

NON INVASIVE SECOND HARMONIC GENERATION (SHG) IN MACROSCOPY AS BIO-DIAGNOSIS
TO IMAGE COLLAGEN NETWORK ORGANIZATION IN EXTRACELLULAR MATRIX
DUMAS Dominique, HUPONT Sébastien, MAGDALOU Jacques, STOLTZ Jean-François

CNRS - UMR 7561 et FR3209. PlateForme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire
PTIBC-IBISA, Nancy-Université, Faculté de Médecine, 54505
Vandœuvre-lès-Nancy cedex – France

Address for correspondence: dominique.dumas@medecine.uhp-nancy.fr

In this work, we have considered a new multimodality imaging for macroscopy based on Second Harmonic Generation (SHG) method to monitor invasiveness some structural information on the state of the matrix collagen. As the triple helicoidally structure of collagen molecules appears as not centrosymmetric, very organized and spatially oriented, collagen fibrils give rise to a very strong SHG signal and can be imaged without any exogenous dye. To integrate a multidimensional scale with a large field of view (non-sliced samples), we have adapted and validated an instrumental coupling between a two photon excitation laser and a microscope to collect cartography of SHG signal. We introduced an index (F-SHG) based on decay time response measured by TCSPC for respectively Fluorescence (F) and Second Harmonic Generation (SHG) values. For various sample where protein collagen is the major component of extracellular matrix (vessel, skin, carotide vessel, rat femoral head cartilage, mouse tumor, human wharton's jelly and rat tendon) or not (nacre), we compared the index distribution (from 2 to 12) obtained with MacroSHG. In this work, we showed for the first time that multiscale large field imaging (Macroscopy) combined to Multimodality approaches (SHG-TCSPC) could be an innovative and non invasive technique to detect and identify some biological interest molecules (collagen) in biomedical topics.

CONSTRUCTION D'IMAGES PANORAMIQUES CYSTOSCOPIQUES POUR FACILITER LE DIAGNOSTIC ET LE SUIVI DU CANCER DE LA VESSIE

DAUL Christian, BLONDEL Walter, WOLF Didier

Centre de Recherche en Automatique de Nancy, ENSEM, INPL

2 avenue de la Forêt de Haye, 54516 Vandœuvre-Lès-Nancy

Résumé

La cystoscopie en lumière blanche est l'examen de référence pour la détection et le suivi des lésions épithéliales situées sur les parois internes de la vessie. Cependant, cet examen endoscopique ne présente pas que des avantages. En effet, chaque image de la vidéo-séquence ne couvre que quelques centimètres carrés de la paroi interne, alors que les lésions multifocales s'étalent "sur des grandes surfaces". Le clinicien (urologue ou chirurgien) ne perçoit donc pas à un instant donné l'ensemble d'une région d'intérêt (comprenant la lésion et des repères anatomiques). La reconstruction mentale à effectuer par le clinicien complique le diagnostic. Par ailleurs, le suivi de l'évolution d'une lésion est effectué à partir d'examens réalisés à quelques semaines d'intervalles. Comparer des vidéo-séquences est très fastidieux, voire même impossible si deux examens n'ont été pas été effectués par le même clinicien.

Une solution qui permet de faciliter le suivi et le diagnostic réside dans la construction d'images à larges champs de vue qui visualisent l'ensemble de la région d'intérêt. De telles images panoramiques peuvent être construites à l'aide de d'algorithmes de mosaïquage (ou de cartographie) utilisant les vidéo-séquences. Cette contribution présente le principe et le potentiel de ces méthodes de traitement des images. Les images panoramiques sont obtenues en recalant les paires d'images successives d'une vidéo-séquence et en utilisant les transformations géométriques ainsi calculées en plaçant toutes les données dans un repère commun. Des résultats obtenus pour des fantômes très réalistes et des vessies humaines (vidéo-séquences fournies par cliniciens du centre de lutte contre le cancer de Nancy -Centre Alexis Vautrin- associés à ce travail) illustrent l'apport du mosaïquage d'image dans le domaine de la cystoscopie.

CONSTRUCTION D'IMAGES PANORAMIQUES CYSTOSCOPIQUES POUR FACILITER LE DIAGNOSTIC ET LE SUIVI DU CANCER DE LA VESSIE

DAUL Christian, BLONDEL Walter, WOLF Didier

Centre de Recherche en Automatique de Nancy, ENSEM, INPL

2 avenue de la Forêt de Haye, 54516 Vandœuvre-Lès-Nancy

Abstract

White light cystoscopy is the standard examination for the detection and follow-up of epithelial lesions located on the internal bladder wall. However, this endoscopic examination has also some drawbacks. Each image of a video-sequence covers only some square centimeters whereas multifocal lesions are spread over "large areas". Consequently, clinicians (urologists or surgeons) cannot see at one go both the whole lesion and anatomical landmarks. The mental region of interest reconstruction to be done by the clinician does not facilitate the diagnosis. Moreover, the assessment of the lesion evolution is performed with the data of examinations scheduled at some week intervals. Comparing video-sequences is very tedious or even impossible when the data were not acquired by the same clinician.

One solution facilitating diagnosis and follow-up is to build large field of view images visualizing the whole region of interest. Such panoramic images can be built with mosaicing (or cartography) algorithms taking the videos as input. This contribution presents the principle and the potential of these image processing technics. Panoramic images are obtained by registering consecutive image pairs of a video sequence and by using the computed geometrical transformations to place the whole data in a unique coordinate system. Results obtained for very realistic phantoms and for human bladders (sequences were provided by the clinicians of the cancer department associated to this work) shows the interest of image mosaicing in the field of cystoscopy.

MESURE QUANTITATIVE DE LA VASCULARISATION TUMORALE EN VIDEOMICROSCOPIE CONFOCALE FIBREE ET CORRELATION AVEC LES RESULTATS HISTOLOGIQUES : ETUDE SUR DES TUMEURS DU SEIN IMPLANTEES CHEZ LA SOURIS

Fitoussi Victor, Chamming's Foucauld, Fournier Laure, Pidial Laetitia, Clément Olivier et Cuenod Charles-André

Laboratoire de Recherche en Imagerie (LRI)
Paris-Centre de Recherche Cardiovasculaire (PARCC)
INSERM UMR970 56, rue Leblanc 75015, Paris, France

Objectifs : Le but de cette étude est d'analyser quantitativement les paramètres microvasculaires tumoraux en utilisant une technique de videomicroscopie confocale de fluorescence et de comparer ces résultats avec l'histologie.

