

# Programme et publications PSV

# Date: Mercredi, 04.07.2018

17:30 - 19:00	PO-01 J: Session posters PSV #1
Salle A14	
Date: Jeudi, 05.07.2018	
8:30 - 10:30	O5-A: Session Orale PSV #1
Amphi Fermat	
16:45 - 18:45	PO-02 J: Session poster PSV #2
Salle A14	

# **Présentations**

# PO-01 J: Session posters PSV #1

Heure: Mercredi, 04.07.2018: 17:30 - 19:00 · Salle: Salle A14

IMAGERIE 3D DE LA MICROCIRCULATION DU POISSON-ZEBRE PAR HOLOGRAPHIE NUMERIQUE

A. Brodoline, N. Rawat, D. Alexandre, M. Gross

Laboratoire Charles Coulomb, France; alexey.brodoline@umontpellier.fr

Une technique de microscopie basée sur l'holographie numérique est proposée pour l'étude de la microcirculation sanguine et du développement vasculaire chez la larve du poisson-zèbre. Des résultats récents d'imagerie 3D du flux sanguin dans les vaisseaux sont présentés.

# Imagerie corrélative multiphoton-nanoIR des états fibrillaire et dénaturé du collagène non marqué

J. Mathurin<sup>2</sup>, G. Latour<sup>3</sup>, G. Mosser<sup>4</sup>, A. Dazzi<sup>2</sup>, A. Deniset-Besseau<sup>2</sup>, <u>M.-C. Schanne-Klein<sup>1</sup></u>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Optique et Biosciences - CNRS, Ecole polytechnique, Insern, France; <sup>2</sup>Laboratoire de Chimie Physique, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, Orsay, France; <sup>3</sup>Laboratoire Imagerie et Modélisation en Neurobiologie et Cancérologie, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, Orsay, France; <sup>4</sup>Sorbonne Université, CNRS, Collège de France, Laboratoire Chimie de la Matière Condensée de Paris, LCMCP, Paris, France; <u>marie-claire.schanne-</u> <u>klein@polytechnique.edu</u>

Le collagène est caractérisé dans ses états fibrillaire et dénaturé (gélatine) par nanospectroscopie infra-rouge (IR). La corrélation de cette cartographie chimique à la microscopie multiphoton permet alors d'interpréter les divers signaux multiphoton pour développer une imagerie *in situ* sans marquage des différents états structuraux du collagène.

# IMAGERIE INTERFERENTIELLE EN REFLECTION POUR LA MATIERE MOLLE

#### D. Débarre<sup>1</sup>, D. Heather<sup>1</sup>, E. A. Nouha<sup>1</sup>, V. Siddharta<sup>1</sup>, V. Claude<sup>1</sup>, R. Ralf<sup>2,3</sup>, B. Lionel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univ. Grenoble Alpes, CNRS, LIPhy, 38000 Grenoble, France; <sup>2</sup>School of Biomedical Sciences, Faculty of Biological Sciences, School of Physics and Astronomy, Faculty of Mathematics and Physical Sciences, Astbury Centre for Structural Molecular Biology, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, UK; <sup>3</sup>CIC biomaGUNE, Paseo Miramon 182, 20014 San Sebastian, Spain; delphine.debarre@univ-grenoble-alpes.fr

La microscopie interférentielle en réflection est une technique de choix pour étudier les interactions objet/surface. Nous avons récemment montré qu'elle permettait la caractérisation précise de brosses de polymère et l'étude de l'interaction de ces brosses avec des cellules, notamment dans le contexte de la circulation sanguine.

#### **Mueller Polarimetric Imaging Optimization for Biomedical Applications**

<u>A. Lindberg</u>, C. Gennet, J. Vizet, J.-C. Vanel, A. Pierangelo Ecole polytechnique, France; arvid.lindberg@polytechnique.edu

applications and explain crucial aspects of construction and validation.

Imaging Mueller polarimetry has been shown to provide useful contrast in biomedical imaging. Promising results have spurred the development of polarimetric instruments for *in-vivo* applications. We will show several instruments destined for use in these

# O5-A: Session Orale PSV #1

*Heure:* Jeudi, 05.07.2018: 8:30 - 10:30 · *Salle:* Amphi Fermat 8:30 - 9:00

Invitée

#### Microscopie à trois photons bicolore de tissus nerveux avec une nouvelle source OPA haute cadence

L. Abdeladim<sup>1</sup>, K. Guesmi<sup>2</sup>, P. Mahou<sup>1</sup>, J. Ferrer-Ortas<sup>1</sup>, S. Tozer<sup>3</sup>, T. Kumamoto<sup>3</sup>, N. Dray<sup>4</sup>, K. Loulier<sup>3</sup>, M. Hanna<sup>2</sup>, P. Georges<sup>2</sup>, J. Livet<sup>3</sup>, W. Supatto<sup>1</sup>, F. Druon<sup>2</sup>, <u>E. Beaurepaire<sup>1</sup></u>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Optique et Biosciences, France; <sup>2</sup>Laboratoire Charles Fabry,France; <sup>3</sup>Institut de la Vision, INSERM, France; <sup>4</sup>Institut Pasteur, France; <u>emmanuel.beaurepaire@polytechnique.edu</u>

La microscopie à trois photons (3P) est une approche en émergence pour l'imagerie à grande profondeur. Nous présentons le développement d'un OPA fournissant des impulsions simultanément à 1.3 µm et 1.7 µm, et les premières images en microscopie 3P de tissu cérébral marqué avec des protéines fluorescentes vertes et rouges.

