

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale

WO 2012/160312 A2

(43) Date de la publication internationale
29 novembre 2012 (29.11.2012)

WIPO | PCT

- (51) Classification internationale des brevets :
G02B 21/02 (2006.01) G01N 21/63 (2006.01)
G02B 21/00 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2012/051156
- (22) Date de dépôt international :
23 mai 2012 (23.05.2012)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
1154545 25 mai 2011 (25.05.2011) FR
- (71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : UNIVERSITE DE LORRAINE [FR/FR]; 34, Cours Léopold, F-54000 Nancy (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, Rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : DUMAS, Dominique [FR/FR]; 10Bis, rue Jeannot, F-54000 Nancy (FR). HUPONT, Sébastien [FR/FR]; 34, Rue Chanois, F-54136 Bouxieres Aux Dames (FR).
- (74) Mandataire : RHEIN, Alain; Cabinet Bleger-Rhein, 17, Rue de la Forêt, F-67550 Vendenheim (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : IMPROVED BIOMEDICAL IMAGING WITH MULTIPHOTON EXCITATION

(54) Titre : IMAGERIE BIOMEDICALE PERFECTIONNEE A EXCITATION MULTI PHOTONIQUE

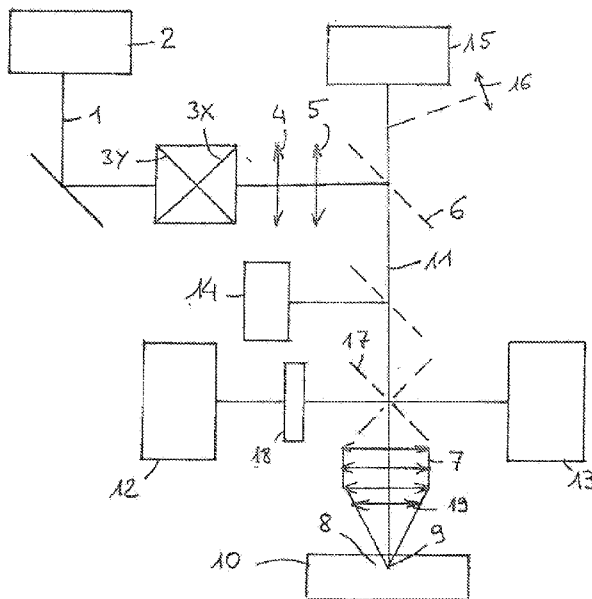


Fig. 1

(57) Abstract : The present invention relates to a MACRO-MULTIPHOTON, in particular with SHG modality (MACRO-SHG), that is to say a biomedical imaging installation, able to implement a multiphoton excitation, of a sample comprising intrinsic chromophores sensitive to excitation by excitation photons (1) having an energy chosen to produce emission photons (11), comprising: at least one source (2) capable of producing pulses of synchronized excitation photons (1), - a means (3) of scanning said pulses of excitation photons (1) through a chosen zone of the sample (10), - means (7, 19) for local focusing of said pulses of excitation photons (1) on said sample (10), and - means (6, 17) for directing the emission photons (11) towards at least one collection zone (12, 13, 14, 15, 16). Said focusing means comprise a variable-magnification optical system. The invention also relates to a method of biomedical imaging using such an installation, as well as to its application for mapping the molecules of collagen of a biological tissue, and/or of cellulose and/or of starch of a plant sample without exogenous marker, and in a non-invasive and non-destructive manner.

(57) Abrégé :

[Suite sur la page suivante]

WO 2012/160312 A2

Publiée :

- *sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport (règle 48.2.g)*

La présente invention concerne un MACRO-MULTIPHOTON, en particulier à modalité SHG (MACRO-SHG), c'est-à-dire une installation d'imagerie biomédicale, apte à mettre en œuvre une excitation multi photonique, d'un échantillon comprenant des chromophores intrinsèques sensibles à l'excitation par des photons d'excitation (1) ayant une énergie choisie pour produire des photons d'émission (11), comprenant : au moins une source (2) capable de produire des impulsions de photons d'excitation (1) synchronisés, - un moyen de balayage (3) desdites impulsions de photons d'excitation (1) à travers une zone choisie de l'échantillon (10), - des moyens (7, 19) de mise au point locale desdites impulsions de photons d'excitation (1) sur ledit échantillon (10), et - des moyens (6, 17) pour diriger les photons d'émission (11) vers au moins une zone de collecte (12, 13, 14, 15, 16), Lesdits moyens de mise au point comportent un système optique à grandissement variable. L'invention concerne également un procédé d'imagerie biomédicale utilisant une telle installation, ainsi que son application pour cartographier les molécules de collagène d'un tissu biologique, et/ou de cellulose et/ou d'amidon d'un échantillon végétal sans marqueur exogène, et de façon non invasive et non destructive.

IMAGERIE BIOMEDICALE PERFECTIONNEE A EXCITATION MULTI PHOTONIQUE

La présente invention se situe dans le domaine de l'imagerie biomédicale.

5 Elle concerne plus particulièrement une installation optique permettant d'obtenir des performances améliorées dans le domaine de l'imagerie biomédicale.

L'imagerie biomédicale est une technique permettant d'observer des surfaces du corps ou d'organes, ainsi que des
10 éléments légèrement sous la surface de la peau ou des organes. Les développements récents tendent à rendre accessibles à l'observation des zones plus profondes, pour assister le médecin dans sa recherche et son observation en vue d'établir un diagnostic.