Matériel et Méthodes : Nous avons étudié le réseau vasculaire périphérique d'une tumeur humaine (carcinome canalaire infiltrant) implantée en sous-cutanée chez 16 souris et utilisant une technique de videomicroscopie confocale fibrée (Cellvizio, Maunakea Technology), après injection d'un agent de contraste (FITC-Dextran, 500 kDa).

La morphologie, les diamètres et tailles des capillaires tumoraux ont été mesuré dans les quatre quadrants de la tumeur (en haut à droite, en haut à gauche, en bas à droite, en bas à droite) avec le logiciel de reconstruction.

L'histologie a été réalisée pour toutes les tumeurs avec immunomarquage utilisant un anticorps CD31 de souris pour colorer les vaisseaux. La densité microvasculaire a été mesurée sur des lames histologiques selon la technique du Chalkley count. La corrélation entre la taille tumorale, la videomicroscopie et l'histologie a été mesurée en utilisant un test de corrélation de Spearman.

Résultats : L'agent de contraste macromoléculaire est resté dans les capillaires. Aucune fuite n'a été observée avec cet agent. La densité capillaire fonctionnelle mesurée par videomicroscopie de fluorescence et la densité microvasculaire mesurée en histologie montrent une croissance en fonction de la taille tumorale (respectivement $r=0.72$, $p=0.002$ and $r=0.78$, $p=0.001$). Une bonne corrélation entre ces deux paramètres est à noter ($r=0,72$ et $p=0,005$).

La vidéomicroscopie de fluorescence peut permettre de caractériser et de quantifier la microvascularisation tumorale, dont la densité augmente en fonction de la croissance tumorale. Les paramètres mesurés ont montré une bonne corrélation avec la densité microvasculaire mesurée en histologie.

Quantitative measure of tumor vasculature in fibered confocal videomicroscopy and correlation with the pathology: Study on breast tumors implanted in mice

MESURE QUANTITATIVE DE LA VASCULARISATION TUMORALE EN VIDEOMICROSCOPIE CONFOCALE FIBREE ET CORRELATION AVEC LES RESULTATS HISTOLOGIQUES : ETUDE SUR DES TUMEURS DU SEIN IMPLANTEES CHEZ LA SOURIS

Fitoussi Victor, Chamming's Foucauld, Fournier Laure, Pidial Laetitia, Clément Olivier and Cuenod Charles-André

Laboratory Research Imaging
Paris Cardiovascular Research Center
INSERM U970 56, rue Leblanc 75015, Paris, France

Objectives: The aim of this study was to quantitatively analyze tumoral microvascular networks *in vivo* microvascular parameters using with fluorescence confocal videomicroscopy and to compare those results with pathology.

Material and Methods: We studied *in vivo* the peripheral vascular network of a human infiltrative ductal carcinoma tumor implanted subcutaneously in 16 mice using a fibered confocal fluorescence videomicroscopy system (Cellvizio, Maunakea Technology), after injection of an intravascular contrast agent FITC-Dextran (500 kDa).

Morphology, diameters and sizes of the tumor capillaries were measured in the four quadrants of the tumors (right upper, left upper, right lower and left lower quadrants) with the built-in software. Pathology was performed for all the tumors, with immunostaining, using a mouse CD31 antibody to stain the vessels. Microvascular density was measured on pathological slides according to the 'Chalkley count' technique. Correlation between tumor size, videomicroscopy and pathology was measured using a Spearman correlation test.

Results: The macromolecular contrast agent clearly underlined the capillaries, and no leakage was observed. Both the functional capillary density measured by fluorescence videomicroscopy and the microvascular density measured by pathology increased as a function of tumor size (respectively $r=0.72$, $p=0.002$ and $r=0.78$, $p=0.001$). There was a good correlation between those two parameters ($r=0.72$, $p=0.005$).

Conclusion: *In vivo* fluorescence videomicroscopy can characterize and quantify tumor microvasculature, the density of which increases with tumor growth. Parameters measured show a good correlation microvascular density as measured by pathology.

***IN VIVO* MULTIPHOTON IMAGING OF THE CORNEA: CHARACTERIZATION OF STROMAL MICROSTRUCTURE AND OF ABNORMALITIES DUE TO DIABETES**

LATOURE Gaël¹, GUSACHENKO Ivan¹, KOWALCZUK Laura², SAVOLDELLI
Michèle³, BOURGES Jean-Louis^{3,4}, PLAMANN Karsten²,
BEHAR-COHEN Francine^{3,4} and SCHANNE-KLEIN Marie-Claire¹

- 1) *Laboratoire d'Optique et Biosciences, École Polytechnique - CNRS - INSERM, Palaiseau, France.*
- 2) *Laboratoire d'Optique Appliquée, ENSTA ParisTech - École Polytechnique – CNRS, Palaiseau, France*
- 3) *Université Paris Descartes, Hôpital Hôtel-Dieu, AP-HP, département d'ophtalmologie, Paris, France*
- 4) *INSERM UMRS 872, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France*

gael.latour@polytechnique.edu

La cornée se caractérise par des propriétés de tenue mécanique et de focalisation de la lumière. Il est donc précieux d'avoir des techniques d'imagerie tridimensionnelles avec une résolution subcellulaire comme la tomographie par cohérence optique (OCT) [1] ou la microscopie confocale. Toutefois, ces techniques souffrent de leur faible contraste et de leur manque de spécificité. Au contraire, la microscopie multiphoton (MPM) présente des signaux très spécifiques et contrastés de tissus non marqués préalablement : en particulier, la génération de second harmonique (SHG) est fortement spécifique du collagène fibrillaire, présent sous forme de lamelles dans le stroma cornéen [2]. Cette étude vise à démontrer la possibilité de réaliser de l'imagerie MPM *in vivo* et son intérêt pour l'étude de cornées pathologiques.

