



Titre: Microscopie non-linéaire pour l'imagerie des cordes vocales
Title:

Auteur: Romain Deterre
Author:

Date: 2012

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Deterre, R. (2012). Microscopie non-linéaire pour l'imagerie des cordes vocales
Citation: [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
<https://publications.polymtl.ca/966/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/966/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Caroline Boudoux
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

MICROSCOPIE NON-LINÉAIRE POUR L'IMAGERIE DES CORDES VOCALES

ROMAIN DETERRE
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)
DÉCEMBRE 2012

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

MICROSCOPIE NON-LINÉAIRE POUR L'IMAGERIE DES CORDES VOCALES

présenté par : DETERRE Romain

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. LEBLOND Frédéric, Ph.D., président

Mme BOUDOUX Caroline, Ph.D., membre et directrice de recherche

M. GODBOUT Nicolas, Ph.D., membre

Alexandrie is everywhere

REMERCIEMENTS

L'échange entre l'École Centrale Paris et l'École Polytechnique de Montréal dans le cadre duquel ce projet de recherche prend place a été pour moi l'opportunité de découvrir le monde de la recherche. Je voudrais ici remercier quelques unes des personnes qui ont contribué à rendre cette expérience très enrichissante.

Avant toute chose, je tiens à remercier Caroline Boudoux pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, et accepté d'être ma directrice de recherche. Merci de m'avoir accordé ton temps pour me donner des conseils et d'avoir aussi vite relu mon mémoire.

Mes remerciements vont également à tous les membres de ce laboratoire pas comme les autres. C'est un plaisir grâce à vous d'aller travailler dans un local sans fenêtre. Je tiens à remercier en particulier :

- Mathias Strupler. Le travail que tu as accompli sur le microscope avant le début de mon projet a rendu possible les résultats présentés dans ce mémoire. Tu as su trouver la solution à un nombre incalculable de problèmes sur le montage, et tu as pris le temps de répondre à toutes mes questions, mêmes celles dont je ne suis pas fier aujourd'hui.
- Fouzi Benboujja. Tu as su me transmettre tes connaissances sur les cordes vocales, et c'est grâce à toi qu'il a été possible d'obtenir rapidement des coupes histologiques adaptées pour la microscopie non-linéaire. Merci également pour toutes les discussions qu'on a eu au laboratoire. On a eu pas mal d'idées folles, mais je pense que certaines méritent d'être brevetées.
- Étienne de Montigny pour toute ton aide en programmation. Nos chasses à la fuite de mémoire le fusil à l'épaule dans la jungle de mon code étaient mémorables.
- Nadir Goulamhousen, pour ton aide précieuse à faire des images de cordes vocales avec le système. Le Ti-Sapph n'écoute plus que toi de toute façon, personne d'autre ne peut prendre d'image.
- Kathy Beaudette pour tes conseils à propos de la rédaction du mémoire et ta relecture.
- Simon Lemire-Renaud pour ton aide sur le montage et ton temps à m'aider à prendre les premières images.

Merci également à l'équipe du docteur Hartnick du *Massachusetts Eye and Ear Infirmary* pour les échantillons de cordes vocales étudiés ici.

Je tiens aussi à remercier Romain Maciejko pour une partie du matériel du microscope non-linéaire. Le plaisir de faire des images est plus fort après avoir pris le temps de mettre le laser en mode impulsif.

Enfin, merci aux organismes qui ont financé ce projet ; le CRSNG et le GRSTB.

RÉSUMÉ

Les cordes vocales sont deux replis de tissus logés dans le larynx et essentiels à la phonation. Malgré l'apparente simplicité de leur principe de fonctionnement, leur structure interne est complexe. Chaque corde est composée de différentes couches de tissus aux propriétés mécaniques variables. La technique de référence pour les étudier, l'histologie, présente l'inconvénient d'être très invasive.

La microscopie non-linéaire est une technique d'imagerie optique qui permet d'imager des échantillons en profondeur de manière non-invasive. De plus, elle offre des modes de contraste qui sont intéressants pour visualiser des protéines fibreuses, l'élastine et le collagène, en partie responsables des propriétés mécaniques des tissus épithéliaux.