#### 9:00 - 9:30

Invitée

#### **QUANTITATIVE PHASE IMAGING FOR SUPER-RESOLUTION MICROSCOPY**

P. Bon<sup>1</sup>, J. Linarès<sup>1</sup>, L. Cognet<sup>1</sup>, S. Lévêque-Fort<sup>2</sup>, J. Wenger<sup>3</sup>

<sup>1</sup>LP2N, France; <sup>2</sup>ISMO, France; <sup>3</sup>Institut Fresnel, France; <u>pierre.bon@institutoptique.fr</u>

In optical imaging microscopy, having access not only to the intensity of the light but also to its phase grants many possibilities. I will show in this presentation that quantitative phase+intensity imaging has powerful applications in the framework of superresolution. In particular, I will demonstrate that it allows 3D super-localization of single particles. First, I will discuss the case of absorbing (gold) nanoparticles and its application for single shot-3D nanometer stabilization of a super-resolution microscope. Then I will show that the approach is also particularly efficient on fluorescent molecules since it grants the capability to get quasi-isotropic 3D super-resolution imaging deep in biological samples without any adaptive optics.

#### 9:30 - 10:00

Invitée

#### Spatio-temporal volumetric light shaping for high-resolution multicell targeting

D. Tanese<sup>1,2</sup>, N. Accanto<sup>1,2</sup>, C. Molinier<sup>1,2</sup>, E. Ronzitti<sup>1,2</sup>, Z. L. Newman<sup>3</sup>, C. Wyart<sup>4</sup>, E. Isacoff<sup>3</sup>, E. Papagiakoumou<sup>1,2,5</sup>, V. Emiliani<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Neurophotonics Laboratory, France; <sup>2</sup>Institut de la Vision, INSERM, France; <sup>3</sup>University of California, Berkeley, USA; <sup>4</sup>Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, France; <sup>5</sup>Institut national de la santé et de la recherche médicale, INSERM, France; <u>Dimitrii.Tanese@parisdescartes.fr</u>

The advent of novel molecular tools, such as light-sensitive channels and reporters, opened new ways to manipulate and control neuronal activity. Their full exploitation requires illumination approaches capable of selectively targeting multiple cells. Here we report a novel optical scheme to generate 3D illumination patterns based on the spatio-temporal modulation of a two-photon excitation beam. By multiplexing a temporally focused bi-dimensional pattern over multiple positions, we generate several tens of axially confined illumination spots in an extended volume.

# 10:00 - 10:30

Invitée

#### Breaking the acoustic diffraction limit in photoacoustic imaging with fluctuations

#### T. Chaigne<sup>1</sup>, B. Arnal<sup>2</sup>, S. Vilov<sup>2</sup>, E. Bossy<sup>2</sup>, O. Katz<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Charité Universitätsmedizin Berlin and Humboldt University, Einstein Center for Neuroscience, NeuroCure Cluster of Excellence, Berlin, Germany; <sup>2</sup>Univ. Grenoble Alpes, CNRS, LIPhy, 38000 Grenoble, France; <sup>3</sup>Department of Applied Physics, The Selim and Rachel Benin School of Computer Science & Engineering, Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem 9190401, Israel; <u>thomas.chaigne@charite.de</u>

Photoacoustic imaging recently emerged as a powerful technique to image optical absorption at a few millimeters depth inside biological tissue. Resolution is though limited by acoustic diffraction. High-frequency acoustic detectors have been engineered to increase this resolution, but due to stronger attenuation of these frequencies in tissue, resolution cannot be indefinitely increased at arbitrary depth.

Here we show that fluctuations of the photoacoustic signal can be harnessed to resolve structures below the acoustic diffraction limit.

# Breaking the acoustic diffraction limit in photoacoustic imaging with fluctuations

# Thomas Chaigne<sup>1</sup>, Bastien Arnal<sup>2</sup>, Sergey Vilov<sup>2</sup>, Emmanuel Bossy<sup>2</sup>, Ori Katz<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Charité Universitätsmedizin Berlin and Humboldt University, Einstein Center for Neuroscience, NeuroCure Cluster of Excellence, Berlin, Germany

<sup>2</sup>Univ. Grenoble Alpes, CNRS, LIPhy, 38000 Grenoble, France

<sup>3</sup> Department of Applied Physics, The Selim and Rachel Benin School of Computer Science & Engineering, Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem 9190401, Israel

#### thomas.chaigne@charite.de

#### Résumé

Photoacoustic imaging recently emerged as a powerful technique to image optical absorption at a few millimeters depth inside biological tissue. Resolution is though limited by acoustic diffraction. High-frequency acoustic detectors have been engineered to increase this resolution, but due to stronger attenuation of these frequencies in tissue, resolution cannot be indefinitely increased at arbitrary depth.

Here we show that fluctuations of the photoacoustic signal can be harnessed to resolve structures below the acoustic diffraction limit. These fluctuations can be either due to a varying illumination (as induced by a dynamic speckle illumination), or to the optical absorption itself (for instance with flowing red blood cells). By adapting concepts from super-resolution fluorescence fluctuation microscopy [1], we show that the n-th order cumulant of successive photoacoustic images of uncorrelated illumination/absorption distributions provides a  $\sqrt{n}$  resolution increase without deconvolution, as well as static background reduction [2,3]. By generalizing the statistical analysis to complex-valued signals, we demonstrated super-resolved photoacoustic images that are free from common photoacoustic imaging artifacts caused by band-limited acoustic detection. Super-resolution imaging using whole human blood and a conventional photoacoustic imaging setup was demonstrated, highlighting the potential of this technique for contrast-agent-free high resolution imaging of capillaries.

