

Développement d'un endomicroscope non linéaire pour l'observation in vivo in situ de la matrice extracellulaire des tissus pulmonaires

Development of a non-linear endomicroscope for the in vivo in situ observation of lung tissue extracellular matrix

D.A. Peyrot^{a,b}, C. Lefort^{c,d}, T. Mansuryan^{c,d}, S.G. Kruglik^{a,b}, N. Sandeau^{a,b}, C. Vever-Bizet^{a,b},
L. Thiberville^{e,f}, F. Lacombe^g, F. Louradour^{c,d}, G. Bourg-Heckly^{a,*,b}

^a UPMC université Paris-06, FRE 3231, LJP, 4, place Jussieu, 75005 Paris, France

^b CNRS, FRE 3231, LJP, 4, place Jussieu, 75005 Paris, France

^c Faculté des sciences et techniques, université de Limoges, 123, avenue Albert-Thomas, 87060 Limoges, France

^d XLIM, UMR CNRS 6172, 123, avenue Albert-Thomas, 87060 Limoges, France

^e Clinique de pneumologie, CHU de Rouen, 1, rue de Germont, 76000 Rouen, France

^f Laboratoire LITIS-QuantIF EA 4108, Rouen université, 22, boulevard Gambetta, 76000 Rouen, France

^g Mauna Kea Technologies, 9, rue d'Enghien, 75010 Paris, France

Reçu le 20 janvier 2012 ; reçu sous la forme révisée le 20 janvier 2012 ; accepté le 21 janvier 2012

Disponible sur Internet le 28 février 2012

Résumé

Nous présentons un premier bilan du projet *InVivo*-ONL dont le but est la mise au point d'un système d'endomicroscopie non linéaire destinée en première intention à l'imagerie in vivo de la matrice extracellulaire du poumon.

© 2012 Publié par Elsevier Masson SAS.

Abstract

A first review of the *InVivo*-ONL project is presented. The aim of the project is to develop a non-linear endomicroscopic system dedicated in first intention to in vivo imaging of the lung extracellular matrix.

© 2012 Published by Elsevier Masson SAS.

1. Introduction

En permettant l'exploration non invasive de la muqueuse des organes creux, l'endoscopie diagnostique en lumière blanche s'est imposée comme une modalité majeure d'imagerie diagnostique. Elle est cependant limitée par deux facteurs : sa résolution spatiale qui ne donne pas accès à l'échelle microscopique et son caractère superficiel qui ne lui permet pas d'explorer la profondeur de la muqueuse. En transférant les techniques de microscopie confocale de laboratoire au monde de l'endoscopie, la microscopie confocale fibrée de fluorescence, ou endomicroscopie, a repoussé ces limites. Cette modalité émergente

d'imagerie médicale permet de visualiser un tissu, in vivo, in situ, avec une résolution microscopique, à différents niveaux de profondeur. Elle offre donc la potentialité d'effectuer un examen histopathologique non invasif en temps réel lors d'une endoscopie. Jusqu'à présent, la technique exploite la fluorescence de composants exogènes ou endogènes (autofluorescence) par excitation monophotonique.

Actuellement, l'endomicroscopie d'autofluorescence monophotonique permet l'exploration du système respiratoire lors d'une bronchoscopie. Ces dernières années, nous avons développé un système de microspectro-imagerie confocale fibrée permettant l'obtention, in vivo, in situ, d'une image et d'un spectre d'autofluorescence pour la même zone tissulaire [1]. À l'aide de ce dispositif, nous avons étudié in vivo la microstructure de l'arbre bronchique, des bronches proximales jusqu'aux alvéoles. Nous avons ainsi montré que l'utilisation d'une

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : genevieve.bourg-heckly@upmc.fr (G. Bourg-Heckly).

excitation de longueur d'onde 488 nm permettait de visualiser spécifiquement la structure élastique sous-épithéliale des parois bronchique et alvéolaire et de suivre l'altération du réseau d'élastine lors de différentes pathologies [2,3]. La limitation de cette technique vient de son incapacité à visualiser le collagène, qui constitue, avec l'élastine, une des principales protéines de la matrice extracellulaire (MEC) des tissus conjonctifs.

Le transfert des techniques de microscopie multiphotonique en endoscopie ouvrirait un champ nouveau au diagnostic endoscopique. En combinant différents modes de contraste telles que la fluorescence excitée à deux photons (2PEF) et la génération de seconde harmonique (SHG), il serait notamment possible de visualiser simultanément les fibres d'élastine (par 2PEF) et de collagène (par SHG) de la MEC. Sachant que plusieurs pathologies majeures telles que le cancer ou les pathologies infiltrantes du poumon profond sont caractérisées par des modifications précoces du réseau fibré d'élastine et de collagène de la MEC, la micro-endoscopie multiphotonique constituerait une avancée majeure en imagerie diagnostique, avec d'importantes retombées en clinique humaine.