Ce projet de recherche s'intéresse à évaluer la capacité de la microscopie non-linéaire à fournir des performances similaires à l'histologie dans le cadre de l'imagerie des cordes vocales.

L'objectif principal est de développer un microscope non-linéaire pour évaluer la capacité de ce type d'imagerie à observer des cordes vocales. La démarche choisie est de faire dans un premier temps des images de coupes fines de cordes vocales pour les comparer à une technique de référence, l'histologie. Dans un second temps, des tests visant à transcrire les résultats obtenus dans le cadre de l'imagerie *in vivo* ont été effectués.

Un système d'imagerie non-linéaire multimodal a été conçu spécifiquement pour permettre les expériences réalisées pendant ce projet. Il a en particulier été équipé pour prendre des images à grand champ de coupes de cordes vocales. Pour ce faire, il a fallu de créer un programme de contrôle du microscope, et un autre de traitement des images obtenues. Après avoir été assemblé, le système a été testé pour vérifier que ses performances s'approchent des limites théoriques définies dans la littérature.

Des coupes fines de cordes vocales ont été obtenues auprès de l'équipe du Pr. Christopher J. Hartnick du *Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Harvard Medical School*. Les spécialistes de cette équipe ont analysé les images histologiques pour extraire de l'information structurelle sur les cordes vocales. Une corrélation a été obtenue entre ces informations et les analyses faites sur les images non-linéaires des mêmes échantillons.

Une première étape pour évaluer la possibilité de transcrire ces résultats vers l'imagerie *in vivo* a été réalisée durant ce projet. Un larynx de porc a été obtenu et les cordes vocales en ont été extraites pour faire des images. Cette expérience a montré qu'il est possible de localiser les différentes macrostructures des cordes vocales avec la microscopie non-linéaire.

ABSTRACT

The vocal cords are two folds of epithelial tissues located in the larynx and are involved in production of the human voice. Despite their apparent simplicity, their internal structure is complex. Each fold can be divided into several layers with different mechanical properties. The gold standard for studying their structure – histology – has the inconvenience of being very invasive.

Non-linear microscopy is an optical imaging technique which allows images to be taken in depth within samples in a non invasive manner. It also offers intrinsic contrasts, allowing the identification of certain fibrous proteins – elastin and collagen – which are responsible for the mechanical properties of epithelious tissues.

The main goal of this research project was to assess nonlinear microscopy’s performances for vocal fold imaging. The study has been broken down in two separate tasks. The first one was to evaluate the nonlinear modalities contrast against histology. For that purpose, we chose to first take images of thin samples and compare them to the corresponding histological slides. The second task was to make tests to transcribe the results obtained to *in vivo* imaging.

A custom-built nonlinear imaging system was used for these experiments. It was developed to allow acquisition of wide-field images. A C++ based software was developed to control the microscope and allow treatment and visualization of the images. After being built, the system was further tested to check its performances in comparison with the theoretical limit as described in the literature.

Thin slices of vocal folds were obtained from the team of Pr Christopher J. Hartnick from Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Harvard Medical School. Specialists from his team analysed the histological samples to extract structural data from the vocal folds. A good correlation was measured between histological and nonlinear data.

A first step in evaluating the possibility for translating these results towards *in vivo* imaging was performed during this project. A swine’s larynx was obtained, and vocal folds were extracted for imaging purposes. This experiment showed that it is indeed possible to localize various macrostructures of the tissues with nonlinear microscopy.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	iii
REMERCIEMENTS	iv
RÉSUMÉ	v
ABSTRACT	vi
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xiv
Chapitre 1 INTRODUCTION	1
Chapitre 2 REVUE DE LITTÉRATURE	3
2.1 La corde vocale	3
2.2 Imagerie médicale appliquée aux cordes vocales	5
2.3 Propositions de recherche	17
Chapitre 3 SYSTÈME D'IMAGERIE	19
3.1 Présentation du système	19
3.2 Choix des composants utilisés	22
3.3 Cahier des charges de la partie logicielle	25
3.3.1 Contraintes communes aux deux logiciels	25
3.3.2 Programme de contrôle du microscope	25
3.3.3 Programme de traitement des images	27
3.4 Implémentation des logiciels	28
3.4.1 Librairie d'interface graphique	28
Chapitre 4 ÉCHANTILLONS OBSERVÉS & PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX	37
4.1 Échantillons observés	37
4.1.1 Coupes histologies	37

