754$ W ; $\delta t / \delta t_{\text{Fourier}} = 277\%$	43
Figure III-1 : Images d'alvéoles pulmonaires humaines saines fixées au PFA, réalisées au travers d'un faisceau de fibres sans optique distale (tissu en contact avec la fibre) en fluorescence à deux photons. (Issues de (DUCOURTHIAL 2014).....	46
Figure III-2 : Inhomogénéité entre les cœurs dans un guide d'image.....	46
Figure III-3 : Scanner à MEMS en sortie de fibre optique. Ce système possède deux axes de rotation qui vont permettre au faisceau d'être balayé sur l'échantillon. (Flusberg et al. 2005)	48
Figure III-4 Schéma d'une sonde de fiber scanning.....	48
Figure III-5 Fibre endoscopique T1628C.	51
Figure III-6 : Photographie de la sonde de l'EMMP.....	53
Figure III-7 : Schéma de la sonde finale encapsulée.	54
Figure III-8 : Schéma d'une céramique piézoélectrique tubulaire avec ses quatre électrodes (A,B,C,D) et la masse. (Schéma issu de (DUCOURTHIAL 2014)).....	54
Figure III-9 : Figure de balayage elliptique à la résonance de la fibre. Il existe un couplage entre les axes propres de la fibre qu'il faut corriger. (Schéma issu de (DUCOURTHIAL 2014)).....	55
Figure III-10 : Décalages entre les axes réels (en noir) et virtuels (en rouge).	56
Figure III-11 : Obtention (par surimpression sur l'image) de deux axes droits et orthogonaux à la résonance de la fibre. Ces axes sont la base du formalisme mathématique qui nous sert à contrôler la trajectoire de la sonde. (Schéma issu de (DUCOURTHIAL 2014)).....	56

Figure III-12 : Obtention d'un balayage en cercle. A : cette image correspond à une trajectoire contrôlée de cercle. Les deux axes présentent une différence d'amplitude qu'il convient de changer pour obtenir la figure b. (Schéma issu de (DUCOURTHIAL 2014)).....	56
Figure III-13 : Commande et trajectoire mesurée au PSD (Position Sensing Device) dans un cas non amorti (Schéma issu de (DUCOURTHIAL 2014)).....	57
Figure III-14 : En cas de non amortissement pour un nombre d'images par seconde important, la fibre ne revient pas au repos, et empêche de prendre des images fidèles et répétables. (Schéma issu de (DUCOURTHIAL 2014))	57
Figure III-15 : Commande (gauche) et trajectoire (droite) mesurées au PSD dans un cas amorti. La trajectoire est maîtrisée et permet d'obtenir des informations fidèles et répétables. (Schéma issu de (DUCOURTHIAL 2014)).....	58
Figure III-16 : Schéma de principe du programme utilisé. Le bloc central représente la boucle principale, qui permet d'acquérir des images de manière répété	58
Figure III-17 : Acquisition du moiré due au sous-échantillonnage numérique. A gauche, échantillonnage à 1MHz. A droite, échantillonnage à 10MHz. Images acquises pour 8 images par seconde, 250x250 pixels).	59
Figure III-18 : Comparaison entre deux images de papier à 8 images par seconde. À droite, anciennes valeurs (en 250x250 pixels imposés), à gauche nouvelles valeurs (en 500x500 pixels).....	59
Figure III-19 : Trajectoire mesurées au PSD à 25 image/seconde. La trajectoire est maîtrisée et permet d'obtenir des informations fidèles et répétables.	60
Figure III-20 : Zoom sur la trajectoire mesurée au PSD à 25 image/seconde. On remarque que 5 oscillations permettent à la fibre de retourner au repos.....	60
Figure III-21 : Image de grille en réflectance de 50 μm à 25fps et moiré associé. (Lien vers vidéo à 25 image/s sur la grille de 50μm et papier).....	60
Figure III-22 Les différentes résolutions du système. Sur ce schéma un point rouge représente la résolution optique donnée par la fonction d'étalement du foyer (ou Point Spread Function, « PSF »). L'espace entre deux points le long de la spirale représente la résolution imposée par l'échantillonnage numérique. Enfin, la fréquence de résonance associée à la taille de champ et la dynamique choisie fixent la résolution mécanique (Δr_{res_m}).	61
Figure III-23 : Différence entre fluorescence à un et deux photons après focalisation par le micro-objectif. Ces deux images ont été prises en bout de sonde endoscopique.	62
Figure III-24 : Assemblage de trois doublets achromatiques commerciaux Edmund Optics (EO) ; L1 : ref. EO #65-569 ; L2 : ref. EO #65-568 ; L3 : ref. EO #65-567 (gauche : fibre optique ; droite : échantillon). (Schéma issu de (DUCOURTHIAL 2014)).....	62
Figure III-25 Décalage théorique de la focale entre 760 et 860 nm. Entre les deux valeurs extrêmes on obtient un décalage de 1.6 μm	63
Figure III-26 Mesure des FEF à 760 nm et 860 nm à l'aide de billes fluorescentes de 0.1 μm de diamètre.	63
Figure III-27 : Chromatisme des lentilles GRIN. Issues du catalogue GRINTECH	64