De plus, l'utilisation d'impulsions infrarouges permet de limiter les problèmes de diffusion optique des tissus, qui est particulièrement forte dans le spectre visible, et à terme de pouvoir observer le tissu plus en profondeur [4].

L'objectif du projet *InVivo-ONL* est de développer, à partir de la technologie originale de microscopie confocale fibrée, mise au point par Mauna Kea Technologies, un endomicroscope permettant d'effectuer de l'imagerie multiphotonique *in vivo*, *in situ*, qui sera utilisée en première intention pour l'étude de la MEC *in vivo* du tissu pulmonaire, bronchique et alvéolaire. Ce projet pluridisciplinaire regroupe deux laboratoires de recherche, ANBioPhy et XLIM, une entreprise, Mauna Kea Technologies et le département de pneumologie du CHU de Rouen.

2. Déport d'impulsions femtosecondes par fibre optique endoscopique

La 2PEF de l'élastine et la SHG du collagène de la MEC pulmonaire sont des modes de contraste accessibles uniquement grâce à l'emploi d'impulsions infrarouges excitatrices ultra-courtes (durée < 100 fs) et intenses (puissance crête > 1 kW crête) mais faiblement énergétiques pour ne pas dégrader les tissus (énergie < 100 pJ). Pour réaliser ces imageries *in vivo*, *in situ*, il faut une fibre optique endoscopique (e.g. le guide d'image multicœur qui équipe l'endomicroscope de Mauna Kea Technologies) capable d'acheminer ces impulsions excitatrices jusqu'au poumon profond. Cependant à cause de leur bande spectrale large et de leur puissance crête importante, il n'est pas facile d'acheminer ces impulsions à l'aide d'un guide d'onde endoscopique. Elles sont en effet sujettes à des élargissements temporels et spectraux à cause, respectivement, de la dispersion chromatique et de la non linéarité optique de type Kerr des cœurs de petite taille (i.e. $\approx 1 \mu\text{m}$) du guide d'image. Pour contourner ce problème, nous avons choisi de mettre en œuvre des moyens de précompensation adaptés. Pour la compensation de la dispersion chromatique, on positionne de façon assez traditionnelle en amont de la fibre endoscopique (à dispersion normale positive

à 800 nm) une ligne à dispersion opposée (on parle souvent aussi d'« étireur ») afin de précompenser la dispersion de la fibre endoscopique. De cette façon, on impose la compression temporelle de l'impulsion en bout d'endoscope par annulation de la dispersion d'ordre 2 du système. La fibre joue alors le rôle de « compresseur ». En présence d'effet non linéaire de type Kerr (i.e. pour des impulsions d'énergie supérieures à 10 pJ à 100 fs) se produisant dans les derniers centimètres de la fibre endoscopique, on constate une compression du spectre de l'impulsion de telle sorte que la durée finale de l'impulsion compressée temporellement est fortement augmentée. Il a été démontré [5] que l'élargissement préalable du spectre par automodulation de phase dans une première fibre à cœur unique standard précompense cet effet non linéaire délétère et donne un spectre de sortie proche du spectre d'entrée. Cependant les résultats obtenus préalablement en utilisant cette architecture de précompensation linéaire et non linéaire [fibre non linéaire – étireur – fibre endoscopique] sont encore perfectibles. En effet, que ce soit avec les étireurs à paire de prismes ou bien avec les étireurs à paire de réseaux de diffraction de type ligne Treacy qui ont été utilisés précédemment, il est impossible de compenser simultanément l'ordre 2 et l'ordre 3 de dispersion des fibres. L'impulsion finale est alors fortement distordue par la présence d'une phase spectrale d'ordre 3 résiduelle importante. L'impulsion compressée est relativement longue et l'excitation non linéaire qu'elle induit sur les tissus reste très sous-optimale.

L'objectif de notre travail a été dans cette première étape de démontrer qu'il est possible d'augmenter très fortement les performances du système de transport d'impulsions femtosecondes par fibre optique grâce à la compensation simultanée des dispersions d'ordres 2 et 3 des fibres. Cela a été rendu possible par l'emploi d'une ligne dispersive hybride optimisée développée à XLIM spécifiquement pour le projet *InVivo-ONL* [6]. Cet étireur est composé d'un couple de grisms, chacun d'eux étant constitué d'un réseau (*grating* en anglais) de diffraction accolé à un prisme (*prism* en anglais) (Fig. 1). Le principal avantage de ce type de ligne dispersive est de permettre les ajustements simultanés et indépendants des dispersions d'ordres 2 et 3 en jouant sur la distance intergrism et sur l'angle d'incidence du faisceau sur l'étireur. Les performances du système de transport d'impulsions par fibre sont alors définies par le reliquat de dispersion d'ordre 4 qui s'avère relativement faible dans ces conditions.