4.1.2	Cordes vocales entières	38
4.2	Paramètres d'imagerie	39
Chapitre 5	RÉSULTATS ET DISCUSSION	40
5.1	Caractérisation des performances du microscope	40
5.1.1	Validation des effets physiques	40
5.1.2	Validation de la résolution	42
5.1.3	Séparation des signaux obtenus	44
5.1.4	Rétrodiffusion du signal de seconde harmonique	48
5.1.5	Imagerie non-linéaire de lames colorées pour l'histologie	49
5.1.6	Convention pour l'affichage des images non-linéaires	52
5.2	Analyse des images obtenues	52
5.2.1	Spécimens fétus	53
5.2.2	Spécimens porcins	57
5.2.3	Spécimens humains adultes	60
5.3	Imagerie d'échantillons épais	64
Chapitre 6	CONCLUSION	67
6.1	Synthèse des travaux	67
6.2	Limitations de la solution proposée	68
6.3	Améliorations futures	69
6.3.1	Partie logicielle	70
6.3.2	Partie matérielle	71
	RÉFÉRENCES	72

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 3.1	Liste de différentes infrastructures de GUI, de leur système d'exploitation par défaut et indication de leur portabilité.	28
TABLEAU 4.1	Liste des spécimens étudiés pour ce projet.	38

LISTE DES FIGURES

FIGURE 2.1	Vue dorsale schématique du larynx présentant les cordes vocales. . . .	3
FIGURE 2.2	La structure des cordes vocales telles que décrite par Hirano (1975). .	4
FIGURE 2.3	Schéma de principe de la microscopie optique à grand champ. L'œil nu remplace souvent la caméra illustrée ici.	6
FIGURE 2.4	Schéma de principe de la microscopie confocale à balayage. Le demi-angle α du cône d'illumination est utilisé dans le calcul de l'ouverture numérique de l'objectif.	8
FIGURE 2.5	Diagramme de Jablonski de la fluorescence à un photon (F1P) et de la fluorescence à deux photons (F2P).	11
FIGURE 2.6	Schéma de principe d'un microscope non-linéaire utilisant la fluorescence à deux photons. Une représentation qualitative de la transmittance du miroir dichroïque est trouvée en figure 2.9.	12
FIGURE 2.7	Diagramme de Jablonski représentant la diffusion Rayleigh et la génération de seconde harmonique (GSH).	14
FIGURE 2.8	Représentation de l'énergie potentielle E d'un électron en fonction de sa distance d au noyau. La distance au repos est notée d_0 et l'énergie d'ionisation E_i	15
FIGURE 2.9	Représentation qualitative des spectres des différents phénomènes physiques en œuvre dans un microscope non-linéaire. On considère ici un laser de fréquence ν_l . La superposition entre les spectres de F2P et de GSH constitue une source possible de diaphonie.	16
FIGURE 2.10	Schéma représentant les directions de propagation typiques des photons issus de la génération de seconde harmonique. Le signal généré vers l'avant peut être récupéré même dans un montage en épi-illumination grâce à la diffusion du tissu environnant.	17
FIGURE 3.1	Vue d'ensemble du microscope non-linéaire	20
FIGURE 3.2	Transmittance en fonction de la longueur d'onde des miroirs dichroïques du montage.	22
FIGURE 3.3	Schéma du couple lentille-sténopé du détecteur confocal	24
FIGURE 3.4	Schéma de principe du balayage unidimensionnel représentant l'angle des deux galvanomètres en fonction du temps.	26
FIGURE 3.5	Retour de l'axe rapide du balayage unidirectionnel. On ne garde les points acquis qu'entre t_0 et t_1 . L'opérateur contrôle le ratio $\frac{t_2-t_1}{t_1-t_0}$. . .	26