Un dispositif de microscopie SHG résolue en polarisation a été développé et optimisé. Cette approche permet de remonter à deux informations quantitatives : l'orientation des fibrilles de collagène et un paramètre d'anisotropie de la réponse SHG à l'échelle du volume focal [3]. Des cartographies d'orientation du collagène fibrillaire sont obtenues en transmission et nous avons pu montrer que ces orientations correspondent aux structures striées observées en imagerie. Par ailleurs, en épi-détection, seule configuration compatible avec l'imagerie *in vivo*, les signaux SHG sont spatialement homogènes excluant toute caractérisation de l'organisation du stroma. La polarimétrie sur les signaux détectés vers l'arrière permet malgré tout de déterminer les informations précédentes. En particulier, des cartographies d'orientation des lamelles de collagène peuvent être dressées sur l'épaisseur totale de la cornée. A partir de cette preuve de faisabilité, nous avons réalisé l'imagerie SHG résolue en polarimétrie *in vivo* sur des cornées des rats anesthésiés [4]. Ces résultats ouvrent la voie vers un nouvel outil de diagnostic.

En particulier, dans le cadre d'une étude sur l'influence de l'hyperglycémie sur la cornée, nous avons pu comparer l'apparition de structures anormales au niveau de la membrane de Descemet par microscopie confocale *in vivo*, microscopie multiphoton *in vivo* et microscopie électronique en transmission. Cette campagne d'imagerie corrélative nous a permis de caractériser les structures observées et, en particulier, l'imagerie SHG a permis d'identifier ces structures comme étant du collagène fibrillaire. Par ailleurs, ces structures anormales ont également été observées sur des cornées humaines provenant de donneurs diabétiques (collaboration avec la Banque Française des Yeux). La microscopie multiphoton apparaît ici comme un outil potentiel pour le diagnostic du risque de rétinopathie diabétique.

References

- [1] G. Latour, G. Georges, L. Siozade, C. Deumié, J. Conrath, L. Hoffart, *J. Biomed. Optics* **15** (5), 056006 (2010)
- [2] F. Aptel, N. Olivier, A. Deniset-Besseau, J. M. Legeais, K. Plamann, M. C. Schanne-Klein, E. Beaupaire, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 2459-2465 (2010).
- [3] I. Gusachenko, G. Latour, M.-C. Schanne-Klein, *Opt. Express* **18** (18), 19339-19352 (2010)
- [4] G. Latour, I. Gusachenko, L. Kowalczyk, I. Lamarre, M.-C. Schanne-Klein (submitted)

***IN VIVO* MULTIPHOTON IMAGING OF THE CORNEA: CHARACTERIZATION OF STROMAL MICROSTRUCTURE AND OF ABNORMALITIES DUE TO DIABETES**

LATOURL Gaël¹, GUSACHENKO Ivan¹, KOWALCZUK Laura², SAVOLDELLI
Michèle³, BOURGES Jean-Louis^{3,4}, PLAMANN Karsten²,
BEHAR-COHEN Francine^{3,4} and SCHANNE-KLEIN Marie-Claire¹

- 5) *Laboratoire d'Optique et Biosciences, École Polytechnique - CNRS - INSERM, Palaiseau, France.*
6) *Laboratoire d'Optique Appliquée, ENSTA ParisTech - École Polytechnique - CNRS, Palaiseau, France*
7) *Université Paris Descartes, Hôpital Hôtel-Dieu, AP-HP, département d'ophtalmologie, Paris, France*
8) *INSERM UMRS 872, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France*

gael.latour@polytechnique.edu

Non-invasive optical imaging methods are crucial in ophthalmology to provide information about the physiopathology of the eye. In this study, we focus on cornea that is the main focusing component of the eye. Commonly used techniques such as optical coherence tomography (OCT) [1] and confocal reflectance microscopy provide three-dimensional (3D) cell-scale information. However, as their contrast mechanism relies on spatial variations of refractive indices, they may sometimes exhibit limited contrast and specificity. Multimodal multiphoton microscopy was recently shown to be a valuable method for obtaining virtual biopsies [2]. In particular, fibrillar collagen, that composes corneal stroma, exhibits strong Second Harmonic Generation (SHG) signals in unstained corneas. This work aims at developing *in vivo* SHG microscopy.

Polarization-resolved SHG microscopy has been implemented to provide quantitative information about the collagen fibrils orientation and the anisotropy of the SHG response [3]. Orientation maps obtained from polarization-resolved trans-detected SHG signals are in good agreement with the micrometric striated features observed in the raw images. Most importantly, polarization analysis of the epi-detected SHG signals also enables to map the fibrils orientation within the collagen lamellae while epi-detected SHG images of corneal stroma are spatially homogenous and do not enable direct visualization of the fibrils orientation. Finally, *in vivo* polarization-resolved SHG was performed in rat corneas and structural organization of corneal stroma is determined using epi-detected signals [4]. It shows that this new modality opens great opportunities for biomedical studies of collagenous tissues.

We also studied hyperglycemia-induced effects in the corneas of diabetic rats by combining *in vivo* confocal reflectance microscopy, *in vivo* multiphoton microscopy and transmission electron microscopy (TEM). This correlative imaging approach showed that SHG images reveal corneal abnormalities in diabetic rats with an excellent contrast. We performed *in vivo* multiphoton imaging in anesthetized rats and successfully observed the same structures in the Descemet's membrane. It demonstrates that *in vivo* multiphoton cornea imaging could provide a diagnosis of hyperglycemia-induced corneal abnormalities.