**MOTS-CLEFS :** *imagerie photoacoustique ; super-résolution* 

# Références

[1] Dertinger et al. PNAS, 106(52), 22287-22292, 2009

[2] T Chaigne et al. Optica 3(1), 54-57, 2016

[3] T Chaigne et al. Optica 4(11), 1397-1404, 2017

# MICROSCOPIE A TROIS PHOTONS BICOLORE DE TISSUS NERVEUX AVEC UNE NOUVELLE SOURCE OPA HAUTE CADENCE

# Lamiae Abdeladim<sup>1</sup>, Khmaies Guesmi<sup>2</sup>, Pierre Mahou<sup>1</sup>, Júlia Ferrer-Ortas<sup>1</sup>, Samuel Tozer<sup>3</sup>, Takuma Kumamoto<sup>3</sup>, Nicolas Dray<sup>4</sup>, Karine Loulier<sup>3</sup>, Marc Hanna<sup>2</sup>, Patrick Georges<sup>2</sup>, Jean Livet<sup>3</sup>, Willy Supatto<sup>1</sup>, Frédéric Druon<sup>2</sup>, Emmanuel Beaurepaire<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ecole Polytechnique, Laboratoire d'Optique et Biosciences, CNRS, INSERM, Palaiseau, France

<sup>2</sup> Laboratoire Charles Fabry, Institut d'Optique Graduate School, CNRS, Université Paris-Saclay, Palaiseau, France <sup>3</sup> Institut de la Vision, INSERM, UPMC, CNRS, Paris, France

<sup>4</sup> Zebrafish Neurogenetics Unit, Developmental and Stem Cell Biology Department, Institut Pasteur, CNRS, Paris, France

#### www.lob.polytechnique.fr

#### Résumé

La microscopie à trois photons (3P) est une approche en émergence pour l'imagerie à grande profondeur. Nous présentons le développement d'un OPA fournissant des impulsions simultanément à 1.3  $\mu$ m et 1.7  $\mu$ m, et les premières images en microscopie 3P de tissu cérébral marqué avec des protéines fluorescentes vertes et rouges.

# **MOTS-CLEFS :** Nonlinear microscopy; Medical and biological imaging; Infrared and far-infrared lasers; Ultrafast lasers; Tissue optics

La microscopie à deux photons est aujourd'hui établie comme la technique de référence pour l'imagerie de fluorescence à haute résolution de tissus biologiques. Cette technique permet en effet d'obtenir une résolution 3D micrométrique à des profondeurs allant jusqu'à quelques centaines de microns dans des tissus vivants ou intacts. Deux principaux axes de développement technologique de la méthode sont (i) d'augmenter la profondeur d'imagerie et (ii) de produire de l'imagerie multimodale/multiparamétrique dans des tissus complexes. L'imagerie à grande profondeur est principalement limitée par la diffusion de la lumière en milieu opaque qui induit la dégradation du confinement de l'excitation biphotonique, ce qui se traduit par une diminution de la résolution et du rapport signal sur bruit à grande profondeur. Une nouvelle approche, basée sur l'excitation à trois photons dans l'infrarouge moyen a été démontrée comme particulièrement prometteuse pour l'imagerie en profondeur [1,2]. Cependant, la plupart des questions actuelles en biologie des systèmes (neurosciences, biologie du développement, etc.) nécessitent d'utiliser des marquages de différents compartiments et/ou populations cellulaires par différents fluorophores. Un enjeu important consiste donc à développer une source laser permettant l'imagerie 3-photons bicolore. Nous présentons une nouvelle architecture de source laser [3] permettant l'imagerie 3-photons bicolore de tissu marqués par des protéines fluorescentes vertes et rouges, notamment in vivo dans le cerveau de poisson-zèbre adulte.

Deux plages spectrales dans l'infrarouge moyen ont été identifiées comme particulièrement adaptées à l'imagerie à 3 photons en profondeur car elles permettent de minimiser à la fois l'absorption et la diffusion: les fenêtres autour de 1300 nm et autour de 1700 nm. La première plage a été démontrée récemment comme bien adaptée pour exciter les fluorophores verts dérivés de la GFP, tandis que la seconde a été démontrée comme étant adaptée à l'excitation de protéines fluorescentes rouges [1,4]. Il a été démontré récemment que la microscopie à trois photons permet, lors de l'imagerie à grande profondeur de tissus densément marqués, d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit que la microscopie à deux photons [1]. Cependant, les sections efficaces d'absorption à trois photons étant très largement inférieures aux sections efficaces d'absorption à deux photons, l'imagerie à trois photons impose plusieurs contraintes sur la source laser utilisée. La source doit idéalement fournir des impulsions sub-100 fs, avec un taux de répétition de l'ordre du MHz (1-4 MHz) et avec des énergies de l'ordre de la centaine de nanojoules. Ce type de source adapté pour la microscopie à trois photons a récemment été introduit sous forme commerciale; cependant, compte tenu de la séparation spectrale des deux fenêtres d'intérêt (1300 et 1700 nm), il reste difficile d'acquérir simultanément des images à trois photons bicolores d'échantillons marqués à l'aide de combinaisons de protéines fluorescentes rouges/vertes. Nous présentons ici une nouvelle architecture de source laser, basée sur le principe d'amplification paramétrique chirpée (OPCPA), pompée par une source Yb fibrée commerciale et permettant une excitation simultanée des deux fenêtres d'intérêt pour la microscopie à trois photons. Cette architecture innovante émet simultanément deux trains d'impulsions synchronisés à 1300 nm et à 1700 nm, à 1.25 MHz, avec des énergies de l'ordre du µJ et des impulsions de 69 fs (resp. 65 fs). Nous démontrons l'utilisation de cette source pour l'imagerie trois photons bicolore en profondeur de combinaisons de protéines fluorescentes types de tissus nerveux. Ce développement technologique permet d'ouvrir la voie à une nouvelle catégorie d'expériences de microscopie multiparamétrique/multimodale à trois photons.