FIGURE 3.6	Structure de donnée du fichier XML de session d'imagerie.	27
FIGURE 3.7	Diagramme UML (<i>Unified Modeling Language</i>) présentant la classe qui interface les cartes d'acquisition de la marque <i>National Instruments</i> : NIDevice. Cette classe dérive d'une autre, plus générique (Acquisition-Device) à laquelle le reste du programme fait référence.	30
FIGURE 3.8	Exemple d'assistant de configuration (Configuration réseau pour Windows XP).	31
FIGURE 3.9	Capture d'écran du logiciel de contrôle du microscope. Les rectangles exposent la partie centrale (A), les barres latérales (B et C) et le registre du programme (D).	32
FIGURE 3.10	Capture d'écran du logiciel de contrôle du microscope montrant en partie centrale l'éditeur de texte du module de script.	33
FIGURE 3.11	Capture d'écran du logiciel de traitement des images. La liste des images correspond au rectangle (A), et le panneau de paramètres d'affichage se trouve en (B).	35
FIGURE 3.12	Pile en Z (direction de la profondeur dans l'échantillon) visualisé avec le logiciel de traitement des images.	36
FIGURE 4.1	Présentation de la direction des coupes histologiques prises sur les échantillons de cordes vocales. Les flèches indiquent la position des marquages faits à l'encre.	38
FIGURE 4.2	Étapes de préparation des larynx de porc pour l'imagerie. A : ouverture du larynx, avec les cordes vocales (vc), le cartilage thyroïde (t) et l'épiglotte (e). B : section selon le plan sagittal. On identifie la fausse corde (fc), le ventricule (v) et la vraie corde (vc). C : placement sur une lamelle de microscope après humidification. Une lame de scalpel (s) sert pour la localisation.	39
FIGURE 5.1	Représentation des positions du volume focal de l'objectif par rapport à une lame fluorescente qui offre le signal le plus élevé en microscopie confocale (Position A) et en fluorescence à deux photons (Position B).	41
FIGURE 5.2	Mesure de l'intensité du signal confocal (rouge) et de F2P (bleu) en fonction de la profondeur dans une lame de plastique fluorescent.	42
FIGURE 5.3	Image de microscopie confocale présentant une cible de résolution USAF 1951.	43
FIGURE 5.4	Images de la surface de la lame de plastique fluorescent utilisée pour les tests de résolution axiale. On note le détail de faible dimension résolu en F2P et en microscopie confocale (flèches).	44