References

- [1] G. Latour, G. Georges, L. Siozade, C. Deumié, J. Conrath, L. Hoffart, *J. Biomed. Optics* **15** (5), 056006 (2010)
[2] F. Aptel, N. Olivier, A. Deniset-Besseau, J. M. Legeais, K. Plamann, M. C. Schanne-Klein, E. Beaurepaire, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 2459-2465 (2010).
[3] I. Gusachenko, G. Latour, M.-C. Schanne-Klein, *Opt. Express* **18** (18), 19339-19352 (2010)
[4] G. Latour, I. Gusachenko, L. Kowalczyk, I. Lamarre, M.-C. Schanne-Klein (submitted)

Imagerie optique 3D des tissus par OCT plein champ : de l'ex vivo à l'in vivo

LATRIVE Anne, BOCCARA A. Claude
Institut Langevin, ESPCI, 10 rue Vauquelin 75005 Paris
LLTech, 6 place de la Madeleine, 75008 Paris

Résumé

La Tomographie de Cohérence Optique (OCT) est une technique d'imagerie optique récente, apparue dans les années 1990, qui permet de réaliser des coupes virtuelles et des images 3D des tissus biologiques. On la qualifie souvent d' « échographie optique » car elle collecte la lumière rétrodiffusée par le tissu, puis sélectionne une coupe par interférométrie à faible longueur de cohérence. Cette technique a déjà été implémentée dans des systèmes endoscopiques pour imager les tissus humains in vivo et in situ. Cependant les résolutions axiales et transversales en OCT sont typiquement de l'ordre de 5 à 30 μm ce qui ne permet pas de distinguer les microstructures ni les structures cellulaires des tissus. L'OCT plein champ est une approche particulière de l'OCT qui enregistre directement des images 2D « en face » avec une résolution typique dans les 3 dimensions de 1 μm . Ainsi les images obtenues sur les échantillons *ex vivo* sont comparables à celles obtenues par la procédure classique d'analyse histopathologique, ce qui en fait un outil intéressant pour les pathologistes. Nous avons donc voulu combiner l'intérêt d'un système endoscopique avec les performances de l'OCT plein champ.

Nous présentons un système d'imagerie cellulaire endoscopique basé sur le principe de l'OCT plein champ mais en utilisant deux interféromètres couplés. Le premier, de type Michelson, est externe à la sonde et module le spectre de la source. Le second est une cavité optique à l'extrémité distale de la sonde, formée par la réflexion à l'extrémité de la sonde et par la lumière rétrodiffusée par le tissu. Une caméra 2D détecte la superposition des deux signaux interférométriques, le signal est maximum quand les deux différences de marche sont identiques. Ainsi l'interféromètre externe permet de définir une profondeur d'imagerie au niveau de l'interféromètre distal. En scannant la différence de marche de l'interféromètre externe on réalise des coupes à la profondeur choisie et on peut reconstruire une image 3D. L'avantage de cette approche est que la sonde est entièrement passive et ne contient pas d'éléments motorisés à miniaturiser. Il n'y a ainsi pas de contraintes techniques sur sa taille et son diamètre, ce qui permet de réaliser des sondes de la taille voulue pour imager divers endroits du corps.

Notre première sonde est un assemblage de lentilles à gradient d'indice (GRIN) d'un diamètre de 2mm et longueur de 150mm. Sa résolution axiale est 1.8 μm et

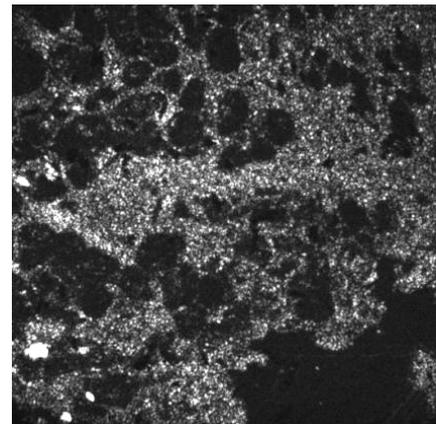


Fig. 1. Image d'un échantillon de sein humain fixé à une profondeur de 30 μm . Champ de 1mm x 1mm.

transversale $3.5\mu\text{m}$. Sa sensibilité est mesurée à -80dB à une fréquence d'affichage de 1Hz .

Nous avons d'abord imagé du tissu de sein humain, fixé, *ex vivo*. Ainsi sur la figure 1 nous pouvons voir des cellules de graisse (adipocytes) de forme ronde entourées par du tissu connectif de collagène très rétrodiffusant. Nous avons également obtenu des premiers résultats *in vivo* sur la peau humaine, lèvre et avant-bras (figure 2). Les images révèlent les grandes structures du tissu ainsi que des détails fins comme les cellules épithéliales.

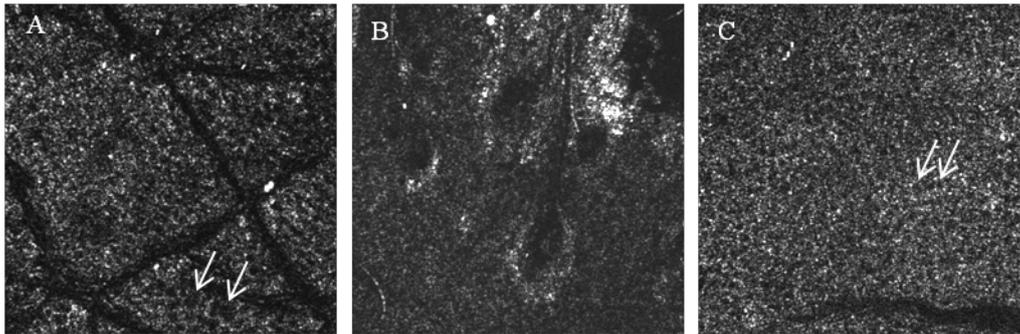


Fig. 2. Images *in vivo* de peau humaine à des profondeurs autour de $30\mu\text{m}$. Sur l'avant-bras (A) nous pouvons voir les rides de la peau et des cellules épithéliales (flèches). Sur la peau située entre le nez et la joue (B) nous pouvons voir des follicules pileux. Le tissu de la lèvre (C) révèle un réseau de cellules épithéliales (flèches). Champ $1\text{mm} \times 1\text{mm}$.

Notre système a donc prouvé sa capacité à imagier des tissus biologiques *ex vivo* et y révéler des structures fines du tissu grâce à une résolution micrométrique. Des recherches préliminaires *in vivo* ont donné des résultats prometteurs pour l'imagerie de la peau. Le design très simple de la sonde permet d'obtenir des diamètres de 1 à quelques millimètres, ce qui lui permettrait d'imager *in situ* différentes zones du corps comme la peau pour la dermatologie, mais aussi la vessie ou encore le cerveau ou le cœur pendant des opérations chirurgicales.