Figure III-28 : Lentille GT-MO-080-018-AC900-450 de GRINTech.	64
Figure III-29 : Schéma de principe de l'endoscope multiphotonique utilisé. L1: A375TM-B Thorlabs; L2: C110TME-B Thorlabs; L3: C230TME-A Thorlabs. L4: LBF254-200-A Thorlabs L5: LBF254-0758-A Thorlabs D1: FF801-DiO2 Semrock; D2 : FF705-DiO1 Semrock; D3 : FF495-DiO3 Semrock. F1: FF02-720-SP Semrock, F2: FF02-460/80 Semrock; F3 : FF01-538/40 Semrock.	65
Figure III-30 : Schéma bloc de principe du système de balayage et d'imagerie (Schéma issu de (DUCOURTHIAL 2014))	66
Figure III-31 : tête de microscopie fibré.	52
Figure IV-1 : Observation des cellules HBL. En haut à gauche : Transmission en lumière blanche. A droite de haut en bas respectivement : Signal de fluorescence du NADH et du FAD. En bas à gauche : Colocalisation NADH/FAD. (superposition des images réalisée grâce au logiciel ImageJ).....	71
Figure IV-2 : Observation des cellules HT29. En haut à gauche : Transmission en lumière blanche. A droite de haut en bas respectivement : Signal de fluorescence du NADH et du FAD. En bas à gauche : Colocalisation NADH/FAD. (Images traitées sur ImageJ).....	72
Figure IV-3 : Cellules HBL marquées au TRME. On retrouve l'organisation des mitochondries, concentrées autour du fantôme de noyau.....	72
Figure IV-4 : Image brute obtenue de cellules HT29. La puissance moyenne incidente sur l'échantillon est de 35 mW à 760 nm.	73
Figure IV-5 : Images de NADH de cellules HT29, observé au microscope fibré à deux photons. L'excitation est de puissance moyenne 60 mW à 760 nm. Gauche champs de 250 µm, droite 50 µm. Moyenné sur 4 images.....	73
Figure IV-6 : Cellules HBL : en vert le canal correspondant au NADH, en rouge le canal correspondant au FAD, et colocalisation. L'excitation est de 25 mW à 760 nm (NADH) et de 45 mW à 860 (FAD). Champs de 150µm. Moyenne sur 10 images	74
Figure IV-7 : Cellules HT29 : en vert le canal correspondant au NADH, en rouge le canal correspondant au FAD. L'excitation est de 30 mW à 760 nm (NADH) et de 45 mW à 860 (FAD) pour 16 image/s et un champ de 250 µm et (Moyenne sur 4 images)	74
Figure IV-8 : Cellules HT29 : NADH de cellules HT29. L'excitation est de 30 mW à 760 nm pour 16 image/s et un champ de 50 µm (Moyenne sur 4 images)	75
Figure IV-9 : Cellules HT29 : en vert le canal correspondant au NADH, en rouge le canal correspondant au FAD. L'excitation est de 70 mW à 760 nm (NADH) et de 90 mW à 860 nm (FAD) pour 8 image/s et un champ de 50 µm. Images brutes.....	75
Figure IV-10 : Couplage et modification des niveaux de fluorescence du NADH et du FAD. La courbe du haut correspond au niveau de FAD et la courbe du bas le NADH. Tiré de (Kuznetsov et al. 1998).....	76
Figure IV-11 : Couplage et modification des niveaux de fluorescence du NADH et du FAD (microscopie de fluorescence classique).	77
Figure IV-12 : Modification du niveau de fluorescence du NADH à 2 photons.	77
Figure IV-13 : Modification du niveau de fluorescence du FAD à 2 photons.	78