FIGURE 5.5	Images à grand champ de vue de corde vocale porcine (spécimen 28). Les flèches indiquent l'épithélium de la corde vocale. Les rectangles présentent une zone qui est grossie et exposée en figure 5.6	46
FIGURE 5.6	Grossissement d'une partie de la corde vocale porcine de la figure 5.5 montrant l'épithélium et une partie de la <i>lamina propria</i>	47
FIGURE 5.7	Comparaison des images de GSH obtenues avec et sans miroir placé sur la lame de l'échantillon pour une épaisseur de coupe histologique de 5 μ m.	48
FIGURE 5.8	Comparaison des images obtenues avec et sans miroir placé sur la lame de l'échantillon pour une épaisseur de coupe histologique de 20 μ m.	49
FIGURE 5.9	Comparaison des images non linéaires obtenues avec différentes colorations pour le même échantillon.	51
FIGURE 5.10	Spécimen 2 (fœtus). Les flèches indiquent le ventricule (v), les marques d'encre (e), la fausse corde vocale (f) et la <i>lamina propria</i> (lp). Le rectangle présente une zone grossie en figure 5.11.	54
FIGURE 5.11	Spécimen 2 (fœtus). Les flèches indiquent des noyaux de cellules (a et b), du collagène (c) et des fibres musculaires (f).	55
FIGURE 5.12	Spécimen 7 (fœtus). Les flèches indiquent le ventricule (v), les marques d'encre (e), la <i>lamina propria</i> (lp) et une région très dense en noyaux cellulaires (n). Le rectangle présente une zone grossie en figure 5.13.	56
FIGURE 5.13	Spécimen 7 (fœtus). Les flèches indiquent des noyaux de cellules (a), du collagène (c) et des fibres musculaires (f).	57
FIGURE 5.14	Spécimen 28 (porc). Les flèches indiquent l'encre (e), la <i>lamina propria</i> inférieure (lpi) et supérieure (lps).	58
FIGURE 5.15	Histogrammes de la F2P des deux régions marquées (lpi) et (lps) en figure 5.14.	59
FIGURE 5.16	Spécimen 67 (humain). Les flèches indiquent l'encre (e), le ventricule (v), la <i>lamina propria</i> inférieure (lpi), médiane (lpm) et supérieure (lps).	61
FIGURE 5.17	Histogrammes de la F2P des régions marquées (lpi), (lpm) et (lps) en figure 5.16.	62
FIGURE 5.18	Spécimen 70 (humain). Les flèches indiquent l'encre (e), le ventricule (v), des parties de l'échantillon fragmentées (b), des acini (a), la <i>lamina propria</i> inférieure (lpi), médiane (lpm) et supérieure (lps).	63

- FIGURE 5.19 Corde vocale entière de porc utilisée pour l'imagerie. A : Cordes vocales extraites du larynx. Sont indiqués la fausse corde (fc), le ventricule (v) et la vraie corde (vc). B : Corde vocale en position sur la lamelle de microscope. Une lame de scalpel (s) sert pour la localisation 65
- FIGURE 5.20 A : Image en microscopie confocale de la corde vocale de porc vue en figure 5.19. On retrouve le ventricule (v), la fausse et la vraie corde vocale (fc et vc respectivement), une bulle d'air (b) et la pointe de la lame de scalpel (s). Barre d'échelle : 500 μm . Les flèches (gsh) et (f2p) indiquent les points d'acquisition des piles B et C en GSH et F2P respectivement. 66

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

F1P	Fluorescence à un photon
F2P	Fluorescence à deux photons
GSH	Génération de seconde harmonique
IRM	Imagerie par résonance magnétique
FLIM	<i>Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy</i>
STED	<i>Stimulated Emission Depletion Microscopy</i>
FPALM	<i>Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy</i>
STORM	<i>Stochastic Optical Reconstruction Microscopy</i>

Chapitre 1

INTRODUCTION

Mathematics began to seem too much like puzzle solving.
Physics is puzzle solving, too, but of puzzles created by
nature, not by the mind of man.

Maria Goeppert-Mayer

Les cordes vocales contribuent à la phonation dans le corps humain. Il s'agit de deux replis de chair logés dans le larynx à la hauteur de la pomme d'Adam. Ils sont écartées pendant la respiration pour laisser passer l'air et se rapprochent pendant la phonation pour entrer en vibration. De cette manière, ils amorcent des ondes sonores qui sont amplifiées par les cavités nasales et bucales avant d'être expulsées.

Malgré son apparente simplicité, le fonctionnement des cordes vocales repose sur une structure laminaire complexe. Des études ont décrit les différentes couches qui composent cet organe et leurs propriétés mécaniques respectives. La structure des cordes vocales varie en fonction d'un grand nombre de facteurs comme l'âge ou le sexe. Sachant que dépendamment de leur composition, les opérations possibles sur les cordes vocales d'un patient varient, la compréhension de la structure de ce tissu est très importante pour les cliniciens. Cependant, aucune technique n'existe à l'heure actuelle pour l'observer *in vivo*, et son développement en fonction de l'âge est mal compris à l'heure actuelle.