**Microscopie a trois photons bicolore**. (a) Architecture OPA délivrant une excitation simultanée dans les bandes à 1.3 µm et 1.7 µm pour la microscopie à trois photons. (b) Comparaison de contrastes à deux et trois photons dans un échantillon de tissue cérébral fixé, marqué par la protéine fluorescente rouge tdTomato et imagé à 600 µm de profondeur. (c) Imagerie à trois photons bicolore in vivo dans le cerveau de poisson-zèbre adulte. Barres d'échelle : 100 µm. Adapté de [3]

#### **References**

- [1] Horton et al.Nature Photonics 7, 205-209 (2013)
- [2] Ouzounov et al. Nature Methods 14 388-390 (2017)
- [3] Guesmi\*, Abdeladim\*, et al. Light: Science and Applications (2018)
- [4] Cadroas et al. Journal of Optics (2017)

# **QUANTITATIVE PHASE IMAGING FOR SUPER-RESOLUTION MICROSCOPY**

# Pierre Bon<sup>1</sup>, Jeanne Linarès<sup>1</sup>, Luarent Cognet<sup>1</sup>, Sandrine Lévêque-Fort<sup>2</sup>, Jérôme Wenger<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Lab. Photonique Numérique et Nanosciences (LP2N) – CNRS-Univ. Bordeaux-IOGS – 33400 Talence, France

<sup>2</sup> Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay (ISMO) – CNRS-Univ. Paris Saclay - 91405 Orsay, France

<sup>2</sup> Institut Fresnel – CNRS-Aix Marseille Univ.-Centrale Marseille - 13013 Marseille, France

# pierre.bon@institutoptique.fr

In optical imaging microscopy, having access not only to the intensity of the light but also to its phase grants many possibilities. I will show in this presentation that quantitative phase+intensity imaging has powerful applications in the framework of super-resolution. In particular, I will demonstrate that it allows 3D super-localization of single particles. First, I will discuss the case of absorbing (gold) nanoparticles and its application for single shot-3D nanometer stabilization of a super-resolution microscope [1]. Then I will show that the approach is also particularly efficient on fluorescent molecules since it grants the capability to get quasi-isotropic 3D super-resolution imaging deep in biological samples without any adaptive optics [2].

#### Références

[1] Bon *et al*, "Three-dimensional nanometre localization of nanoparticles to enhance super-resolution microscopy" Nature Communications, 2015

[2] Bon et al., "Self-interference 3D super-resolution microscopy for deep tissue investigations", Nature Methods, 2018

# Spatio-temporal volumetric light shaping for high-resolution multicell targeting

DIMITRII TANESE<sup>1,2</sup>, NICOLÒ ACCANTO<sup>1,2</sup>, CLÉMENT MOLINIER<sup>1,2</sup>, , Emiliano Ronzitti<sup>1,2</sup>, Zachary L. Newman<sup>3</sup>, Claire Wyart<sup>4</sup>, Ehud Isacoff<sup>3</sup>, Eirini Papagiakoumou<sup>1,2,5</sup> and Valentina Emiliani<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Wavefront-Engineering Microscopy group, Neurophotonics Laboratory, CNRS UMR8250, Paris Descartes University, 45 rue des Saints-Pères, Paris, France.

<sup>2</sup> Sorbonne Université, CNRS, INSERM, Institut de la Vision, 17 Rue Moreau, 75011, Paris, France.

<sup>3</sup> Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley,, California, USA.

<sup>4</sup> Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM), Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, Inserm, CNRS, AP-HP,

Hôpital Pitié-Salpêtrière, Boulevard de l'hôpital, F-75013, Paris, France.

<sup>5</sup> Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), Paris, France.

# Résumé

The advent of novel molecular tools, such as light-sensitive channels and reporters, opened new ways to manipulate and control neuronal activity. Their full exploitation requires illumination approaches capable of selectively targeting multiple cells.

Here we report a novel optical scheme to generate 3D illumination patterns based on the spatio-temporal modulation of a two-photon excitation beam. By multiplexing a temporally focused bi-dimensional pattern over multiple positions, we generate several tens of axially confined illumination spots in an extended volume.