Figure IV-14 : Image en ratio d'oxydo-réduction optique de l'image présenté en Figure IV-9. Champs de 50 μm	78
Figure IV-15 : Images au microscope fibré de cellules HEK contrôle à 48h (A) et 72h (C) et des cellules HEK transfectées après 48h (B) et 72h (D) de transfection. Excitation à 760 nm Puissance moyenne incidente de 40 mW	79
Figure IV-16 : coupe de cerveau et structures de celui-ci.	80
Figure IV-17 : Image de NADH dans le cerveau de souris. A gauche on observe les cellules gliales de l'espace sub-dural (en surface) (moyennée 4 fois). A droite des neurones observés en profondeur (sous la pie-mère repérée grâce à son collagène) (moyennée 10 fois). La profondeur de pénétration est d'environ 200 μm . Puissance moyenne incidente de 70 mW à 760 nm. Lien vidéo vers l'observation en directe de la surface du cerveau et les neurones	81
Figure IV-18 : Mort de la souris à $t = 0$. A $t = 2$ min le signal disparaît progressivement.	81
Figure IV-19 : Endommagement du tissu cardiaque sous l'effet d'une puissance trop importante lors de l'imagerie. Le cercle rouge permet d'identifier la zone qui a été endommagé par L'EMMP	82
Figure IV-20 : Partie distale du dispositif de diminution des mouvements parasites par succion.....	82
Figure IV-21 : La souris observée grâce à L' EMMP. On voit la souris anesthésiée placé sur un tapis chauffant. La cage thoracique a été ouverte pour pouvoir passer les différents instruments.....	83
Figure IV-22 : Image de cœur de souris de 50 μm de champ à 25 image/sec. On ne distingue rien sur cette image moyennée 5 fois.....	84
Figure IV-23 : Chronogramme du signal observé dans le cas d'une souris qui respire. De haut en bas : chronogramme, Transformée de Fourier associée et rapport entre les deux canaux de fluorescence.....	84
Figure IV-24 : Chronogramme du signal observé dans le cas de la mort d'une souris. De haut en bas : chronogramme, Transformée de Fourier associée et rapport entre les deux canaux de fluorescence.....	85
Figure V-1 : Gauche : principe de fonctionnement d'un TCSPC. Droite : histogramme donné par un TCSPC. En vert l'IRF du système de mesure (tel que mesuré par le TCSPC). En bleu l'histogramme de la coumarine et en rouge la rhodamine.....	90
Figure V-2 : Mesure de temps de vie de fluorescence sur billes fluorescents; à gauche : Image intensimétrique à 2P; à droite : Image 2P FLIM	93
Figure V-3 : Cellules U87 non marquées. En bleu ciel les noyaux cellulaire ; en rouge les mitochondrie ; en jaune-vert le cytosol ; en bleu foncé aucun fluorophores. L'absence de marquage nécessite de travailler avec peu de photons et d'avoir un déclenchement très bas (3 photons pour une colonne d'histogramme), d'où un bruit assez élevé.....	93
Figure V-4 : Mesure au centre de l'image Utilisée en supplément de l'imagerie multiphotonique; En vert : collagene (SHG, $\tau = 0.4\text{ns}$), cete mesure correspond à l'IRF du sesteme de mesure; En rouge élastine ($\tau = 2,3\text{ns}$). (Echelle de temps 1=8ps)	94

Figure V-5 : (b) Impact de la dispersion chromatique sur le temps de vie simulé pour un signal de 50 (trait plein) et 80 (tirets) nm de largeur autour de 450 nm. (c) Impact de la dispersion intermodale sur le temps de vie simulé pour une fibre d'ouverture numérique de collection de 0.2 (trait plein noir, longueur d'onde 450 nm) et de 0.24 à 400 (tirets noirs) et 500 nm (trait plein gris).....	95
Figure V-6 : Position sur la représentation PHASOR de différent constituant fluorescent. On remarque une discrimination nette entre NADH libre dans le cytosol et lié (Stringari et al. 2011).....	97
Figure V-7 : Gauche : Image Intensimétrique de cellules HT29 obtenue au microscope fibré à 1 images/sec. Droite : Image FLIM obtenue à partir 10 images intensimétrique, obtenue par binning d'une image de 200x200 px. Champ : 50x50 μ m.	98
Figure V-8 : Phasor associé à l'image présentée en Figure V-7. On remarque un nuage qui correspond au NADH liée (Figure V-6)	98
Figure V-9	Erreur ! Signet non défini.