15 Différentes solutions ont été proposées pour améliorer les images biomédicales. Ainsi, la microscopie confocale à balayage laser, qui permet de limiter la détection des signaux à ceux émanant du plan focal à l'exclusion des autres signaux, ce qui permet d'augmenter la résolution (de l'ordre de 300 nm latéralement - xy - et 400 nm spatialement - yz).

La microscopie multi photonique permet de concentrer l'excitation en un point très précis, et d'augmenter l'énergie en sommant l'énergie d'au moins deux photons, et donc d'accéder à des profondeurs plus importantes du fait de l'irradiation
25 dans l'infra-rouge (> 700nm typiquement) sur les tissus vivants. Elle nécessite l'utilisation de lasers impulsionnels de fréquence variable (80 MHz par exemple) capables d'émettre un train d'impulsions de photons avec des périodes de l'ordre de 10 à 13 ns. On parle de laser femto seconde, car la largeur
30 à mi-hauteur des impulsions est de l'ordre d'une centaine de femtosecondes ($1 \text{ fs} = 10^{-15}$ secondes). Il s'agit d'un régime sub-picoseconde.

La microscopie SHG, pour « Second Harmonic Generation », génération de second harmonique, terme généralement utilisé
35 dans le présent document pour le second, mais aussi pour les multiples harmoniques, utilise le phénomène d'émission de

multiples harmoniques (Second, Tierce, ...) sans nécessairement ajouter des agents de contraste, et permet d'obtenir de très bons résultats en microscopie.

Ces solutions de l'état de la technique (visible ou infra-
5 rouge) permettent d'obtenir des images de bonne qualité, mais nécessitent le prélèvement d'un échantillon pour le disposer sur le microscope au contact direct de celui-ci.

Or en imagerie biomédicale, il est souvent souhaitable de pouvoir observer une partie d'un corps ou organe directement en
10 place (in situ). Cela est possible avec des macroscopes, permettant d'observer à une distance de travail supérieure au centimètre, une zone par exemple de peau d'une dimension de quelques millimètres. Mais ces macroscopes ne permettent pas d'accéder à une résolution microscopique, comme le permettent
15 les microscopes. A l'opposé, les microscopes permettent d'atteindre la résolution souhaitée, mais nécessitent une distance de travail souvent inférieure au millimètre (170 μm pour une observation sous lamelle), et au maximum de 2 ou 3 millimètres, et ne permettent d'observer en une seule fois que
20 des zones de dimension bien inférieure au millimètre (champs d'observation de l'ordre de 50 à 500 μm).

Plusieurs documents, comme le document US20040263959, décrivent une solution de type microscope, couplée à un déplacement de l'échantillon, permettant ainsi par une
25 pluralité de vues reconstituées en mosaïque, de couvrir un échantillon de taille macroscopique.

Le document US2004004194 propose une idée permettant de réaliser une observation macroscopique d'un échantillon, puis de sélectionner une zone précise à partir de l'image
30 macroscopique, de changer de composants optiques, et d'effectuer une observation microscopique de la zone sélectionnée. Néanmoins, il reste nécessaire d'avoir un contact avec l'échantillon dans la phase de l'observation microscopique, et de plus, le document se contente de présenter
35 des idées, omettant de donner des solutions.

Le document DE 10 2004 034992 divulgue un microscope confocal intégrant un zoom optique en vue de compenser les variations de la focale due à l'objectif du microscope. Ce document ne divulgue aucune solution permettant l'observation
5 en profondeur d'un échantillon, et les dispositifs tels qu'ils sont divulgués dans ce document ne conviennent pas à une telle observation en profondeur.

Le document DE 10 2007 048 089 divulgue une installation de microscopie avec un scanner, une source laser et un zoom,
10 pour permettre l'observation macroscopique et microscopique d'un échantillon sans changer d'objectif. Néanmoins ce dispositif ne permet pas d'observation en profondeur d'un échantillon, ce qui limite très nettement son intérêt dans le domaine de l'imagerie médicale.

Il existe donc un besoin non couvert par l'état de la technique, d'une solution permettant une observation d'un échantillon macroscopique avec une distance de travail de type macroscopique tout en obtenant une résolution propre de type microscopique, et avec une profondeur d'observation compatible
15 avec les besoins de l'imagerie médicale.

La présente invention se propose de remédier à au moins une partie des inconvénients précités et propose une solution qui permette une observation d'un échantillon macroscopique, par exemple d'une dimension supérieure à 5 mm, avec une
25 distance de travail de type macroscopique, par exemple supérieure à 1 cm, tout en obtenant une résolution de type microscopique, de l'ordre du demi-micron ou en-dessous, et des profondeurs d'observation compatibles avec les besoins de l'imagerie médicale.

A cet effet, l'invention concerne une installation d'imagerie biomédicale apte à mettre en œuvre une excitation multi photonique d'un échantillon comprenant des chromophores intrinsèques sensibles à l'excitation par des photons
30 d'excitation ayant une énergie choisie pour produire des photons d'émission, comprenant :

- au moins une source capable de produire des impulsions de photons d'excitation synchronisés,
- un moyen de balayage des impulsions à travers une zone choisie de l'échantillon,
- 5 - des moyens de mise au point locale des impulsions sur ledit échantillon, et
- des moyens pour diriger les photons d'émission vers au moins une zone de collecte,

Cette installation est particulière en ce que lesdits
10 moyens de mise au point comportent un système optique à grandissement variable situé entre ledit moyen de balayage et ledit échantillon.

Une telle installation est apte en focale courte à confiner efficacement l'énergie par impulsion, temporellement
15 et spatialement, dans un volume focal suffisamment petit pour entraîner l'absorption d'au moins deux photons. Le fait de situer le système optique à grandissement variable entre le moyen de balayage et l'échantillon permet de positionner ledit système optique très près de l'échantillon, et améliore la
20 qualité des images obtenues, même en profondeur.