La source d'impulsions femtosecondes utilisée dans nos expériences pour valider cette solution technique est un oscilateur Ti : Saphir standard (150 fs, 76 MHz, 830 nm, 10 nm, 1 W). Pour 500 mW en sortie de première fibre (standard monomode à 800 nm ; diamètre de cœur = 3,3 μm ; dispersion d'ordre 2 = 120 fs/nm/m ; longueur = 50 cm), le spectre s'élargit jusqu'à 70 nm. La ligne à grisms est composée de deux réseaux de diffraction en réflexion blazés (densité = 600 traits/mm ; angle de blaze = $17^\circ 27'$) et de deux prismes traités antireflets (matériau = BK7 ; angle au sommet = 40°). Les performances optimales ont été obtenues pour une distance intergrisms $d = 2,51 \text{ cm}$ et un angle d'incidence $\theta = -40,26^\circ$. Pour ces paramètres, l'étireur à grisms compense au mieux les dispersions d'ordre 2 et 3 des deux fibres. L'efficacité énergétique de l'étireur

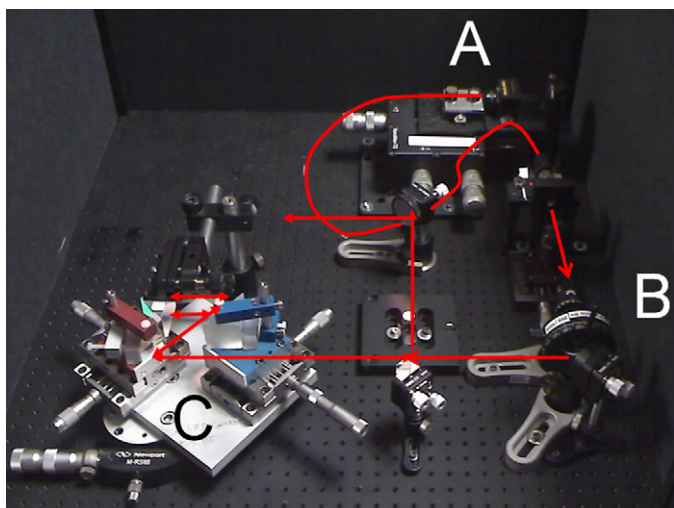


Fig. 1. Système de précompensation : le faisceau est couplé dans une fibre de 50 cm de long dans laquelle il est dispersé (A), sa polarité est alors contrôlée par différentes lames à retard (B), finalement il est orienté vers la ligne de grisms (C) où la dispersion est inversée.

à grisms est de 36 %. La longueur de la fibre endoscopique est de 2 m. Concernant cette seconde fibre, nous avons testé successivement les performances de fibres spéciales à large aire modale à faible non linéarité, celle de fibres standard et enfin bien évidemment celles des guides d'image Fujikura qui équipent l'endomicroscope de Mauna Kea Technologies. Nous avons obtenu pour ces trois types de fibre des durées finales égales respectivement à 25 fs, 32 fs et 40 fs. On constate donc un effet de réduction de la durée d'impulsion par rapport à la valeur initiale à l'entrée du dispositif. Cela signifie que l'excitation non linéaire en bout d'endoscope est de ce point de vue meilleure qu'au foyer d'un microscope non linéaire de table non endoscopique qui serait alimenté par le même laser. En outre, les énergies disponibles en bout de fibre sont systématiquement très largement suffisantes. Elles sont en fait très supérieures à ce qui est tolérable pour l'excitation de tissus biologiques (i.e. énergie < 0,1 nJ). Un autre avantage de ce dispositif original est son accordabilité en longueur d'onde. Ce point est particulièrement important pour la spectroscopie non linéaire de tissus pulmonaires humains dont les développements sont exposés ci-après.