Ce système pourrait aussi être implémenté avec une sonde flexible composée d'un faisceau de fibres optiques afin d'imager des organes inaccessibles avec une sonde rigide. Il pourrait ainsi imagier les voies aériennes et digestives, notamment le colon et les poumons.

Imagerie optique 3D des tissus par OCT plein champ : de l'ex vivo à l'in vivo

LATRIVE Anne, BOCCARA A. Claude
Institut Langevin, ESPCI, 10 rue Vauquelin 75005 Paris
LLTech, 6 place de la Madeleine, 75008 Paris

Abstract

Since its beginning in the early nineties, Optical Coherence Tomography (OCT) has proven its interest for many biomedical fields thanks to its virtual slicing and 3D imaging capability. The adaptation of the OCT technique into endoscopic setups allows the access to a variety of areas of the human body where in-depth imaging is needed. However the typical axial and transversal resolutions of such OCT systems lie between 5 and 30 μm , which is not enough to distinguish cellular-scale structures. Full-Field OCT (FFOCT) is a particular approach of OCT that directly takes "en face" 2-D images with an isotropic resolution around 1 μm . With such a high resolution FFOCT systems can produce images that are similar to that obtained with classical histology procedures and can thus be important tools for pathology. This is why we worked on combining the interest of a setup with a needle probe with the performances of FFOCT.

Here we present an endoscopic cellular imaging system adapted from the Full-Field OCT principle. Our approach is to couple two different interferometers. A Michelson-type interferometer is placed after the light source and is used for spectral modulation. A Fizeau common-path interferometer is formed at the distal end of the probe. The probe has a fixed focalization depth within the sample, but a variable scan depth set by the processing interferometer. The advantage of this technique is that all moving parts are exterior to the entirely passive probe. Thus there are no constraints on its size and diameter, allowing designing a very simple and miniature probe.

Our first rigid probe is based on a Graded-Refractive-Index (GRIN) lens assembly with a diameter of 2 mm and a length of 150 mm. It achieves an axial resolution in tissue of 1.8 μm , a transversal resolution in tissue of 3.5 μm , and a sensitivity of -80dB for a frame rate of 1Hz.

Fixed human breast samples were imaged *ex vivo*. An example of imaging results is presented on figure 1. We can see strong backscattering connective tissue as well as adipocytes easily recognizable as black round-shaped cells.

A preliminary *in vivo* study gave promising results on human skin. We acquired images on human skin, lip and forearm of a healthy volunteer. Images taken on the lower lip are presented on figure 2. They show large-scale structures of the tissue as well as fine details such as epithelial cells.

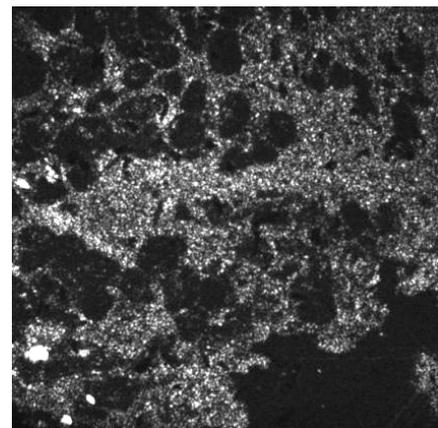


Fig. 1. En face image of fixed human breast tissue at depths of 30 μm . Field of view is 1 mm x 1 mm.

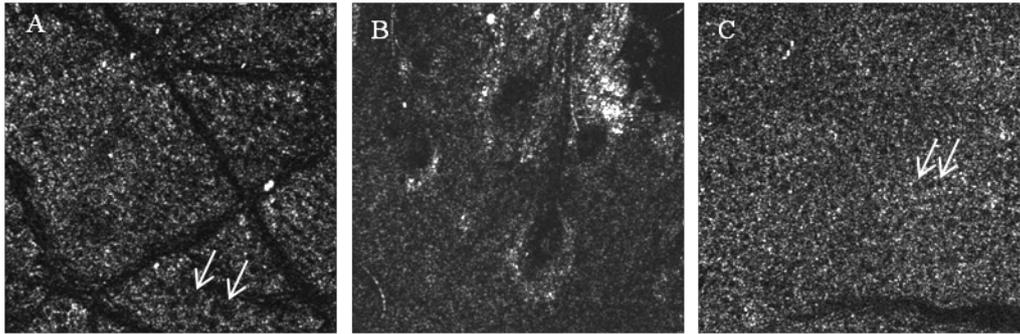


Fig. 2. En face images of *in vivo* human skin acquired at depths around 30 μm . Forearm tissue (A) exhibits wrinkles and epithelial cells (arrows). Skin tissue situated between nose and cheek (B) shows hair bulbs. External lip tissue (C) reveals a regular pattern of epithelial cells (arrows). Field of view is 1mm x 1mm.

To summarize, our setup has proven its ability to image biological tissues *ex vivo* and reveal fine tissue structures thanks to its micrometer-scale resolution. Preliminary *in vivo* experiments on skin give promising results. The design of our probe, allowing diameters ranging from less than 1 mm to a few mm, makes it suitable for *in situ* imaging of different accessible areas, such as the skin for dermatological applications, the brain and the heart during open surgery. In the mean time this system could also be implemented with a flexible probe based on a fiber bundle that would allow for imaging of areas inaccessible with the rigid probe. It could for instance be used in the aero-digestive and gastrointestinal tracts

IDENTIFICATION DE TISSU CANCEREUX PAR MESURE DE LA FLUORESCENCE ENDOGENE : SPECTROSCOPIE ET DUREE DE VIE DE FLUORESCENCE

¹B. LEH, ^{1,2}D. ABI HAIDAR, ¹A. GENOUX, ³I CHEBBI, ¹R. SIEBERT

¹*Laboratoire IMNC, UMR 8165, F-91405 Orsay Cedex*

²*Université Paris 7, F-75012 Paris*

³*SARL Nanobactérie, Chez ANBIOPhy UPMC, CNRS FRE 3207*

À nos jours, la définition de la limite de l'exérèse tumorale des gliomes malins souffre d'imprécision. Ceci influe directement sur la durée d'apparition de récurrences et par conséquent sur la durée de vie et le confort des patients. La difficulté de la discrimination tissulaire est essentiellement liée à la même apparence visuelle des tissus sains et cancéreux. Notre recherche se focalise sur cette problématique et nous avons démarré le développement d'une sonde optique, à perspective d'utilisation clinique, dédiée à la distinction de la cancérisation tissulaire par mesure de la fluorescence endogène.