Selon d'autres caractéristiques :

- lesdits moyens pour diriger les photons d'émission vers au moins une zone de collecte peuvent être configurés pour diriger lesdits photons d'émission vers au moins une zone de
25 collecte sans passer par ledit moyen de balayage ; cette configuration permet d'améliorer la résolution des images obtenues,

- lesdits photons d'excitation peuvent être des photons dont la longueur d'onde est dans l'infra-rouge ; en utilisant
30 l'infra-rouge en modalité multi-photon, on obtient une meilleure pénétration, tout en évitant des rayons plus nocifs pour des échantillons biologiques,

- ladite installation peut être configurée pour que lesdits photons d'émission soient des photons de second
35 harmonique, permettant d'améliorer encore la performance de

spécificité de détection, de non-invasivité (pas d'introduction d'agents de contraste), et de l'observation en termes de résolution et/ou de profondeur,

• ledit système optique peut être configuré pour permettre à l'installation de produire une image d'un échantillon, avec une distance de travail supérieure à un centimètre, de préférence supérieure à 19 mm ; cette disposition permet de travailler directement sur une partie d'un corps ou partie d'organe in situ, sans prélèvement d'échantillon,

• ledit système optique peut comprendre un mécanisme de déplacement suivant l'axe optique d'un ensemble de lentilles configuré pour permettre un grandissement variable d'un facteur de zoom dudit système optique au moins égal à 2, de préférence au moins égal à 5 pour permettre un agrandissement donnant accès à des informations pertinentes d'un point de vue microscopiques, idéalement au moins égal à 10, pour donner accès au maximum d'informations microscopiques, et configuré pour réaliser un grandissement dudit système optique allant jusqu'à au moins 300, de préférence jusqu'à au moins 500 ; ces dispositions permettent d'obtenir d'excellents résultats de résolution en focale courte, tout en permettant des observations de zones étendues en focale longue,

• ledit système optique peut comprendre des lentilles apochromatiques, permettant d'assurer la correction d'aberrations chromatiques et sphériques ; ce type de lentilles est bien connu de l'homme du métier, et son intégration dans un système optique de l'invention ne présente aucune difficulté particulière,

• ladite source peut être une source laser impulsienne avec une largeur d'impulsion inférieure à la picoseconde, permettant la production impulsienne de photons d'excitation à des intervalles suffisamment rapprochés pour produire une émission de photons suite à une excitation multi photonique,

• ledit moyen de balayage peut être un système de miroirs galvanométriques, permettant d'obtenir une excellente précision de visée, et l'effet d'un zoom digital.

L'invention concerne également une méthode d'imagerie biomédicale d'un échantillon comprenant des chromophores intrinsèques sensibles à l'excitation par des photons d'excitation ayant une énergie choisie pour produire des photons d'émission, comprenant les étapes suivantes :

• production d'impulsions de photons d'excitation synchronisés d'au moins une longueur d'onde choisie,

• les impulsions sont localement portées sur une zone choisie de l'échantillon pour que ses chromophores intrinsèques absorbent les groupes d'au moins deux photons synchronisés et se désexcitent en émettant des photons d'émission ; l'énergie de ces photons d'émission est fonction de leur nature respective (diffusion, réflexion de fluorescence), et peut être de la même longueur d'onde que les photons d'émission (diffusion), supérieure (fluorescence) ou de longueur d'onde moitié dans le cas d'émission de second harmonique,

• les photons émis par l'échantillon (photons d'émission) sont dirigés vers au moins une zone de collecte.

La méthode est particulière en ce que, pour porter les impulsions de photons d'excitation sur la zone choisie, ainsi que pour diriger les photons d'émission, émis par l'échantillon suite aux impulsions de photons d'excitation, vers la zone de collecte, lesdites impulsions de photons d'excitation et lesdits photons d'émission traversent un système optique à grandissement variable. Un tel système optique est apte, en focale courte, à confiner l'énergie temporellement, et spatialement dans un volume focal suffisamment petit pour entraîner l'absorption quasi-simultanément d'au moins deux photons.

En arrivant dans ladite zone de collecte, les photons sont traités selon des procédés connus de l'homme du métier, permettant de rendre visible et/ou exploitable les informations recherchées dans les échantillons.

L'avantage découlant de la présente invention consiste en ce qu'elle permet d'obtenir des images biomédicales avec des résolutions proches de celles obtenues en microscopie, sans nécessiter le prélèvement d'un échantillon, en travaillant
5 directement in situ sur des tissus, une partie d'un organe ou du corps.

Selon un mode avantageux de réalisation de l'invention, la méthode comprend en outre les étapes suivantes :

- observation macroscopique de l'échantillon par la focale
10 longue du système optique,
- choix d'une zone de l'échantillon à observer plus finement,
- réglage dudit système optique en focale courte,
- observation microscopique de ladite zone.

15 L'installation d'imagerie biomédicale peut être utilisée par exemple pour cartographier les molécules de collagène d'un tissu biologique, et/ou de cellulose et/ou d'amidon d'un échantillon végétal, sans marqueur exogène, et de façon non invasive et non destructive.

20 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention ressortiront de la description détaillée qui va suivre se rapportant à un exemple de réalisation donné à titre indicatif et non limitatif.