Nous avons également testé la capacité du guide d'image Fujikura, utilisé dans l'appareil de Mauna Kea Technologies [1], à collecter le signal retour émis par le collagène par génération de seconde harmonique et par l'élastine par fluorescence à deux photons. Comme nous le verrons plus loin, ces rayonnements se situent entre 400 et 600 nm. Les données fournies par Fujikura assurent que la transmittance du guide d'image est satisfaisante (i.e. > 70 %) aux grandes longueurs d'onde. En revanche, aux courtes longueurs d'onde (i.e. 400–450 nm) qui concernent surtout l'imagerie du collagène, il nous a semblé nécessaire d'effectuer un test par nous-mêmes. Il s'avère que la transmission des guides dans cette bande est relativement faible (i.e. < 30 %) pour un guide d'image de 2 m. Seule la lumière bleue-violette voyageant au retour dans les cœurs du guide d'image sera véhiculée vers la partie proximale. La gaine optique

du réseau de cœurs du guide d'image est en effet fluorescence à cause vraisemblablement d'un dopage au fluor nécessaire pour abaisser l'indice de cette gaine et éviter des effets de couplages intercœur lors de l'acheminement des impulsions IR excitatrices. Lors de ces tests, nous avons également constaté que le réseau des cœurs du guide d'image était très inhomogène, en termes de tailles des cœurs mais aussi en termes d'ellipticité des cœurs, ce qui leur confère une forte biréfringence moyenne. Pour ces raisons, il s'est avéré judicieux pour certains volets de l'étude, dont notamment la partie spectroscopie non linéaire qui va suivre, de remplacer provisoirement le guide d'image par une fibre standard ne présentant pas ce type de limitations.

3. Accordabilité

L'accordabilité en longueur d'onde du système de précompensation a été vérifiée. De 790 à 900 nm, la ligne de grism a permis d'obtenir des impulsions de largeur temporelle autour de 70 fs en sortie de la fibre optique de 2 m de longueur [7]. En sortie du guide d'image Fujikura, les durées temporelles ont été évaluées à 96 ± 13 fs, l'écart-type étant justifié par les différences paramétriques (biréfringence, diamètre, etc.) pouvant exister entre différents cœurs de fibre.

Pour des impulsions incidentes sur la ligne de grism, ayant des longueurs d'onde inférieures à 790 nm ou supérieures à 900 nm, la longueur d'onde centrale des pics des impulsions en sortie de la fibre ne varie plus et reste constante à ces valeurs extrêmes ; de plus l'intensité des impulsions diminue rapidement. Le procédé impliquant des réseaux de diffraction, la dépendance en longueur d'onde des angles diffractés est à l'origine de cette limite spectrale. L'utilisation de réseaux plus grands, ou de pas différents, peut permettre de déplacer ces longueurs d'ondes extrêmes.

4. Spectroscopie et endospectroscopie de tissus pulmonaires

Deux types de tissu pulmonaire humain sain ont été utilisés dans cette étude, l'un provenant d'une bronche proximale et l'autre d'un territoire alvéolaire. Ces échantillons, préparés par le CHU de Rouen, ont été prélevés sur un échantillon de lobectomie, loin de la zone tumorale, et fixés dans une solution de paraformaldehyde à 4 %. Après fixation, les tissus ont été coupés en tranches d'environ 1 mm d'épaisseur qui sont placés sur une lame de microscope pour les mesures spectroscopiques.

Deux systèmes de spectroscopie ont été développés afin d'observer la 2PEF et la SHG émises par ces échantillons.

Le premier système est un montage traditionnel de microscopie spectroscopie couplant le faisceau laser dans un microscope inversé, le signal émis étant collecté en rétrodiffusion. Le second système, innovant, est un endospectroscopie (Fig. 2) fondé sur l'utilisation d'une fibre monomode de diamètre de cœur 5 μm , d'ouverture numérique 0,22, qui peut s'insérer facilement dans le canal opérateur de tout endoscope. Notre ligne de précompensation spécifique – décrite plus haut – permet d'obtenir à l'extrémité distale de cette fibre des impulsions de largeur temporelle autour de 70 fs. Les densités de puissance

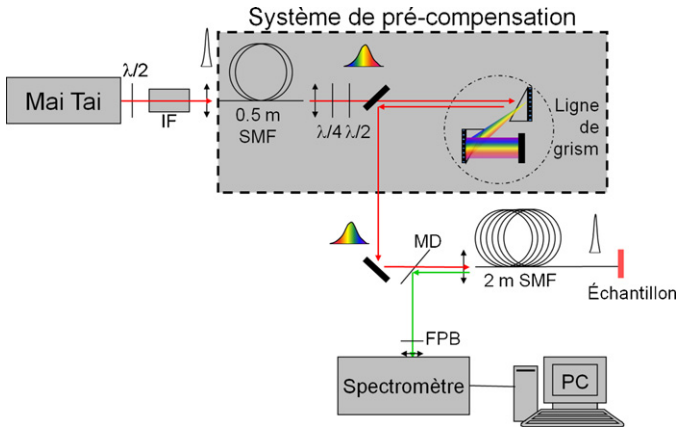


Fig. 2. Montage expérimental du système d'endoscopie non linéaire (IF : isolateur de Faraday ; SMF : fibre optique monomode ; MD : miroir dichroïque ; FPB : filtre passe bande).