**MOTS-CLEFS :** wavefront engineering, multi-photon microscopy, temporal focusing, optogenetics

# IMAGERIE 3D DE LA MICROCIRCULATION DU POISSON-ZÈBRE PAR HOLOGRAPHIE NUMÉRIQUE

#### Alexey Brodoline, Nitin Rawat, Daniel Alexandre, Michel Gross

Laboratoire Charles Coulomb, Université de Montpellier, Campus Triolet, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier cedex 5, France

alexey.brodoline@umontpellier.fr

### Résumé

Une technique de microscopie basée sur l'holographie numérique est proposée pour l'étude de la microcirculation sanguine et du développement vasculaire chez la larve du poissonzèbre. Des résultats récents d'imagerie 3D du flux sanguin dans les vaisseaux sont présentés.

MOTS-CLEFS : Holographie numérique ; Imagerie 3D ; flux sanguin

## 1. INTRODUCTION

L'imagerie du flux sanguin trouve de nombreuses applications dans le domaine de la biologie et de la médecine. Elle permet d'évaluer des processus physiologiques ou pathologiques comme l'angiogenèse ou la vascularisation des tumeurs [1] et permet une détection précoce des maladies [2] telle que la dégénérescence maculaire liée à l'âge [3]. Puisque les systèmes vasculaires sont généralement des structures tridimensionnelles, la visualisation en 3D de la microcirculation est d'un grand intérêt. La méthode sans marquage présentée, basée sur l'holographie numérique, permet d'obtenir des images *in-vivo* de globules rouges en mouvement. La technique est validée dans le cas d'une larve de poisson-zèbre (2-5 jours de développement). Comparé aux résultats précédents [4], une meilleure résolution en z est obtenue grâce à l'utilisation d'un objectif de microscope de plus grande ouverture numérique (ON).

# 2. MÉTHODE EXPÉRIMENTALE

Le dispositif expérimental est similaire à celui utilisé dans les travaux précédents [5, 4]. Il s'agit d'un microscope droit modifié (Olympus® CX41) où l'illumination est faite par une diode laser (60 mW,  $\lambda$ =660 nm) atténuée pour ne pas saturer le capteur. L'échantillon est une larve de poisson-zèbre (*Danio rerio*) anesthésiée à la tricaïne et fixée dans l'agarose. L'observation est réalisée avec un objectif de microscope (MO) à immersion à eau Zeiss® (x20 / ON=0,5). Le grossissement total du système est G = 41, 2. L'onde laser diffusée par l'échantillon est combinée avec un faisceau de référence cohérent au niveau du capteur de la caméra (Mikrotron Eosens CL : 1280x1024 pixels de 14µm, 200 Hz, 10 bits). Un angle est imposé entre le champ diffracté par l'objet ( $E_S$ ) et la référence ( $E_R$ ) afin de réaliser l'holographie hors-axe. La caméra enregistre l'intensité correspondante à la figure d'interférence produite  $I_{CAM}(x,y) = |E_R + E_S|^2$ . Afin d'éliminer la lumière diffusée par les objets immobiles et de ne garder que les objets en mouvement tels les globules rouges, l'hologramme  $H_{CAM}$  est calculé par :

$$H_{CAM}(x,y) = \sum_{n=1}^{6} I_{CAM,n}(x,y) sin(n\frac{\pi}{3})$$

Où  $I_{CAM,n}$  avec n = 1..6 représentent les images successives de la caméra. Le champ optique peut être propagé numériquement à partir du capteur et reconstruit dans un plan proche de l'objet.  $E_S(x,y,z)$ peut alors être calculé de chaque côté du plan de l'échantillon en utilisant la méthode de reconstruction décrite dans [6]. Un cube de données contenant  $E_S(x,y,z)$  est ainsi obtenu, donnant le champ complexe dans un volume autour de l'objet. À partir de ce cube de données, les positions des globules rouges sont extraites en utilisant un algorithme de nettoyage. La procédure de reconstruction et l'algorithme de nettoyage sont détaillés dans [4, 6].

# 3. RÉSULTATS

L'algorithme de nettoyage détermine les positions des globules rouges dans une grille de 640x640 x128 pixels ( $\Delta x = \Delta y = 0.54 \ \mu m$ ,  $\Delta z = 1.08 \ \mu m$ ). Les calculs ont été effectués sur un processeur graphique (GPU) Nvidia GTX TITAN CUDA. Les résultats de la reconstruction sont présentés dans la Fig.1. Elle a été réalisée sur 400 images successives enregistrées à 200 Hz. La moyenne des positions des globules rouges sur 100 images donne la forme des vaisseaux sanguins. La structure interne du système vasculaire peut être visualisée. Le rendu est effectué en utilisant l'interface OpenGL de Nvidia CUDA, qui permet la translation et la rotation de l'image 3D.



FIGURE 1 : Reconstruction 3D d'un système vasculaire de poisson-zèbre âgé de 5 jours. La moyenne des positions des globules rouges sur 100 images donne la forme des vaisseaux. (a, b) Deux points de vue différents. (c) Des globules rouges superposés à l'image moyennée.

#### CONCLUSION

Une technique d'imagerie sans marqueurs permettant une observation *in-vivo* de la microcirculation a été proposée. Le rendu CUDA-OpenGL permet une exploration 3D complète de l'objet. La technique peut être adaptée à tout microscope et peut être combiné avec d'autres techniques microscopiques conventionnelles, fournissant de nouveaux outils pour l'étude du flux sanguin.