Dans ce cadre, nous présenterons les résultats de mesures effectués sur des tranches tissulaires du cerveau de rats ayant préalablement subis une greffe tumorale. La fluorescence émergente des tranches maintenues en vie ou fixées a été analysée par voie spectroscopique et par mesure de la durée de vie de fluorescence. Deux longueurs d'ondes d'excitation ont été utilisées pour étudier une large panoplie de molécules endogène et pour définir un indicateur métabolique spécifique aux zones cancéreuses. La mesure de la durée de vie de fluorescence a relevé une variation dépendante de la nature du tissu étudié. La complémentarité des informations spectroscopiques et temporelles pourra être un moyen prometteur pour la détection, non invasive, de la cancérisation tissulaire.

IDENTIFICATION DE TISSU CANCEREUX PAR MESURE DE LA FLUORESCENCE ENDOGENE : SPECTROSCOPIE ET DUREE DE VIE DE FLUORESCENCE

¹B. LEH, ^{1,2}D. ABI HAIDAR, ¹A. GENOUX, ^{3,1,2}I CHEBBI, ¹R. SIEBERT

¹*Laboratoire IMNC, UMR 8165, F-91405 Orsay Cedex*

²*Université Paris 7, F-75012 Paris*

³*SARL Nanobactérie, Chez ANBIOPhy UPMC, CNRS FRE 3207*

Nowadays, defining tumorous margins during surgical resection of malignant glioma suffers from limited accuracy. This influences directly the delay of recurrence and consequently affects the patient's prognostic. The delineation of the brain tumour margins remains difficult especially since tumour and normal tissues have the same visual appearance.

Our research focuses on this problem and we started the development of an optical probe for clinical use, based on fluorescence detection. We shall present results from lifetime and spectroscopic measurements of endogenous tissue fluorescence performed on fresh and paraformaldehyde fixed rat tumour brain. Two excitation wavelengths are used to study endogenous molecules and to define a specific metabolic indicator from tumorous brain sites. The intrinsic redox ratio derived from two primary endogenous fluorophores, the reduced nicotinamide dinucleotide and oxidized flavoprotein, is studied. Fluorescence lifetime results reveal a variation dependent on the tissue nature. Fluorescence information collected simultaneously from lifetime and spectroscopic experiments appears promising for tumour tissue discrimination.

Imagerie vibrationnelle tissulaire et cellulaire: vers le développement d'un outil diagnostique en cancérologie

Olivier Piot, Pierre Jeannesson, Cyril Gobinet, Valérie Untereiner, Ganesh D. Sockalingum, Michel Manfait

MéDIAN, UMR CNRS/URCA 6237, Faculté de Pharmacie, 51 Rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France

Les spectroscopies vibrationnelles, diffusion Raman et absorption infrarouge (IR), apparaissent comme des techniques émergentes à fort potentiel en oncologie clinique, permettant d'accéder à de nouveaux biomarqueurs à visée diagnostique. Ces techniques complémentaires en termes d'informations spectrales permettent de sonder, directement sans avoir à recourir à un marquage, la composition biochimique intrinsèque d'un échantillon biologique (cellules, tissus). Ces spectroscopies vibrationnelles peuvent détecter des altérations moléculaires très fines qui sont reliées à des évolutions pathologiques.

Couplée à des systèmes d'imagerie, la spectroscopie IR peut être utilisée comme un outil de haute sensibilité pour la détection, de façon non destructive et non subjective, de foyers tumoraux au sein de coupes histologiques. En combinaison avec des méthodes statistiques multivariées de classification des données, des images colorées à fort contraste peuvent être construites ; ce qui permet de localiser avec précision des régions tissulaires d'intérêt telles que les zones tumorales ou d'autres structures tissulaires péri-tumorales normales, inflammatoires ou fibrotiques... De récents développements de la micro-imagerie spectrale infrarouge pour le diagnostic des adénocarcinomes coliques et des carcinomes cutanés seront présentés. En particulier, nous montrons l'intérêt d'un algorithme innovant de classification automatisée basée sur la logique floue (fuzzy C-means) ; cette approche permet de mettre en évidence une hétérogénéité intratumorale et la présence de zones transitionnelles entre la tumeur et les structures environnantes. Plus précisément, un front d'invasion situé à l'interface tumeur/stroma a été identifié dans le cas de carcinomes cutanés invasifs de type spinocellulaire ; de telles informations étant indétectables par histologie conventionnelle. Cette technique d'histologie spectrale apparaît très intéressante pour caractériser la progression tumorale (de carcinome aux métastases) et pour la détection précoce de l'agressivité tumorale.

Outre cette approche d'histologie spectrale, des analyses à l'échelle cellulaire peuvent être menées en utilisant la microspectroscopie Raman. Le développement de cette approche apparaît très prometteur dans le domaine de l'oncohématologie. Un exemple concernant le diagnostic précoce automatisé de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) sera donné. Cette étude a abouti à la mise en place d'une plateforme d'imagerie innovante basée sur la combinaison de différentes modalités,

détection de lymphocytes dans des frottis sanguins provenant de patients et acquisition de spectres Raman au niveau des noyaux cellulaires. Les données spectrales sont ensuite traitées par un algorithme de classification de type SVM (Support Vector Machine ou Séparateur à Vastes Marges). Les résultats préliminaires indiquent clairement que le diagnostic automatique des LLC ouvre la voie au développement en routine de la « cytopathologie spectrale ». De plus, au niveau tissulaire, de nouveaux systèmes dédiés aux mesures in vivo sont en cours de développement. De nouvelles générations de sondes Raman déportées ont été conçues pour l'analyse des tissus cutanés ; en particulier pour le diagnostic différentiel des lésions tumorales et également pour les études de perméation cutanée d'agents dermo-cosmétiques.