appliquées sont de $\sim 1,4 \times 10^{10}$ W/cm² pour le système fibré et de $\sim 1,8 \times 10^{11}$ W/cm² pour le système non fibré. Ces valeurs ont été choisies afin d'optimiser le rapport signal/bruit, et en demeurant en dessous du seuil de claquage optique. La fibre conduisant l'impulsion lumineuse excitatrice est mise en contact avec l'échantillon. Les signaux PEF et SHG émis par celui-ci sont rétrodiffusés et collectés par l'extrémité distale de la fibre, guidés jusqu'à l'extrémité proximale puis dirigés par un miroir dichroïque vers le spectromètre.

Des mesures sur échantillons (Fig. 3) ont permis d'identifier une longueur d'onde d'excitation autour de 850 nm permettant d'obtenir une discrimination optimale des deux protéines (élastine et collagène). En effet, à cette longueur d'onde le collagène émet toujours une SHG importante alors qu'il n'émet plus de 2PEF, tandis que dans la même configuration l'élastine émet toujours de la 2PEF. Une comparaison avec un échantillon d'élastine hydratée a confirmé la similarité des spectres de

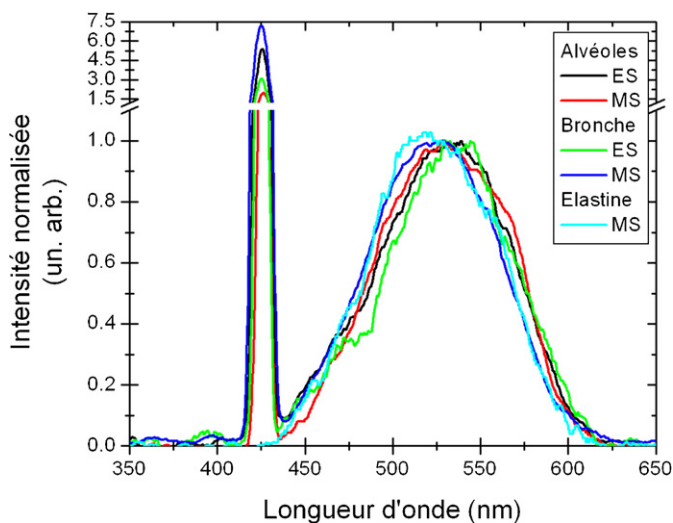


Fig. 3. Spectres de génération de seconde harmonique (SHG) et fluorescence excitée à deux photons (2PEF) émis par des échantillons de territoire alvéolaire, de bronche et d'élastine hydratée, excités à 850 nm en endomicroscopie (ES) et en microscopie (MS).

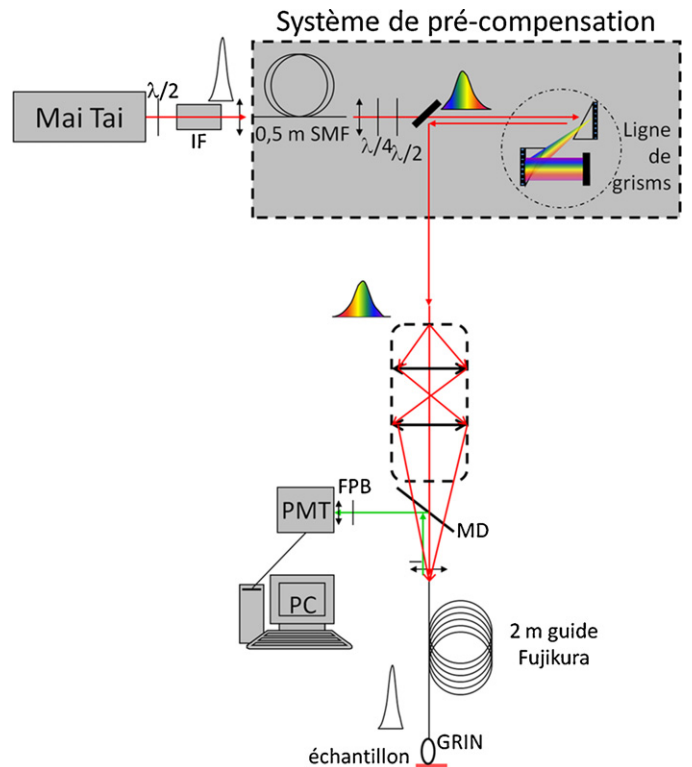


Fig. 4. Montage expérimental du système d'imagerie endoscopique non linéaire à balayage proximal (IF : isolateur de Faraday ; SMF : fibre optique monomode ; MD : miroir dichroïque ; FPB : filtre passe bande ; PMT : tube photomultiplicateur).

fluorescence de l'élastine et des échantillons biologiques pour une excitation supérieure à 800 nm [7].