La microscopie non-linéaire, utilisée pour la première fois par Denk *et al.* (1990), est une technique optique qui permet de faire des images en trois dimensions avec une résolution de l'ordre du micromètre. Sa profondeur de pénétration varie en fonction de l'échantillon étudié, et s'étend jusqu'à 1 mm dans les tissus biologiques (Theer *et al.* (2003)). Par rapport aux techniques de microscopie optique classiques, elle offre des modes de contraste différents qui permettent d'observer des molécules spécifiques sans utiliser de colorants externes. C'est pourquoi elle se présente comme une technique intéressante pour imager les cordes vocales.

Ce projet amorce l'évaluation de l'utilisation clinique de la microscopie non-linéaire pour imager les cordes vocales *in vivo*. Son point de départ est une technique d'imagerie des tissus biologiques, l'histologie, qui est actuellement utilisée comme référence pour imager les structures internes des cordes vocales. Un microscope non-linéaire est conçu et assemblé au laboratoire d'optique diagnostique et d'imagerie de l'École Polytechnique de Montréal (LODI) pour répondre aux besoins spécifiques de l'imagerie des échantillons de cordes vocales

utilisés pour l’histologie. Ce même système est ensuite utilisé pour faire des images de cordes vocales entières, et ainsi s’approcher des conditions d’imagerie *in vivo*.

Au début du chapitre deux, on trouve une revue des connaissances portant sur les cordes vocales et sur leur structure interne. Les modèles issus des études présentées sont utilisés comme références pour l’ensemble de ce projet. Dans un second temps, les techniques d’imagerie médicale qui sont utilisées pour observer les cordes vocales sont abordées. Cette partie permet de comprendre leur complémentarité, et les raisons pour lesquelles la microscopie non-linéaire pourrait remplir un vide pour l’imagerie des cordes vocales.

Le troisième chapitre présente le système d’imagerie développé pour ce projet de recherche. Le microscope est présenté au complet dans un premier temps pour en donner au lecteur une vue d’ensemble. Dans une deuxième section, les choix des différents composants sont justifiés et les alternatives de conception possibles sont abordées. Enfin, une troisième section présente les cahiers des charges et l’implémentation des logiciels développés pour contrôler le microscope et fournir des outils pour observer les images résultantes.

Une description de tous les spécimens étudiés pendant ce projet est donnée au chapitre quatre, ainsi que leur protocole de préparation et d’imagerie. On trouve aussi les paramètres qui ont été fixés pour le microscope pendant les sessions d’imagerie.

Le chapitre cinq présente les résultats obtenus pendant ce projet. Les performances du système d’imagerie conçu pendant le projet sont mesurées dans un premier temps pour vérifier son bon fonctionnement. Ensuite, les images obtenues des différents spécimens sont analysées pour obtenir des informations quant à l’efficacité de la microscopie non-linéaire pour l’imagerie des cordes vocales.

Le dernier chapitre rassemble une synthèse des travaux effectués pendant ce projet, une description des limites de la technique proposée pour observer les cordes vocales et les améliorations qui sont possibles pour permettre l’imagerie *in vivo*.

Chapitre 2

REVUE DE LITTÉRATURE

It is important to realize that in physics today, we have no knowledge of what energy is.

Richard Feynman

Dans ce chapitre, on présente dans un premier temps l'état des connaissances sur la structure des cordes vocales. Les techniques d'imagerie qui permettent de les observer sont ensuite présentées. A la lumière de ces connaissances, on présente enfin les propositions de recherches sur lesquelles ce projet se base.

2.1 La corde vocale

Les cordes vocales sont des replis des membranes du larynx qui servent à la phonation. Elles se divisent de deux paires, les fausses et les vraies cordes vocales, maintenues en tension dans le sens dorso-ventral et séparées par le ventricule. La figure 2.1 présente une vue schématique en coupe coronale de ces structures du larynx. Les vraies cordes, seules responsables de la production de sons, se distinguent des fausses par leur structure interne, et par les muscles vocaux qui les sous-tendent.