Table des matières

Introduction	1
Chapitre I. Intérêt de l'imagerie non linéaire par fibre du métabolisme.....	2
I. Imagerie du métabolisme énergétique de la cellule par voie optique	2
1. Nature des fluorescences utiles au rapport optique d'oxydo-réduction	2
2. La respiration cellulaire	3
3. Signification physiologique du rapport d'oxydo-réduction optique.....	5
4. Fluorescence du NADH et du FAD.....	7
II. Définition et intérêt de la fluorescence à deux photons pour le rapport d'oxydo- réduction optique	8
1. Fluorescence à deux photons.....	8
2. Excitation du NADH et des FAD à deux photons.....	10
3. Application du rapport d'oxydo-réduction optique à deux photons, <i>in vivo</i>	11
III. Etat de l'art des systèmes endomicroscopiques commerciaux pour des applications cliniques.....	13
1. Endomicroscope de fluorescence.....	14
2. La microscopie confocale	15
IV. Endomicroscopie non linéaire fibré.....	16
Chapitre II. Développement d'un système de déport par fibre optique d'impulsions femtosecondes accordable.....	20
I. Problématique liée au transport d'impulsions femtosecondes par fibre optique.....	20
1. Dispersion chromatique de la fibre optique.....	20
2. Gestion de la dispersion	22
a. Fibres à dispersion annulée	22
b. Architecture étireur-compresseur	23
i. Étireur à fibre à dispersion négative	23
ii. Étireur à réseaux de diffraction de type Treacy	24
3. Non linéarité de la fibre optique	24
II. Compensation de dispersion large bande à haute efficacité énergétique à l'aide d'un étireur à GRISM.....	26
1. Compensation de dispersion jusqu'à l'ordre 3 à l'aide d'un étireur à GRISM en réflexion	26
2. Étireur à GRISM en transmission	27
3. Simulations de la propagation dans le système.....	29
a. Modélisation du système	29
b. Modélisation de l'étireur à GRISM en transmission	30
c. Modélisation de la fibre endoscopique	32
d. Simulation de la propagation d'impulsions dans l'ensemble du système.....	33
i. Spectre étroit.....	35
ii. Spectre large.....	36
4. Validation expérimentale des performances de l'étireur à GRISM en transmission	37
a. Rendement énergétique	38
b. Evolution de la durée d'impulsion en bout de fibre endoscopique	38
5. Limitations du système de compensation des effets linéaire et non linéaires.....	42
a. Dispersion d'ordre 4.....	42
b. Modulation de phase croisée.	43

Chapitre III. Adaptation de l'endomicroscope multiphotonique aux contraintes de la mesure du rapport d'oxydoréduction optique et du vivant.....	45
I. Endomicroscope non linéaire : état de l'art	45
1. Architecture des endomicroscopes non-linéaires	45
2. Système fibré à balayage proximal.....	45
3. Système fibré à balayage distal.....	47
4. Exemples de résultats en endomicroscopie multiphotonique.....	48
II. Présentation du système endoscopique utilisé.....	50
1. Excitation à deux couleurs pour l'imagerie du métabolisme cellulaire.....	50
2. Fibre endoscopique à double gaine optimisée pour l'endomicroscopie multiphotonique.....	51
3. Microscope fibré non linéaire.....	51
4. Sonde d'imagerie non linéaire	53
a. Résonateur à fibre optique.....	53
i. Mécanisme de balayage	54
ii. Contrôle du résonateur.....	55
b. Développements relatifs à l'acquisition d'une séquence d'image	57
c. Développements informatiques relatifs au contrôle de la sonde et de l'imagerie.....	58
d. Micro-optique distale de la sonde d'imagerie	61
e. Micro-optique distale alternative de la sonde d'imagerie : la lentille GRIN achromatique	64
5. Vue d'ensemble du système utilisé	65
6. Premières validations des systèmes expérimentaux sur cible biologiques	66
Chapitre IV. Validations du rapport d'oxydo-réduction optique sur modèles biologiques.....	70
I. Validation sur cellules <i>in vitro</i>	70
1. Avant-propos sur la nécessité d'imager sur des cellules en culture et méthodologie de la culture cellulaire.....	70
2. Images de fluorescence cellulaire intrinsèque	71
a. Microscopie linéaire	71
b. En microscopie non linéaire fibrée	72
c. Endomicroscopie non linéaire	74
3. Contrôle de la nature des fluorescences par des variations issues de réaction métabolique.....	75
4. Mise en évidence de la capacité du microscope fibré à distinguer entre un phénotype sain et cancéreux au sein d'un tissu.	78
II. Validation sur animal <i>in vivo, in situ</i>	80
1. En microscopie fibrée à deux photons.....	80
2. En endomicroscopie non linéaire.....	81
Chapitre V. Imagerie non linéaire fibrée résolue en temps de vie du métabolisme	89
I. Intérêt de l'imagerie de fluorescence résolue en temps de vie du métabolisme cellulaire	89
1. Avant-propos : sur les limitations de l'imagerie d'intensité	89
2. Définition de la microscopie par mesure du temps de vie de fluorescence	90
II. Résultat préliminaire de mesure du temps de vie par fibre optique	91
1. Imagerie du temps de vie en microscopie fibrée.....	91
a. Mesure ponctuelle	91
b. Imagerie de temps de vie de fluorescence au microscope multiphotonique fibré.....	92