En dessous d'une longueur d'onde d'excitation de 800 nm, les spectres révèlent toujours la SHG émise par le collagène, mais comportent également une émission de fluorescence combinant la 2PEF de l'élastine et celle du collagène. Il n'est donc pas possible d'effectuer une discrimination des protéines par leurs émissions photoniques pour des longueurs d'onde d'excitation inférieures à 800 nm.

La comparaison des résultats obtenus en microscopie classique et avec notre système d'endoscopie nous a permis de vérifier la similarité des émissions spectrales par les deux méthodes d'excitation et de collection (non fibrée et fibrée) et donc de valider la méthode endoscopique.

Nous constatons que dans nos conditions expérimentales, le photoblanchiment est négligeable sur l'émission 2PEF, et qu'il est nul pour l'émission de SHG. De plus, bien que la fibre optique émette sa propre autofluorescence et sa propre SHG (due à des effets de surface), ces signaux additionnels demeurent à un niveau de bruit optique suffisamment faible pour ne pas altérer les mesures.

5. Imagerie par endoscopie

Le schéma d'endoscopie a été modifié afin de permettre l'enregistrement d'image (Fig. 4). La fibre sonde est remplacée par le guide d'images Fujikura (10 000 cœurs) de 2 m

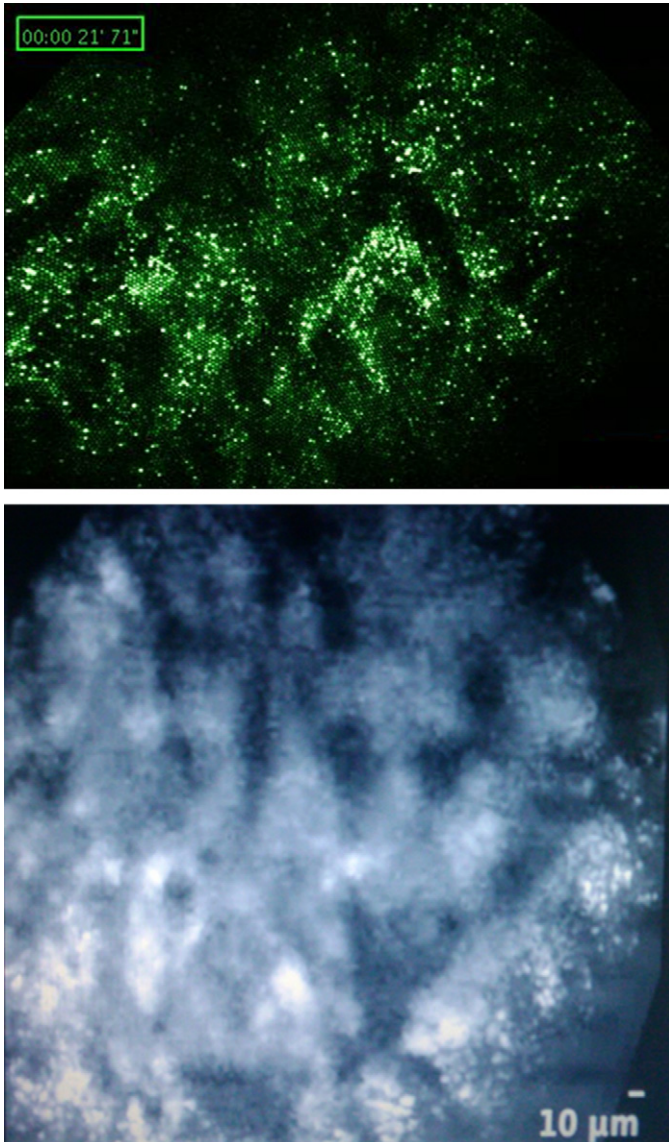


Fig. 5. Image par endoscopie non linéaire à balayage proximal d'un fantôme fluorescent : image brute (haut) et image traitée (bas).

de long et une lentille GRIN est fixée à la partie distale afin de focaliser le faisceau sur l'échantillon. Un système de balayage Mauna Kea Technologies (constitué d'un miroir résonant et d'un miroir galvanométrique) permet l'injection du faisceau cœur par cœur successivement. Le spectromètre est remplacé par un tube photomultiplicateur (PMT – pour Photo-Multiplier Tube, Hamamatsu) qui permet une reconstruction point par point de l'image.