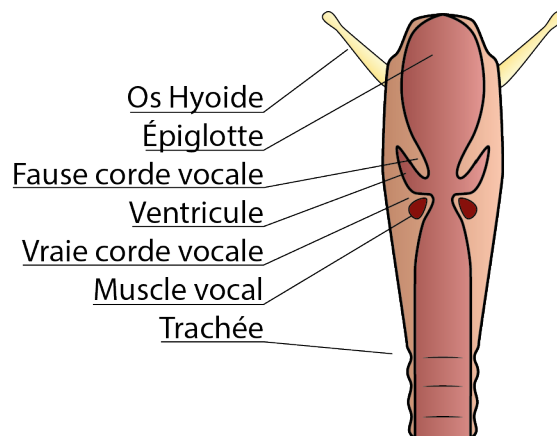


FIGURE 2.1 Vue dorsale schématique du larynx présentant les cordes vocales.

Les cordes vocales ont été décrites très tôt comme une structure non-homogène, en par-

ticulier par Ferrein (1741) dans le livre *De la formation de la voix de l'homme*. Un modèle largement accepté pour les décrire a été proposé plus tard par Hirano (1975). Dans son article, ce dernier propose que les cordes vocales devraient au minimum être décrites comme une structure à deux couches. Sa description la plus détaillée différencie l'épithélium en surface et le muscle vocal en profondeur, ainsi qu'une couche intermédiaire, la *lamina propria*. Cette dernière est subdivisée en plusieurs sous-couches dépendamment de leur composition. Hirano (1977) a énoncé que les adultes possèdent trois sous-couches ; la *lamina propria* supérieure qui se caractérise par l'absence de protéines fibreuses, la *lamina propria* médiane où l'élastine¹ est abondante et la *lamina propria* profonde qui contient beaucoup plus de collagène². Pour introduire la question de l'évolution en fonction de l'âge, Sato *et al.* (2001) ont fait une étude sur la structure des cordes vocales des nouveau-nés. Ils ont montré que chez cette population, la *lamina propria* n'est pas encore divisée en plusieurs sous-couches. Kurita *et al.* (1983) ont proposé des modèles pour différents animaux. En particulier, leur modèle pour le porc divise la *lamina propria* en une couche supérieure plutôt pauvre en élastine et en collagène, et une couche profonde encore plus pauvre en élastine mais fournie en collagène.

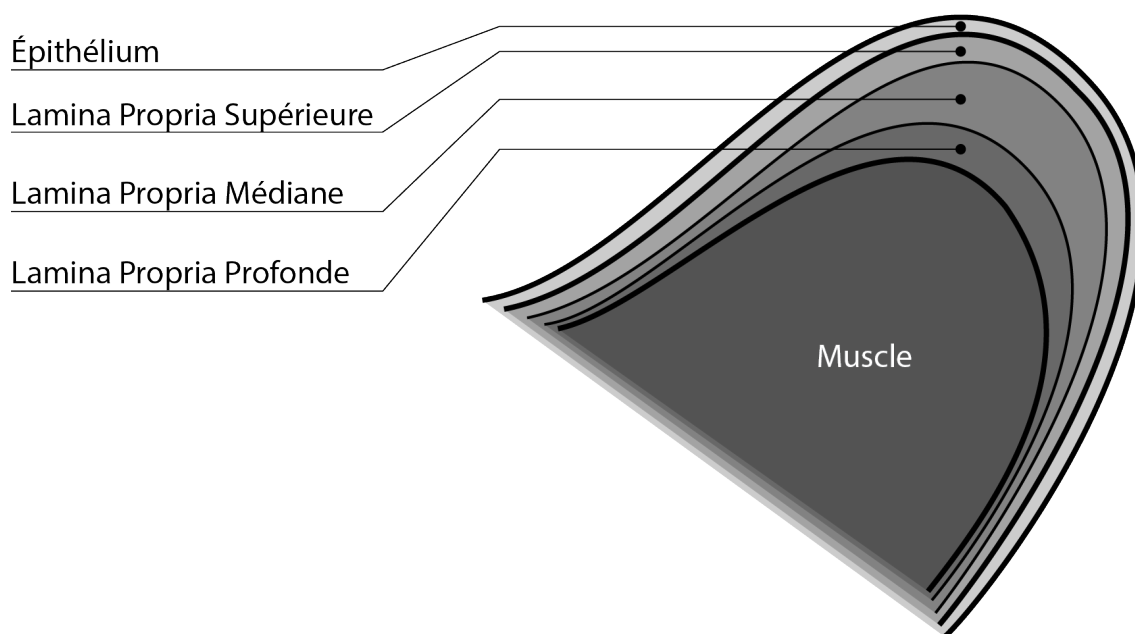


FIGURE 2.2 La structure des cordes vocales telles que décrite par Hirano (1975).