c. Mesure de temps de vie à l'endomicroscope	94
2. Viabilité de la mesure résolue en temps de vie par fibre optique à double gaine	95
3. Implémentation d'un modèle de traitement et représentation de l'information issus de la mesure de temps de vie de fluorescence.....	96
III. Premières validations en microscopie du FLIM Phasor rapide	97
Conclusion	100
Références bibliographiques	102
Annexes	109

Développement d'un endomicroscope multiphotonique à deux couleurs pour l'imagerie du métabolisme énergétique cellulaire.

La microscopie multiphotonique est une modalité d'imagerie de pointe offrant des opportunités d'avancées remarquables en biologie mais aussi dans le domaine médical. Afin d'en exploiter pleinement le formidable potentiel au cœur même de la pratique clinique, le développement de nombreuses sondes miniaturisées à fibre optique pour l'endomicroscopie multiphotonique (EMMP) a eu lieu depuis de nombreuses années et dans de nombreux laboratoires français et étrangers. Il s'est pour l'instant confronté à des limitations majeures comme l'impossibilité de recueillir les signaux d'auto-fluorescence des tissus qui sont intrinsèquement faibles comme ceux venant des co-enzymes métaboliques NADH et FAD. Cette limitation compromet l'utilité de l'EMMP en la restreignant à une imagerie morphologique requérant un marquage exogène des tissus. Ce manuscrit présente une architecture d'EMMP permettant de dépasser cette limitation, capable de proposer une imagerie fonctionnelle du métabolisme cellulaire en temps réel, *in vivo*, *in situ*, sans marquage.

Le prototype d'EMMP proposé est une amélioration du précédent, où les Grisms en réflexions sont remplacés par des Grisms en transmission, permettant d'élargir la bande spectrale d'utilisation et la transmission du système. Ce prototype voit aussi l'adjonction d'un second laser excitateur afin d'accéder aux fluorescences du NADH et du FAD

Les résultats démontrent capable que nous sommes à même d'imager les fluorescences cellulaires intrinsèques au travers de 5 mètres de fibre optique avec une résolution subcellulaire. Parmi celles-ci nous sommes capables d'exciter et de collecter spécifiquement les fluorescences du NADH et du FAD. Enfin nous détectons assez de photons pour disposer d'informations quantitatives et donc de proposer une image du rapport d'oxydo-réduction optique en endomicroscopie.

Mots-clés : Endomicroscopie multiphotonique, mis en forme d'impulsions femtosecondes, imagerie endoscopique de fluorescences intrinsèques, Mesures du métabolisme énergétique cellulaire, mesure du rapport d'oxydo-réduction optique, Biopsie optique fibrée

LABEL- FREE *IN VIVO* *IN SITU* DIAGNOSTIC IMAGING BY CELLULAR METABOLISM QUANTIFICATION WITH A FLEXIBLE MULTIPHOTON ENDOMICROSCOPE

Nonlinear microscopy is a cutting edge imaging modality leading to remarkable step forward in biology but also in the clinical field. To use it at its full potential and at the very heart of clinical practice, there has been several development of fiber-based micro-endoscope. The application for those probes is now limited by few major restrictions, such as the impossibility to collect auto-fluorescence signal from tissues these being inherently weak such as the fluorescence from NADH or FAD. This limitation reduces the usefulness of the micro-endoscope effectively restraining it to morphological imaging modality requiring staining of the tissue. Our aim is to go beyond this limitation, showing cellular metabolism monitoring, in real time, without any staining.

The experimental setup is an upgrade of our precedent one where the reflection-based Grism stretcher is replaced with a new generation transmission-based Grism stretcher. Another Laser was also added in order to tune the first laser at 860nm to allow FAD imaging and the second one to 760nm for NADH.

The results prove that we assess and image the level of NADH and FAD at subcellular resolution through a five-meter-long fiber. Thus we demonstrate that we are capable of measuring the optical redox ratio in a micro-endoscopic configuration

Keywords : multi-photon microendoscopy, femtosecond pulse shaping, endogenous fluorescence endoscopic imaging, cellular energetic metabolism readout, optical redox ratio quantification, fiber-based optical biopsy.