Une première image en 2PEF a été obtenue grâce à ce système (Fig. 5) sur un fantôme composé d'un papier recouvert d'un revêtement fluorescent. À notre connaissance, il s'agit de la première image obtenue par endoscopie non linéaire à balayage proximal. Sur l'image brute nous voyons clairement les différents cœurs du faisceau de fibres avec une brillance inhomogène permettant difficilement l'observation d'une image nette. Un traitement informatique a permis – via un algorithme spécialement dédié, développé par Mauna Kea Technologies – de traiter l'image

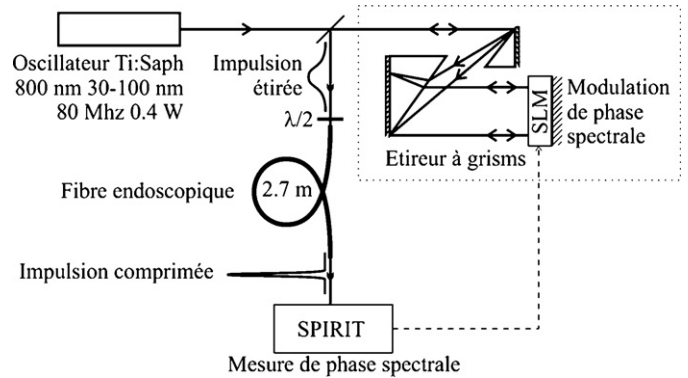


Fig. 6. Schéma expérimental du système de précompensation multimodal.

en comparant les brillances des cœurs selon un déplacement homogène.

6. Système multimodal

Actuellement, nous abordons le développement d'une version du dispositif que l'on peut qualifier de « multimodale » puisque sa fonction est de rendre possible l'affichage des deux modalités d'imagerie SHG et 2PEF simultanément en temps réel sans modification séquentielle des filtres au niveau du système de détection. L'endoscope non linéaire dans sa configuration multimodale (Fig. 6) comprend alors les éléments spécifiques suivants :

- un oscillateur femtoseconde de type MICRA (COHERENT) à bande spectrale ultra-large ajustable pouvant aller jusqu'à 100 nm. Dans ce montage multimodal, la première fibre non linéaire est inutile. En effet, la largeur de bande du MICRA est suffisante pour précompenser l'effet de rétrécissement du spectre se produisant inmanquablement dans les derniers centimètres de l'endoscope ;
- un dispositif de façonnage spectral actif équipé d'un modulateur spatial de lumière (SLM – pour Spatial Light Modulator) programmable à cristaux liquides. Le rôle de cet élément est double : (i) compenser le résidu d'ordre 4 de dispersion (FOD – pour Fourth Order Dispersion) du système pour réduire encore la durée d'impulsion excitatrice en bout d'endoscope et augmenter le rapport signal/bruit, (ii) modifier de façon active, avec un temps de réponse de quelques dizaines de millisecondes, le spectre du signal IR afin d'exciter sélectivement les réponses SHG et 2PEF sans modification séquentielle du filtre en détection. Des travaux antérieurs ont en effet montré qu'il était possible d'optimiser sélectivement l'émission 2PEF ou l'émission SHG en jouant uniquement sur la phase spectrale grâce à un phénomène d'interférence multiphotonique intra-impulsion. Pour le modulateur programmable, nous avons choisi d'utiliser une barrette linéaire à double masque de la marque CRI (Cambridge Research Inc.) capable de moduler l'amplitude et la phase de l'onde optique. Au lieu de placer cet élément dans une ligne à dispersion annulée qui viendrait s'ajouter à l'étireur à grisms de la version unimodale, nous avons choisi d'insérer ce masque programmable

au cœur même de l'étireur à grisms. Au milieu de l'étireur s'affiche transversalement le spectre du signal. En positionnant le SLM à cet endroit, il est alors possible de corriger finement ou de mettre en forme la phase spectrale introduite par l'étireur.

Cette seconde configuration multimodale possède en outre de nombreux éléments en commun avec la configuration unimodale : le système de balayage laser, le guide d'image endoscopique, dont la longueur est maintenant de 2,7 m, le détecteur et le système d'enregistrement des images sont inchangés. Seul le système de traitement d'image devra être adapté afin de permettre l'affichage multimodal en temps réel.