TISSUE AND CELL VIBRATIONAL IMAGING IN CANCER DIAGNOSTICS

Olivier Piot, Pierre Jeannesson, Cyril Gobinet, Valérie Untereiner, Ganesh D. Sockalingum, Michel Manfait

MÉDIAN, UMR CNRS/URCA 6237, Faculté de Pharmacie, 51 Rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France

Vibrational spectroscopies, Raman scattering and Infrared (IR) absorption, have recently demonstrated strong potential to provide clinically relevant diagnostic information in oncology. These label-free and complementary methods permit to directly probe the biochemical composition of tissues and cells in which they detect subtle molecular changes related to pathological situations.

Coupled with imaging systems, IR spectroscopy can be used as a very sensitive, non-destructive and non-subjective tool for the detection of tumoral nests in tissue sections. In combination with clustering techniques, color-coded images are built allowing to localize tumoral tissue as well as other surrounding tissue structures (normal, inflammatory, fibrotic...). Recent developments of IR microspectral imaging for colon adenocarcinoma and skin cancer diagnostics will be shown. Focus will be on the advantages of automated fuzzy C-means clustering that permits to highlight tumor heterogeneity and characterize the transition areas between the tumor and surrounding tissue structures, specially an invasive front at the tumor/stroma interface. Such information are not discernible by conventional histological staining. This biophotonic approach holds significant promises for probing tumor progression, from carcinoma to metastases, and may represent an attractive tool for the early detection of tumor aggressiveness.

In addition to the “spectral histology” approach, spectroscopic investigations at the cellular level can be performed using Raman microspectroscopy. Development of this approach is promising in the field of oncohematology. An example is the automated early diagnosis of chronic lymphocytic leukemia (CLL) by using an innovative imaging platform combining multimodal data. This platform combines the detection of lymphocytes in patient blood smears and acquisition of nuclear Raman spectra. These are in turn reduced to specific spectroscopic markers of leukemic cells by statistical methods and further processed by SVM (Support Vector Machine) algorithm for classification. Preliminary results clearly indicate that this approach allows to automatically diagnosing CLL, thus paving the way to the development of routine “spectral cytopathology”. Moreover, at the tissular level, new devices are being developed for in vivo measurements. These remote Raman probes are dedicated to the analysis of skin tissues, including differential diagnosis of tumoral lesions but also studies of cutaneous permeation of dermo-cosmetic agents.

TOMOGRAPHIE OPTIQUE DIFFUSE ET DE FLUORESCENCE 3D PRECLINIQUE : INSTRUMENTATION SANS CONTACT RESOLUE EN TEMPS.

NOUIZI Farouk, TORREGROSSA Murielle, CHABRIER Renée, POULET Patrick

*Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, UMR 7237 Université de
Strasbourg/CNRS, 4 rue Kirschleger, 67085 Strasbourg, France*

Résumé

La tomographie optique diffuse (TOD) est une technique en pleine évolution. Ses applications vont de la mammographie à l'imagerie fonctionnelle cérébrale et à l'imagerie préclinique. L'absorption et la diffusion de lumière étant faibles dans le proche infrarouge, il est possible d'étudier des tissus épais (plusieurs cm). Avec un modèle de propagation de la lumière, la TOD permet de construire les cartes des propriétés optiques de tissus profonds à partir de données mesurées en surface. Le principal intérêt de cette technique est sa capacité de suivre la perfusion et l'oxygénation tissulaire.

La tomographie diffuse de fluorescence (TDF) reprend les principes de la TOD pour réaliser les cartes de distribution d'agents fluorescents in vivo. La TDF est ainsi une technique d'imagerie fonctionnelle et moléculaire qui renseigne sur des processus biochimiques, génétiques ou pharmacologiques dans des modèles animaux.

Durant la dernière décennie, des progrès majeurs ont été réalisés en TOD/TDF résolue en temps. La mesure des profils temporels des photons sur la surface des objets étudiés fournit plus d'information que toute autre méthode optique et permet de construire des cartes de concentration et de temps de vie de marqueurs fluorescents.

Les images TOD/TDF obtenues avec les équipements et les algorithmes de reconstruction actuels offrent encore une mauvaise résolution spatiale et une quantification délicate. Les instruments usuels de TOD/TDF nécessitent de comprimer l'animal selon une géométrie régulière ou de l'immerger dans un liquide de couplage qui remplit l'espace entre sa surface et les sources et détecteurs de l'équipement. Si ces méthodes simplifient la modélisation de la propagation des photons, elles dégradent la résolution et le rapport signal à bruit. Une approche sans contact est de plus préférée par les utilisateurs et apparait comme la configuration idéale.

Nous présenterons des évolutions de l'instrumentation et de la reconstruction en TOD/TDF réalisées dans le but d'améliorer la qualité des images. Un tomographe optique résolu en temps a été réalisé au laboratoire. Il s'articule autour d'un dispositif à 8 diodes laser picoseconde et d'un tube photomultiplicateur à 8 anodes suivi de cartes de comptage de photons résolus en temps. Ces photons sont transportés, vers et depuis l'animal, par 16 fibres optiques. Un multiplexeur original permet le balayage simultané des sources et des détecteurs. Pour chaque position de la source, 4 faisceaux lasers sont émis séquentiellement et les signaux optiques sont collectés par 7 fibres de détection. Un espace entre fibres et détecteur permet d'insérer un filtre de fluorescence. Un système holographique a été ajouté au tomographe pour enregistrer les coordonnées de la surface de l'animal étudié. Une description détaillée et les caractéristiques de l'instrument ont été publiées [1].

Le calcul des positions des sources de lumière, des densités de photons d'excitation et de fluorescence et des profils temporels des photons collectés par les fibres détectrices sont résolus, pour la configuration expérimentale utilisée, par méthode des éléments finis. Une nouvelle méthode de reconstruction d'images TOD/TDF a été mise en œuvre. Basée sur un algorithme itératif utilisant des points spécifiques des profils temporels, cette méthode présente 2 avantages majeurs. Elle réduit le temps de calcul du problème inverse et fournit des images d'absorption de bonne qualité, y compris en présence d'hétérogénéités de diffusion [2].

Ces améliorations de la reconstruction, ajoutées à une instrumentation résolue en temps et sans contact, ouvrent la possibilité de réaliser des images TOD 3D de petits animaux. Le dispositif expérimental et la modélisation du problème direct sont prêts pour l'imagerie de fluorescence 3D. Le problème inverse requiert encore quelques progrès avant la réalisation de telles images.