25 La compréhension de cette description sera facilitée en se référant aux dessins joints, dans lesquels :

- la figure 1 représente une vue schématique d'une installation selon l'invention ;
- les figures 2 et 3 montrent deux images en mode réflexion (objectif 2x) d'un échantillon de peau humaine pour
30 deux valeurs extrêmes de grandissement (X40 fig. 2, et x230 fig. 3),
- la figure 4 illustre la discrimination des signaux de fluorescence (T2, 2216ps) et de second harmonique (T1, 200ps) sur la base des déclins de signal mesuré sur la peau humaine

(excitation multiphotonique à 800nm) au Macroscope en modalité TCSPC (voir définition ci-après),

• la figure 5 montre la composante T1 (200ps) spécifique du signal de second harmonique mesuré à 400 nm sur la peau humaine (excitation multiphotonique à 800nm) au Macroscope en modalité TCSPC,

• la figure 6 montre la composante T2 (200ps) spécifique du signal de fluorescence mesuré entre 450nm et 600 nm sur la peau humaine (excitation multiphotonique à 800nm) au Macroscope en modalité TCSPC,

• la figure 7 illustre des spectres du signal de second harmonique provenant de coupes de peau humaines.

Dans l'installation de la figure 1, la lumière d'excitation 1 est produite par une ou plusieurs raies lasers possibles, issue du banc laser 2. Ce système émet des impulsions photoniques ultracourtes à différentes longueurs d'onde dans l'infra-rouge, avec de préférence une énergie crête suffisante pour entraîner le processus photo physique d'absorption multi photonique, une enveloppe de la largeur d'impulsion étroite (de l'ordre de 100 à 200 fs) et dont la périodicité est définie par la cadence de tir de la source 2 (80 MHz par exemple). Une installation avec absorption multi photonique sera ici appelé un « macro-multiphoton ».

Le faisceau laser 1 est alors orienté vers un ensemble de deux miroirs galvanométriques couplés 3X et 3Y pour le balayage ponctuel dans les directions X et Y, ce qui dirige le faisceau sur un ensemble de deux lentilles convergentes 4 et 5. Via un miroir plat 6 en option, les deux lentilles 4 et 5 conjuguent le plan du miroir galvanométrique 3X ou 3Y avec la distance focale arrière d'un macrozoom 7, couplé à un objectif 19 qui concentre la lumière d'excitation 1 à un point focal donné 8 dans l'échantillon 10. Ce point focal peut être en position axiale 9, c'est à dire sur l'axe optique des lentilles 4,5 et 7 et 19, ou éloigné de l'axe en fonction de la position des miroirs galvanométriques 3.

Le faisceau d'excitation 1, entre 5 et 7, est collimaté, et les photons émis en retour 11 par l'échantillon doivent être également collimatés, ce qui simplifie la conception optique. De ce fait, l'espace libre entre 5 et 7 est assez grand pour la
5 mise en œuvre de ports de détection 12, 13 et 14 pour une meilleure efficacité de détection.

Un macrozoom 7 a été testé avec succès, il s'agit d'un macrozoom commercialisé sous la référence Z16APO A de la marque Leica Microsystems, dont les caractéristiques optiques sont un
10 grandissement pouvant varier entre 4,6 et 53 quand il est couplé à un objectif de grossissement 0,5, et entre 46 et 535 quand il est couplé à un objectif de grossissement 5 (avec 10x pour les oculaires). Le facteur de zoom de ce macrozoom est donc de $53 / 4,6 = 535 / 46 = 11,5$.

15 Ce macrozoom 7, couplé à l'objectif 19, est apte à confiner l'énergie temporellement, et spatialement dans un volume focal suffisamment petit pour entraîner l'absorption quasi-simultanée d'au moins deux photons.

L'échantillon 10 est en général un échantillon épais avec
20 une observation limitée à un seul côté (côté laser incident à l'excitation). Les photons émis par l'échantillon suite à l'excitation par la source 2 reviennent par le même chemin formant le faisceau de retour 11, et repassent dans le macrozoom 7, pour être transmis, selon les dispositions des
25 miroirs 17 et 6 vers les ports de détection 12, 13, ou 14 ou vers un capteur photographique 15, ou vers l'oculaire 16.

On peut aussi utiliser le dispositif en mode transmission, en installant un deuxième macrozoom 7 et objectif 19 sous l'échantillon 10, ainsi qu'un port de détection et un écran de
30 décharge.

Les signaux de l'échantillon 10 résultant du faisceau de retour 11 peuvent être détectés sur le port de détection 12. Cela implique un miroir 17 qui peut être déplacé le long du chemin optique et orienté sur l'axe optique du macrozoom pour
35 diriger la lumière dans une direction vers 12. Ce port de

collection peut être équipé pour l'imagerie (camera) ou la spectroscopie (analyse spectrale).

Les photons d'émission (la lumière), émis par l'échantillon, sont réfléchis par le miroir dichroïque 17 et vont d'abord à travers un ensemble "obturateur / filtre modulaire" 18, pour protéger le capteur 12, et pour installer une sorte quelconque de filtre de densité chromatique ou neutre (moitié de la longueur d'onde d'excitation) ou autres moyens dispersifs, nécessaire pour analyser la réponse optique non linéaire de l'échantillon 10 (second harmonique).

La méthode selon l'invention s'applique principalement à des échantillons volumineux qui restent intacts dans leur contexte anatomique, comme une partie (au moins) d'un corps humain ou animal. Elle est particulièrement adaptée à cette application du fait de la grande distance de travail à laquelle on peut obtenir une résolution d'ordre microscopique.

L'imagerie non-linéaire d'un échantillon 10 comprend au moins les étapes mentionnées ci-après.