Tout d'abord l'architecture multimodale (i.e. sans première fibre et avec oscillateur à bande ultra-large) sans SLM s'est avérée supérieure à la version unimodale. Des impulsions de 1 nJ et de durée record égale à seulement 18 fs ont été mesurées à l'extrémité d'une fibre à large aire modale de 2,7 m. Avec une fibre standard, cette durée est égale à 25 fs. Nous n'avons pas encore fait de test avec le guide d'image Fujikura mais il est certain qu'une amélioration est à attendre de ce côté-là également.

Le SLM que nous utilisons possède 640 pixels de 100 μm de large chacun. Il est piloté par le logiciel Labview. Le faisceau dispersé à l'intérieur de l'étireur à grisms à l'endroit où est positionné le SLM a un diamètre de ≈ 6 mm. Ainsi approximativement seulement 60 pixels seront actifs dans l'étireur. La résolution spectrale de l'affichage spectral à cet endroit est égale à ≈ 10 nm pour un spectre se situant entre 60 et 90 nm selon les conditions expérimentales. Par ailleurs, la phase à corriger est modérée ($\approx 1,5 \pi$). Dans ces conditions, le nombre réduit de pixels actifs devraient être suffisant.

Enfin nous avons également mis au point un dispositif de mesure d'impulsions ultra-courtes pour qu'il soit positionné à la sortie de la fibre endoscopique. Cet appareil de conception originale se nomme SPIRIT pour SPECTral Interferometry Resolved In Time. Nous avons dû adapter ce dispositif aux contraintes imposées par la largeur de bande importante du signal à mesurer. En donnant accès à la structure exacte de l'impulsion (ce qui n'est pas le cas des autocorrélateurs utilisés habituellement) SPIRIT permet de mesurer la phase spectrale du signal final. Il permettra alors de définir de façon non ambiguë la modulation de phase devant être imposée par le SLM en amont de la fibre endoscopique pour l'optimisation de l'imagerie du collagène par SHG puis celle de l'élastine par 2PEF.

7. Conclusion

Grâce à la mise au point d'un étireur à grism unimodal nous permettant de précompenser la dispersion de la fibre optique,

nous avons pu développer un endospectroscopie non linéaire accordable en longueur d'onde d'excitation.

Les résultats obtenus sur des échantillons de tissu pulmonaire ont rendu possible l'identification d'une bande spectrale d'excitation pour laquelle les émissions 2PEF de l'élastine et SHG du collagène sont présentes, alors que l'émission 2PEF du collagène a disparu, permettant ainsi une discrimination de ces protéines.

En utilisant le guide d'image Fujikura et le système de balayage Mauna Kea Technologies, nous avons développé un système d'imagerie qui nous a permis d'obtenir la première image endoscopique à balayage proximal de la fluorescence à deux photons d'un fantôme.

Le développement de la ligne de précompensation multimodale permettra d'améliorer ces résultats, d'accroître l'intensité des signaux collectés et donc l'efficacité de notre système.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Remerciements

Les auteurs remercient l'Agence nationale de la recherche pour le financement du projet : *InVivo-ONL ANR-08-TECS-0006-01*.

Références

- [1] Jean F, Bourg-Heckly G, Viellerobe B. Fibered confocal spectroscopy and multicolor imaging system for in vivo fluorescence analysis. *Opt Express* 2007;15:4008–17.
- [2] Thiberville L, Moreno-Swirc S, Vercauteren T, Peltier E, Cavé C, Bourg-Heckly G. In vivo imaging of the bronchial wall microstructure using fibered confocal fluorescence microscopy. *Am J Respir Crit Care* 2007;175:22–31.
- [3] Thiberville L, Salauen M, Lachkar S, Dominique S, Moreno-Swirc S, Vever-Bizet C, et al. Human in vivo fluorescence microimaging of the alveolar ducts and sacs during bronchoscopy. *Eur Respir J* 2009;33:974–85.
- [4] Peyrot DA, Aptel F, Crotti C, Deloison F, Lemaire S, Marciano T, et al. Effect of incident light wavelength and corneal edema on light scattering and penetration: laboratory study of human corneas. *J Refract Surg* 2010;26:786–95.
- [5] Clark SW, Ilday FO, Wise FW. Fiber delivery of femtosecond pulses from a Ti:sapphire laser. *Opt Lett* 2001;26:1320.
- [6] Lefort C, Mansuryan T, Louradour F, Barthélémy A. Pulse compression and fiber delivery of 45 fs Fourier transform limited pulses at 830 nm. *Opt Lett* 2011;36:292–4.
- [7] Peyrot DA, Lefort C, Haidar DA, Mansuryan T, Kruglik S, Sandeau N, et al. Toward nonlinear endomicroscopy for exploration of the pulmonary airways: preliminary spectroscopic study of human lung tissue using a single-mode fibre. *Proc SPIE* 2011;7893:789309.