[1] B. Montcel, P. Poulet, NIMA A., **569**, 2006.

[2] F. Nouzi *et al*, Optics Express, **19**, 2011.

PRECLINICAL 3D DIFFUSE AND FLUORESCENCE OPTICAL TOMOGRAPHY: NO-CONTACT, TIME-RESOLVED INSTRUMENTATION.

NOUIZI Farouk, TORREGROSSA Murielle, CHABRIER Renée, POULET Patrick

Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, UMR 7237 Université de Strasbourg/CNRS, 4 rue Kirschleger, 67085 Strasbourg, France

ABSTRACT

Diffuse Optical Tomography (DOT) is a rapidly growing field with applications ranging from human breast cancer detection and brain functional imaging, to small animals imaging. In the near-infrared spectral window, where absorption and scattering are low, it is possible to detect photons that have traveled several centimeters through biological tissues. Thus, coupled with an accurate photon migration model, DOT enables mapping of the optical properties of deep tissues from boundary measurements. The major interest of this technique is the ability to monitor oxy- and deoxy-hemoglobin concentrations.

Diffuse Fluorescent Tomography (DFT) uses the same physical principles to reconstruct the distribution maps of fluorescent contrast agents. DFT is a functional and molecular imaging technique that may provide data about biochemical, genetic or pharmacological processes on small animal models.

Over the past decade, significant progress has been achieved in time-resolved DOT/DFT. The measurement of time-dependent photon flux at the boundary of the studied object provides more information than any other optical methods and offers yield extracting the lifetime and concentration maps.

DOT/DFT images obtained with the actual equipments and reconstruction algorithms still suffer from poor spatial resolution and quantization. The usual setups for DOT/DFT need to compress the animal to a regular shape or merge it in a scattering fluid that fills the gap between its surface and the sources and detectors. This procedure simplifies the modeling of the photon migration but degrades the resolution and the signal to noise ratio. A no-contact scheme would also be preferred by end-users and appears as the ideal experimental configuration.

In this contribution, we will present the evolution of the instrumentation and the reconstruction, which was made for improve the quality of obtained images. A time-resolved optical tomography system was built in the laboratory. It allows performing no-contact DOT and DFT. It is based on an 8-channel picosecond laser diode system and an 8-anode micro-channel plate photomultiplier tube followed by time-correlated

single photon counting modules. Photons are transported to and from the animal through 16 optical fibers. A multiplexer allows the scan acquisitions. For each source position, four laser beams are sequentially emitted and optical signals are collected by 7 fibers. An air-gap between the fibers and the detector allows the insertion of an optical filter for fluorescence acquisitions. A no-contact holographic technique has been added in order to record the coordinates of the surface of the animal under investigation. A detailed description and the main characteristics of the setup can be found in ref. 1.

The computation of sources location, of excitation and fluorescence photons densities and of temporal profiles of photons collected by detections fibers, adapted to the no-contact configuration, were solved by the finite element methods. A new method for DOT/DFT image reconstruction was developed. It is based on an iterative algorithm using specific points on the temporal profiles. A first advantage of this approach consists in reducing the inverse problem resolution time. Secondly, in the presence of scattering heterogeneities, it provides images of better quality comparatively to classical methods [2].

The improvements obtained of the reconstruction step, together with a time resolved; no-contact instrumentation, should give us the opportunity to reconstruct 3D DOT images of small animals. Both the experimental setup and forward modeling are ready to perform fluorescence imaging. The inverse problem yet requires further work before producing such images.

[1] B. Montcel, P. Poulet, NIMA A., **569**, 551-556, 2006.

[2] F. Nouzi *et al*, Optics Express, **19**, 12843-12854, 2011.

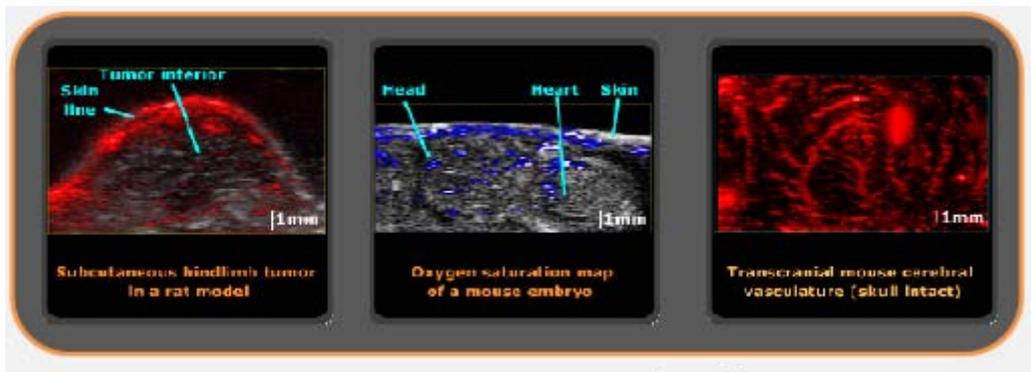
Nouvelle Bi-modalité ; l'imagerie Photo acoustique

Auteurs : Philippe Trochet

VisualSonics _ PARIS

VEVO LAZR : Premier système d'imagerie photacoustique commerciale

Découvrez comment cette nouvelle bi modalité peu vous aider dans vos recherches pre-cliniques. Cette technologie d'imagerie in Vivo combine la sensibilité de l'imagerie optique avec la résolution des ultrasons haute fréquence, ceci vous permettra de d'analyser comme aucune autre technologie les tumeurs (ex; Hypoxie), les changements hémodynamiques, de détecter les nanoparticules, ainsi qu'un grand nombre d'autres applications...



Nouvelle Bi-modalité ; l'imagerie Photo acoustique

Auteurs : Philippe Trochet

VisualSonics _ PARIS

VEVO LAZR : world's first commercially available photoacoustics imaging system,

Discover how this new cutting edge imaging modality can benefit your preclinical research. This *in vivo* imaging technology combines the sensitivity of optical imaging with the resolution of high frequency ultrasound, thereby providing never-seen-before insights into tumor microenvironment, hemodynamic changes, nano-particules detection and a wealth of other research areas.