### Références

- [1] P. Carmeliet, and J. K. Rakesh, "Angiogenesis in cancer and other diseases," Nature 407,249–257 (2000).
- [2] M. P. Pase, N. A. Grima, C. K. Stough, A. Scholey, and A. Pipingas, "Cardiovascular disease risk and cerebral blood flow velocity," Stroke 43, 2803–2805 (2012).
- [3] E. Friedman, S. Krupsky, A. Lane, S. Oak, E. Friedman, K. Egan, and E. Gragoudas, "Ocular blood flow velocity in age-related macular degeneration," Ophthalmology 102, 640–646 (1995).
- [4] D. Donnarumma, A. Brodoline, D. Alexandre, and M. Gross, "4D holographic microscopy of zebrafish larvae microcirculation," Opt. Exp. 24, 26887–26900 (2016).
- [5] D. Donnarumma, A. Brodoline, D. Alexandre, and M. Gross, "Blood flow imaging in zebrafish by laser doppler digital holography," Microsc. Res. Tech. (2016).
- [6] N. Verrier, D. Alexandre, G. Tessier, and M. Gross, "Holographic microscopy reconstruction in both object and image half-spaces with an undistorted three-dimensional grid," Appl. Opt. **54**, 4672–4677 (2015).

# IMAGERIE CORRELATIVE MULTIPHOTON-NANOIR DES ETATS FIBRILLAIRE ET DENATURE DU COLLAGENE NON MARQUE.

# Jérémie Mathurin<sup>1</sup>, Gaël Latour<sup>2</sup>, Gervaise Mosser<sup>3</sup>, Alexandre Dazzi<sup>1</sup>, Ariane Deniset-Besseau<sup>1</sup>, Marie-Claire Schanne-Klein<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Chimie Physique, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, Orsay, France

<sup>2</sup> Laboratoire Imagerie et Modélisation en Neurobiologie et Cancérologie, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, Orsay, France

<sup>3</sup> Sorbonne Université, CNRS, Collège de France, Laboratoire Chimie de la Matière Condensée de Paris, LCMCP, Paris, France

<sup>4</sup> Laboratoire d'Optique et Biosciences, Ecole Polytechnique, CNRS, INSERM, Université Paris-Saclay, Palaiseau, France

marie-claire.schanne-klein@polytechnique.edu

## Résumé

Le collagène est caractérisé dans ses états fibrillaire et dénaturé (gélatine) par nanospectroscopie infra-rouge (IR). La corrélation de cette cartographie chimique à la microscopie multiphoton permet alors d'interpréter les divers signaux multiphoton pour développer une imagerie *in situ* sans marquage des différents états structuraux du collagène.

**MOTS-CLEFS :** *microscopie optique non-linéaire, spectroscopie infrarouge, AFM, collagène, gélatine* 

# 1. INTRODUCTION

Le collagène est un élément majeur de l'architecture des organes chez les mammifères et est présent notamment dans la peau, la cornée, les tendons et ligaments, les os et les artères. Cette protéine se caractérise par de longs domaines en triple hélice, qui s'alignent spontanément pour former des fibrilles. Cependant, un traitement thermique ou d'autres processus peuvent induire la dénaturation du collagène qui se présente alors sous forme de gélatine (simples hélices plus ou moins protéolysées). La technique de référence pour visualiser le collagène *in situ* dans les tissus biologiques est la microscopie par génération de second harmonique (SHG). Un signal est obtenu sans marquage dans le collagène fibrillaire tandis que ce signal disparait dans la gélatine en raison de son organisation centro-symétrique [1]. Des expériences préliminaires ont montré qu'il apparaît alors un signal de fluorescence excitée à 2 photons (2PEF), facilement détectable en parallèle du signal SHG dans un microscope multiphoton [2]. Cependant, ce signal n'a pas pu être caractérisé finement en raison du manque de spécificité de la microscopie de fluorescence. L'objectif de ce travail est donc de corréler la microscopie multiphoton à la spectroscopie infrarouge à l'échelle nanométrique (nanoIR) qui permet une cartographie chimique sans marquage. Cette imagerie corrélative est effectué sur du collagène fibrillaire qui est directement dénaturé sous la pointe AFM.

#### 2. DENATURATION SOUS POINTE ET IMAGERIE CORRELATIVE MULTIPHOTON-NANOIR

La première étape de cette étude consiste à mettre en place un protocole de dénaturation sous pointe afin de visualiser le même collagène sous sa forme fibrillaire puis dénaturée. Pour cela, des fibrilles de collagène sont obtenues par hausse du pH à partir de collagène purifié. La dénaturation est alors obtenue par balayage d'une pointe AFM spécifique chauffée à une température d'environ 350°. La comparaison des spectres IR mesurés localement avant et après dénaturation montre l'apparition d'une bande IR à 1725 cm<sup>-1</sup>, qui est donc spécifique du collagène dénaturé.

La deuxième étape consiste à corréler cette cartographie IR à l'imagerie multiphoton. Les images multiphoton acquises avant et après dénaturation du collagène sous pointe AFM montre que le collagène dénaturé ne présente plus de signal SHG comme attendu, mais un signal 2PEF qui est donc spécifique du collagène dénaturé. Cette imagerie corrélative du même échantillon de collagène avant et après dénaturation permet donc d'attribuer sans ambiguïté le signal 2PEF à l'apparition de gélatine. L'origine de ce signal 2PEF et de la bande à 1725 cm<sup>-1</sup> associée reste à déterminer précisément par des expériences complémentaires.



Fig. 1 : imagerie corrélative nanoIR à 1725 cm<sup>-1</sup> (a, b) / multiphoton (d) de collagène avant (a) et après (b-d) dénaturation. (c) montre la topographie mesurée après dénaturation.