Dans une première étape, on produit des impulsions 1 de photons synchronisés d'au moins une longueur d'onde choisie dans l'infra-rouge, avec la source 2.

Dans une deuxième étape, les impulsions photoniques sont localement portées sur une première partie d'une zone choisie (région d'intérêt) de l'échantillon 10 pour que ses chromophores intrinsèques absorbent les groupes d'au moins deux photons synchronisés et se désexcitent en émettant des photons en fonction de leur nature respective (plus précisément de leurs transitions d'énergie spécifique) et de la longueur d'onde d'excitation. Il est à noter que le phénomène d'émission de multiples harmoniques ne requiert pas d'absorption au sens photo physique du terme, mais son utilisation fait également partie de la présente invention. Une installation correspondante sera appelée un « macroSHG », pour « Macroscopy Second Harmonic Generation », génération de second harmonique, terme généralement utilisé pour le second, mais aussi pour les multiples harmoniques. Les paramètres de la source 2 à mettre

en œuvre pour obtenir une génération de second ou de multiple harmonique sont bien connus de l'homme du métier. L'objet de l'invention est d'appliquer ce principe dans un contexte nouveau.

5 Dans une troisième étape, les photons émis 11 par l'échantillon 10 (photons d'émission) sont dirigés vers au moins une zone de collecte située en 12, 13, 14 ou 15.

Ces zones de collecte sont équipées selon le cas de différents moyens connus aptes à rendre exploitables ou
10 visibles lors d'étapes complémentaires les observations rendues possibles par l'invention. De telles étapes sont décrites ci-après à titre d'exemple, mais l'homme du métier saura adapter le moyen le plus approprié à chaque type d'observation.

Dans une quatrième étape, les photons d'émission 11 sont
15 détectés, quelle que soit leur énergie, par un détecteur 12, 13, 14, 15 ou 16, par exemple un détecteur de points, avec une grande sensibilité sur la plus vaste région possible du spectre, allant de la région UV au proche infra-rouge (NIR), par exemple autour de $800/2 = 400$ nm pour le signal de second
20 harmonique.

Les seuls filtres de l'installation sont ceux utilisés pour rejeter la lumière d'excitation 1 et sélectionner le signal émis en multiples harmoniques. Donc, on réalise une intégration spectroscopique, de la plus grande région
25 accessible du plan (λ, τ) , (ou longueur d'onde, instant d'arrivée ou durée de vie), résultant de l'émission chromophore intrinsèque produite par tous les mécanismes possibles photo physiques (radiatif de voies de désexcitation), comme par exemple, l'émission de fluorescence, Raman et diffusion de
30 Rayleigh, ou l'émission de second harmonique.

Cette étape vise à l'imagerie d'échantillonnage spatiale 2D ou 3D d'émissions des photons à l'aide de sa réponse optique non linéaire intrinsèque des molécules concernées dans les systèmes biologiques.

35 Dans une cinquième étape, le détecteur 12, 13, 14, 15 ou 16 convertit les photons collectés d'abord en un signal

physique analogique ou numérique, par exemple une tension ou un courant, puis en des données représentatives au moins de leur nombre. Les données sont ensuite stockées en correspondance avec au moins les impulsions temporelles qui font que les chromophores intrinsèques produisent des photons d'émission corrélés en temps.

On obtient ainsi en un seul balayage un fichier des données stockées représentant l'image de la zone de l'échantillon 10 choisi, avec une résolution submillimétrique, et en fonction des impulsions temporelles et spectrales.

Après avoir appliqué cette méthode avec un faible grandissement, on obtient une image macroscopique d'une zone de plusieurs centimètres d'un échantillon 10, permettant d'avoir une vue d'ensemble. On peut alors sélectionner une partie de cette zone, et « zoomer dessus », c'est-à-dire régler le macrozoom 7 à un grandissement plus fort pour voir en image microscopique un détail de la zone, et cela sans changer d'objectif, et en restant à une distance de travail (distance entre objectif et zone à observer) macroscopique. Les fig. 2 et 3 illustrent une telle démarche sur un échantillon de peau humaine en mode réflexion avec un objectif 2x, entre l'image prise à un grandissement de x2 (fig. 2), et l'image prise à un grandissement de x230 (fig. 3), ce qui donne un facteur de zoom de $230/2 = 115$, avec le même objectif, et avec une distance de travail similaire, de l'ordre de 5 cm.

On peut aussi effectuer la première image toujours avec l'objectif 2x, avec le macrozoom 7 réglé pour un grandissement de x20, et l'image de détail avec le même objectif 19 et le macrozoom 7 réglé pour un grandissement de x230, ce qui donne un facteur de zoom de 11,5.

Le réglage des paramètres optiques est bien connu de l'homme du métier, et il n'est pas nécessaire ici de préciser les objectifs à sélectionner pour obtenir un grandissement déterminé, ou une distance de travail déterminé.

Le détecteur est capable de discriminer les différentes longueurs d'onde λ et/ou instant d'arrivée (ou durée de vie) τ ,

les données sont également stockées en correspondance avec la longueur d'onde et/ou l'instant d'arrivée. Pour la durée de vie (τ), le mode FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, pour microscopie à images selon la durée de vie de la fluorescence) avec la technologie TCSPC (Time correlated Single Photon Counting, pour comptage de photons uniques corrélé en temps) donne accès à la courbe de décroissance d'intensité (voir fig. 4). Elle est caractérisée par deux composantes, une courte attribuée à la génération de second harmonique (T1) et une plus longue attribuée à la fluorescence (T2). Un index a été défini comme le rapport des deux constantes de temps (T2/T1) caractéristique du contenu en collagène et du niveau d'auto fluorescence global. Le principe de l'index (T2/T1) en TCSPC est décrit dans l'article suivant :

(Dumas Dominique, Henrionnet Christel, Hupont Sébastien, Werkmeister Elisabeth, Stoltz Jean-François, Pinzano Astrid, Gillet Pierre. Innovative TCSPC-SHG microscopy imaging to monitor matrix collagen neo-synthesized in bio scaffolds. Bio-medical materials and engineering 2010;20(3):183-8.)