#### CONCLUSION

Notre étude corrélative de la dénaturation du collagène permet de transférer la spécificité chimique de la nano-spectroscopie IR, technique limitée à des échantillons minces, à la microscopie multiphoton, technique utilisable *in situ* sur des échantillons biologiques intacts épais. Une perspective immédiate est d'étudier les bords d'une découpe laser dans la cornée humaine, par exemple lors d'une kératoplastie, afin de vérifier la présence potentielle d'une zone dénaturée et d'en mesurer l'importance.

#### REFERENCES

- S. Bancelin, C. Aimé, I. Gusachenko, L. Kowalczuk, G. Latour, T. Coradin, and M.-C. Schanne-Klein, "Determination of collagen fibril size via absolute measurements of second-harmonic generation signals," Nat. Commun. 5(2014).
- [2] G. Latour, L. Robinet, A. Dazzi, F. Portier, A. Deniset-Besseau, and M.-C. Schanne-Klein, "Correlative nonlinear optical microscopy and infrared nanoscopy reveals collagen degradation in altered parchments," Sci. Rep. 6, 36344 (2016).

# **IMAGERIE INTERFERENTIELLE EN REFLECTION POUR LA MATIERE MOLLE**

# Delphine Débarre<sup>1</sup>, Heather Davies<sup>1</sup>, Nouha El Amri<sup>1</sup>, Siddharta Varma<sup>1</sup>, Claude Verdier<sup>1</sup>, Ralf P Richter<sup>2,3</sup>, Lionel Bureau<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univ. Grenoble Alpes, CNRS, LIPhy, 38000 Grenoble, France

<sup>2</sup> School of Biomedical Sciences, Faculty of Biological Sciences, School of Physics and Astronomy, Faculty of Mathematics and Physical Sciences, Astbury Centre for Structural Molecular Biology, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, UK

<sup>3</sup> CIC biomaGUNE, Paseo Miramon 182, 20014 San Sebastian, Spain

delphine.debarre@univ-grenoble-alpes.fr

#### Résumé

La microscopie interférentielle en réflection est une technique de choix pour étudier les interactions objet/surface. Nous avons récemment montré qu'elle permettait la caractérisation précise de brosses de polymère et l'étude de l'interaction de ces brosses avec des cellules, notamment dans le contexte de la circulation sanguine.

**MOTS-CLEFS :** Microscopie interférentielle; interactions cellules-surfaces

#### **1. INTRODUCTION**

La microscopie interférentielle en réflection (reflection interference contrast microscopy, RICM) est utilisée depuis 25 ans pour étudier les interactions objet/surface à courte distance. Elle permet en effet de quantifier, avec une précision meilleure que la longueur d'onde et sur une gamme de quelques microns, la distance entre deux objets de propriétés optiques connues, ou les variations de distances pour des objets plus complexes tels que des cellules. Elle a donc trouvé de nombreuses applications en matière molle et en biophysique [1]. Son utilisation est cependant limitée par le dispositif expérimental généralement utilisé qui inclut un objectif spécifique (dit "antiflex") incorporant une lame quart d'onde et qui n'est plus commercialisé.

Dans ce contexte, nous avons récemment démontré plusieurs dispositifs alternatifs permettant d'adapter cette technique à des questions physiques différentes, et démontré leur utilisation en physique des polymères et dynamique des fluides.

#### 2. CONFORMATION DE BROSSES DE POLYMERES ETUDIEE PAR REFLECTANCE SPECTRALE

Les brosses de polymères sont couramment utilisées comme substrat permettant de moduler l'adhesion cellulaire, ou pour modéliser des parois biologiques comme la surface de l'endothélium vasculaire. Le poly(N-isopropylacrylamide), ou PNIPAM, est par exemple couramment utilisé pour contrôler l'adhésion de cellules individuelles ou confluentes en fonction de la température d'incubation. En effet, ce polymère thermosensible change de conformation autour de 32°C et peut, selon les propriétés de la brosse (longueur des chaînes, densité de greffage), induire le décollement de cellules préalablement adhérées. Cependant, la caractérisation précise *in situ* de telles brosses de polymère, essentielle pour ce type d'applications, est encore peu développée : elle passe généralement par des mesures destructives impliquant le détachement des chaînes de la surface, ou par une mesure de réflectivité des neutrons effectuée sur un wafer de silicium non transparent.

En utilisant une implémentation originale de mesure RICM, nous avons démontré la caratérisation complète *in situ* avec une résolution optique de telles brosses de PNIPAM, ce qui nous a permis de confirmer l'existence d'une séparation de phase verticale en densité à la transition bon/mauvais solvant, et de déterminer l'origine de l'hystérésis observé autour de cette transition [2].

Nous avons également couplé cette mesure avec un système microfluidique pour étudier l'impact du cisaillement hydrodynamique sur la structure d'une brosse de polymère.



Fig. 1 : (a), vue schématique du microscope RICM utilisant une lame de mica (QWP) collée à l'échantillon.
(b), mesures de réflectance (traits pleins) et ajustements (traits pointillés) pour une brosse de PNIPAM d'épaisseur sèche 200nm à différentes températures. (c), profils de densité correspondants. (d), lift de particules sphériques à proximité de brosses de module élastique 5 (orange), 57 (vert) et 15000 (rouge) Pa. Symboles, mesures expérimentales en RICM à deux couleurs; lines, prédictions théoriques.

#### 3. LIFT ELASTOHYDRODYNAMIQUE

De façon complémentaire, nous avons réalisé en RICM la première démonstration expérimentale directe de lift de particules sous flux à proximité d'une surface déformable (ici une brosse de polymère) due à la force élastohydrodynamique résultant de la déformation de la surface au passage de l'objet. L'effet mesuré correspond quantitativement aux prédiction théoriques sur plusieurs décades de taux de cisaillement. Nous avons ainsi montré que cette force peut contribuer de façon significative à la margination des cellules circulantes dans les vaisseaux sanguins, effet crucial pour la répartition de l'hématocrite dans les capillaires [3].

#### Références

[1] L. Limozin and K. Sengupta, Quantitative Reflection Interference Contrast Microscopy (RICM) in Soft Matter and Cell Adhesion. Chem. Eur. J. of Chem. Phys., vol. 10, pp.2752–2768, 2009.

[2] S. Varma, L. Bureau, and D. Débarre, "The Conformation of Thermoresponsive Polymer Brushes Probed by Optical Reflectivity," Langmuir, vol. 32, pp. 3152-3163, 2016.

[3] H.S. Davies, D. Débarre, N. El Amri, C. Verdier, R.P. Richter and L. Bureau, "Elastohydrodynamic lift at a soft wall", à paraître dans Physical Review Letters

# MUELLER POLARIMETRIC IMAGING OPTIMIZATION FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

# Arvid Lindberg<sup>1</sup>, Camille Gennet<sup>1</sup>, Jérémy Vizet<sup>1</sup>, Jean Charles Vanel<sup>1</sup> and Angelo Pierangelo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> LPICM, UMR CNRS 7647, Ecole polytechnique, Université Paris-Saclay, 91128 Palaiseau, France

arvid.lindberg@polytechnique.edu

## Résumé

Imaging Mueller polarimetry has been shown to provide useful contrast in biomedical imaging. Promising results have spurred the development of polarimetric instruments for *in-vivo* applications. We will show several instruments destined for use in these applications and explain crucial aspects of construction and validation.

**MOTS-CLEFS :** *Mueller polarimetry, Biomedical imaging, Polarization, Cancer* 

#### 1. INTRODUCTION

Mueller polarimetry is an optical technique that exploits the polarization of light to extract information about the microstructure of a sample. It does so by probing the sample with different states of polarized light as well as analyzing the polarized emitted after interaction with the sample. This allows the extraction of the Mueller matrix which contains all polarimetric information, i.e. depolarization, diattenuation and phase retardance. Recently it has been shown in *ex-vivo* studies that the Mueller matrix of various cancerous tissues is different from the corresponding healthy tissues [1,2]. The ongoing challenge to reproduce these results *in-vivo* which has led to the development of innovative instruments [3-5]. The settings of biomedical *in-vivo* measurement can be difficult, where patient movement can add significant motion blur an image. Common techniques such as averaging several measurements to improve signal to noise ratio are not possible as they would be in a laboratory setting. These problems impose stringent requirements on the imaging system. For Mueller polarimetry the crucial components are the ones that generate and analyzed the states of polarized light. We propose the use of Ferroelectric Liquid Crystals (FLCs), which have been used successfully before [3] and address many of the issues related to *in-vivo* measurements, such as acquisition time and large clear aperture.

Naturally, any Mueller polarimetric instrument must be well optimized and well calibrated for a high signal to noise ratio measurement. To construct an instrument with low error transfer and good correspondence between design and experimental validation, we propose an extensive characterization scheme of our optical components, specifically the FLCs. We will present details and advantages about this characterization scheme.

After the characterization of our components, we designed and constructed a Mueller polarimeter to validate and perform various test on the error transfer to the measured Mueller matrix. These results indicate that the system is robust and with low noise.

The calibration scheme used for throughout the validation experiments of our Mueller polarimeter, is the Eigenvalue Calibration Method (ECM). We will show some variations of the ECM and some important robustness aspects when implementing it.

Finally, we will show some instruments based Ferroelectric Liquid Crystals with similar design that have been constructed or improved. These include two Mueller polarimetric full-field imaging systems in reflection configuration for the analysis of biological tissues *ex vivo*, a Mueller polarimetric colposcope for the analysis of uterine cervix *in vivo* as well as ongoing development of a Mueller polarimetric rigid endoscope for the exploration of inner cavities of human body *in vivo*.

### 2. Références

- [1] A. Pierangelo *et al.*, "Ex-vivo characterization of human colon cancer by Mueller polarimetric imaging.," *Opt. Express*, vol. 19, no. 2, 2011.
- [2] A. Pierangelo *et al.*, "Polarimetric imaging of uterine cervix: a case study," *Opt. Express*, vol. 21, no. 12, pp. 14120–14130, 2013.
- [3] J. Vizet *et al.*, "In vivo imaging of uterine cervix with a Mueller polarimetric colposcope," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 2471, 2017.
- [4] J. Qi and D. S. Elson, "A high definition Mueller polarimetric endoscope for tissue characterisation," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. April, p. 25953, 2016.
- [5] J. Vizet, P. Validire, E. Garcia-caurel, and D. Pagnoux, "Optical fiber-based full Mueller polarimeter for endoscopic imaging using a two-wavelength simultaneous measurement method endoscopic imaging using a two-wavelength," *J. Biomed. Opt.*, 2016.