Cette modalité TCSPC (carte SPC730, Becker&Hickl Berlin, détecteur PMC100) a été implémentée sur un « macro-multiphoton » pour cartographier à l'aide d'un macrozoom des matériaux collagéniques et discriminer les composantes T1 (signal de second harmonique) et T2 (fluorescence). La composante T1 (200 ps) indique le collagène détecté au niveau d'un échantillon de peau voir fig. 5 et 6. On peut ainsi voir le collagène sans marquage de l'échantillon.

La figure 7 illustre des spectres du signal de second harmonique, obtenus au microscope, variant de 410 à 430 nm (Em pour émission), provenant de coupes de peau humaines à l'aide d'une excitation multi photonique variant de 820 à 860 nm (EX pour excitation). Elle met bien en évidence la longueur d'onde moitié obtenue en second harmonique (SHG) au niveau d'un échantillon de peau au microscope (MacroSHG).

Bien que l'invention ait été décrite à propos d'une forme de réalisation particulière, il est bien entendu qu'elle n'y

est nullement limitée et qu'on peut y apporter diverses modifications de formes, de matériaux et de combinaisons de ces divers éléments sans pour cela s'éloigner du cadre de l'invention.

Revendications

- 1) 1) Installation d'imagerie biomédicale apte à mettre
5 en œuvre une excitation multi photonique d'un échantillon (10)
comprenant des chromophores intrinsèques sensibles à
l'excitation par des photons d'excitation (1) ayant une énergie
choisie pour produire des photons d'émission (11), comprenant :
- au moins une source (2) capable de produire des
10 impulsions de photons d'excitation (1) synchronisés,
 - un moyen de balayage (3) desdites impulsions de
photons d'excitation (1) sur une zone choisie de l'échantillon
(10),
 - des moyens (7, 19) de mise au point locale desdites
15 impulsions de photons d'excitation (1) sur ledit échantillon
(10), et
 - des moyens (6, 17) pour diriger les photons
d'émission (11) vers au moins une zone de collecte (12, 13, 14,
15, 16),
- 20 caractérisée en ce que lesdits moyens de mise au point
comportent un système optique (7) à grandissement variable
situé entre ledit moyen de balayage (3) et ledit échantillon
(10).
- 2) Installation selon la revendication précédente, dans
25 laquelle lesdits moyens pour diriger les photons d'émission
(11) vers au moins une zone de collecte (12, 13, 14, 15, 16)
sont configurés pour diriger lesdits photons d'émission (11)
vers au moins une zone de collecte (12, 13, 14, 15, 16) sans
passer par ledit moyen de balayage (3).
- 30 3) Installation selon l'une des revendications
précédentes, dans laquelle lesdits photons d'excitation (1)
sont des photons dont la longueur d'onde est dans l'infra-
rouge.

4) Installation selon l'une des revendications précédentes, configurée pour que lesdits photons d'émission (11) soient des photons de second harmonique.

5) Installation selon l'une des revendications précédentes dans laquelle ledit système optique (7) est configuré pour permettre à l'installation de produire une image d'un échantillon (10), avec une distance de travail supérieure à un centimètre, de préférence supérieure à 19 mm.

6) Installation selon l'une des revendications précédentes dans laquelle ledit système optique (7) comprend un mécanisme de déplacement suivant l'axe optique d'un ensemble de lentilles configuré pour permettre un grandissement variable dudit système optique d'un facteur de zoom au moins égal à 2, de préférence au moins égal à 10, et configuré pour réaliser un grandissement dudit système optique allant jusqu'à au moins 300, de préférence jusqu'à au moins 500.

7) Installation selon l'une des revendications précédentes, dans laquelle ledit système optique (7) comprend des lentilles apochromatiques.

8) Installation selon l'une des revendications précédentes dans laquelle ladite source (2) est une source laser impulsionnelle avec une largeur d'impulsion inférieure à la picoseconde.

9) Installation selon l'une des revendications précédentes dans laquelle ledit moyen de balayage (3) est un système de miroirs galvanométriques.

10) Procédé d'imagerie biomédicale d'un échantillon (10) comprenant des chromophores intrinsèques sensibles à l'excitation par des photons d'excitation (1) ayant une énergie choisie pour produire des photons d'émission (11), utilisant une installation selon l'une des revendications précédentes, et comportant les étapes suivantes :

- production d'impulsions de photons d'excitation (1) synchronisés d'au moins une longueur d'onde choisie,

- les impulsions sont localement portées sur une zone choisie de l'échantillon (10) pour que ses chromophores

intrinsèques absorbent les groupes d'au moins deux photons d'excitation (1) synchronisés et se désexcitent en émettant des photons d'émission (11),

5 - les photons d'émission (11) émis par l'échantillon (10) sont dirigés vers au moins une zone de collecte (12, 13, 14, 15, 16),

caractérisé en ce que, pour porter les impulsions de photons d'excitation (1) sur la zone choisie, ainsi que pour diriger les photons d'émission (11), émis par l'échantillon 10 (10) suite aux impulsions de photons d'excitation (1), vers la zone de collecte (12, 13, 14, 15, 16), lesdites impulsions de photons d'excitation (1) et lesdits photons d'émission (11) traversent un système optique (7) à grandissement variable.

11) Procédé d'imagerie biomédicale selon la revendication 15 précédente, comprenant les étapes suivantes :

- observation macroscopique dudit échantillon (10) par la focale longue du système optique (7),

- sélection d'une zone d'intérêt dudit échantillon (10) à observer plus finement,

20 - réglage dudit système optique (7) en focale courte,

- observation microscopique de ladite zone.

12) Utilisation d'une installation selon l'une des revendications 1 à 7 pour cartographier les molécules de collagène d'un tissu biologique, et/ou de cellulose et/ou 25 d'amidon d'un échantillon végétal, sans marqueur exogène, et de façon non invasive et non destructive.

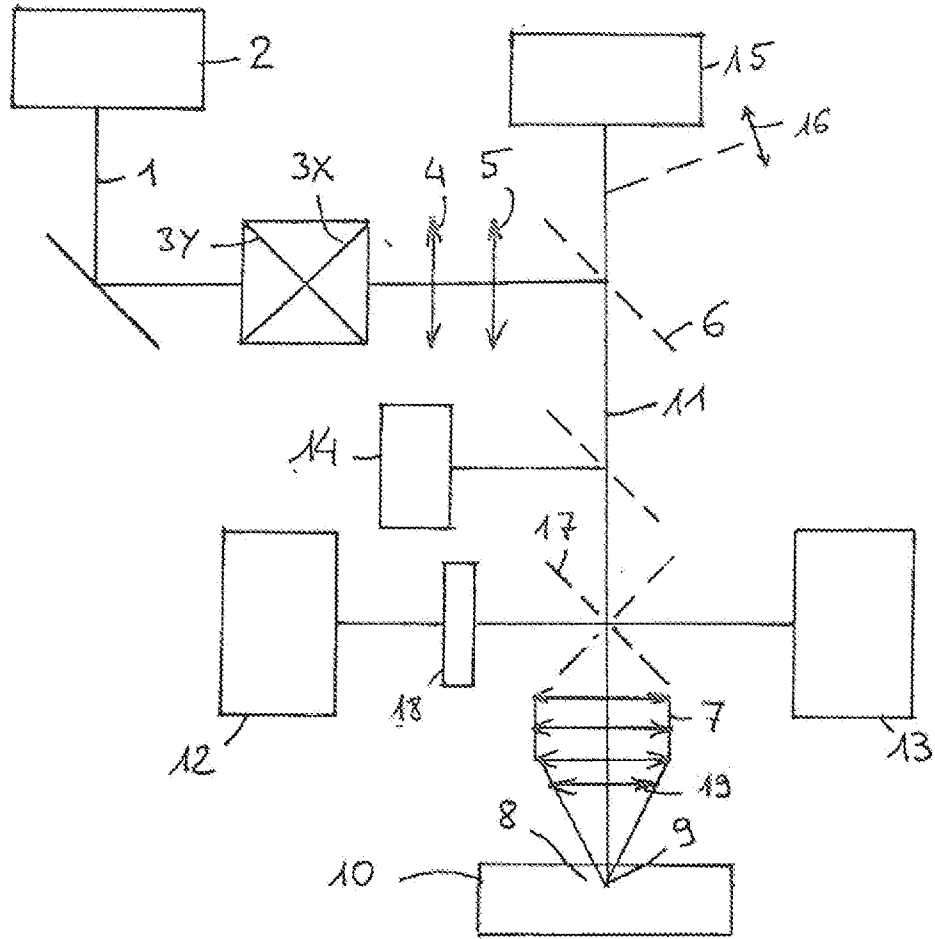


Fig. 1

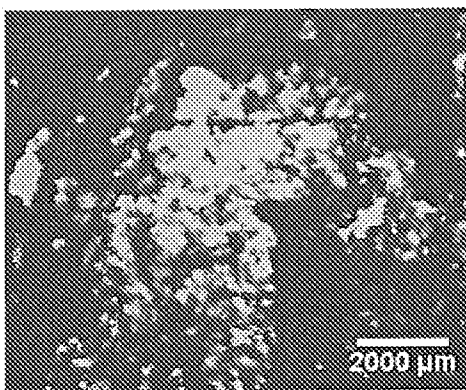


Fig. 2

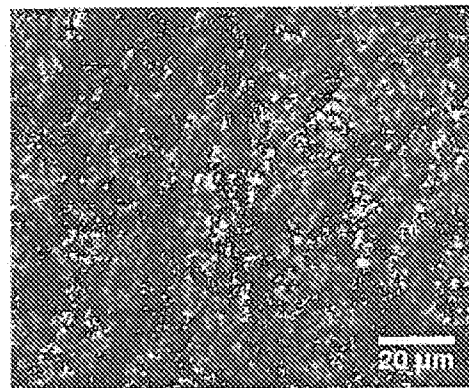


Fig 3

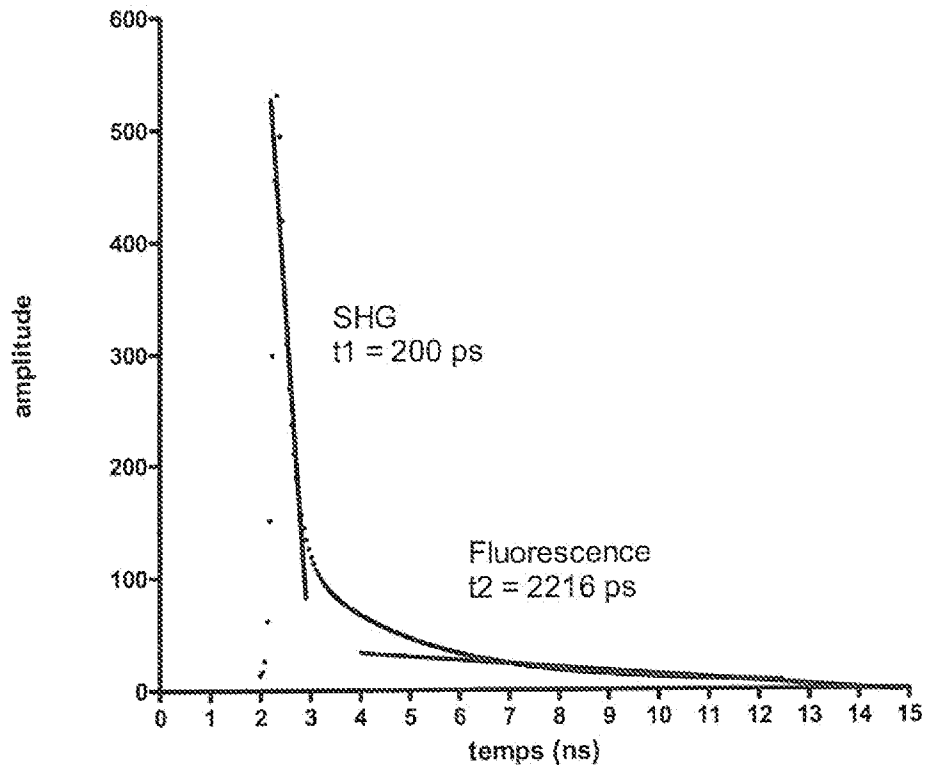


Fig. 4

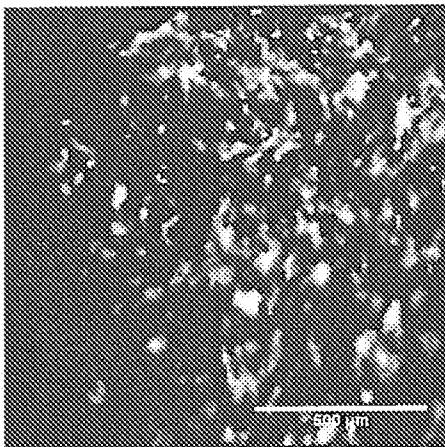


Fig. 5

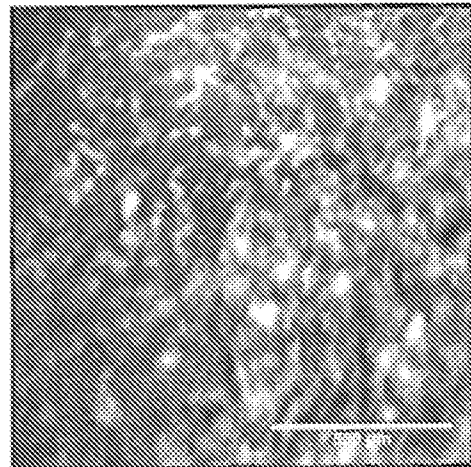


Fig. 6

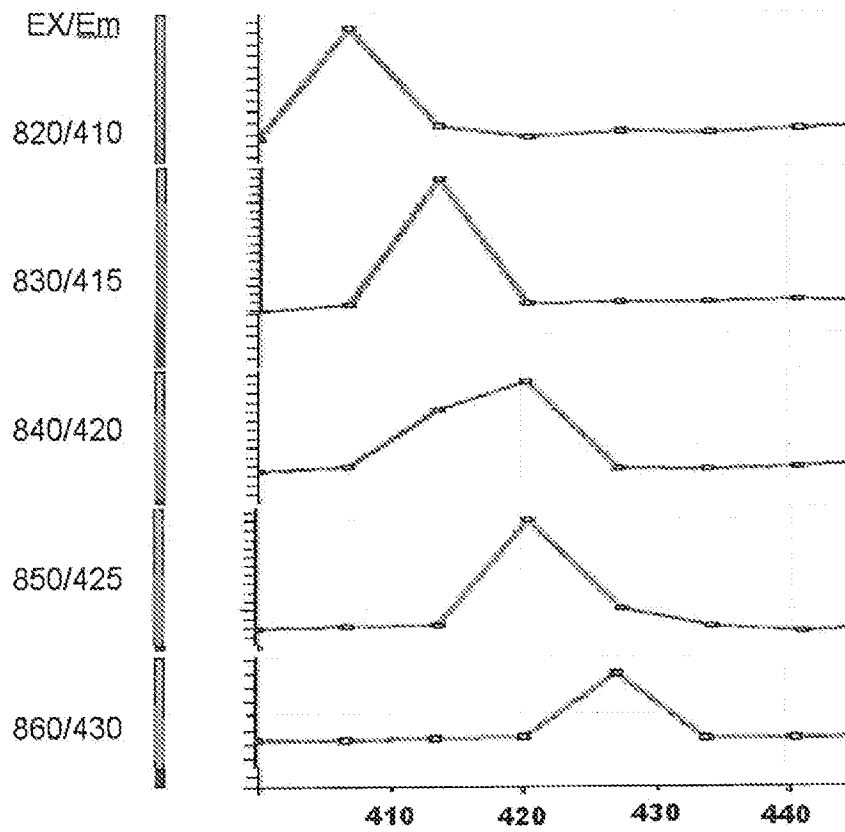


Fig. 7