En général, pour étudier la structure des cordes vocales, il est nécessaire d'obtenir des biopsies³ des tissus d'intérêt. Cette opération n'est pas bénigne, on comprend donc que

-
1. Protéine fibreuse structurale. Tire son nom de ses propriétés élastiques.
 2. Famille de protéines fibrillaires qui donnent aux tissus une résistance à l'étirement.
 3. Prélèvement d'un fragment de tissu ou d'organe pour l'examen au microscope.

le nombre de cas observables ne permette pas de percevoir des tendances particulières à certaines populations spécifiques de sexe ou d'âge donné.

Une compréhension plus fine de la structure des cordes vocales et en particulier de son évolution avec l'âge semble importante pour diverses raisons. Selon Hartnick *et al.* (2005), il semble qu'il soit possible de prévoir l'apparition de maladies dans le tissu en observant ses stades de croissance. D'autre part, il serait possible de déterminer à l'avance les mécanismes de cicatrisation en cas de blessures ou de chirurgies.

2.2 Imagerie médicale appliquée aux cordes vocales

Parmi la multitude de modalités d'imagerie médicale utilisées actuellement par les cliniciens ou encore au stade de recherche, nous portons notre intérêt dans les prochains paragraphes sur celles qui se montrent intéressantes pour l'imagerie des cordes vocales.

Modalités classiques Parmi les techniques de laryngoscopie couramment utilisées, on note l'observation par miroir laryngien, télescope laryngien et nasopharyngolaryngoscope flexible (Hawke (1997)). Le miroir laryngien est un simple réflecteur monté sur une tige, alors que les deux autres techniques emploient un endoscope⁴ pour observer le larynx. Ils peuvent être munis de caméras pour remplacer l'œil du praticien. Ces appareils permettent d'observer la surface des cordes vocales pour détecter des anomalies, mais pas de discerner leur structure interne. Elles tombent donc en dehors du champ d'étude de ce projet.

Échographie Le principe de l'échographie consiste à mesurer les réflexions d'une onde acoustique à haute fréquence envoyée par un transducteur. Dans une certaine limite d'intensité, cette technique est sans danger pour les patients. En fonction de la fréquence de l'onde sonore envoyée, le compromis entre profondeur de pénétration et résolution change. Les plus basses fréquences de quelques mégahertz sont utilisées pour observer les structures en profondeur dans le corps humain. A l'inverse, Dedecjus *et al.* (2010) et Huang *et al.* (2007) ont utilisé un appareil à haute résolution (47 MHz) pour observer les cordes vocales. Leur résultats montrent que cette technique est capable de mettre en évidence des dysfonctionnements macroscopiques. Cependant, il n'est pas possible de distinguer les trois sous-couches de la *lamina propria* avec l'échographie car la résolution est trop faible (de l'ordre de 100 μm).

4. Tube optique muni d'un dispositif d'éclairage, destiné à être introduit dans une cavité du corps humain pour l'examiner (Dictionnaire Larousse)

Tomographie par cohérence optique (OCT) De la même manière que l'échographie utilise des ondes sonores pour sonder les tissus, l'OCT utilise des ondes lumineuses. Cette technique se base sur un principe d'interférence pour mesurer le trajet optique de la lumière réfléchiée par les tissus. On retrouve ici le compromis entre profondeur de pénétration et résolution, mais à une échelle beaucoup plus fine. Les images obtenues par cette technique ont un bon rapport signal sur bruit jusqu'à quelques millimètres de profondeur avec une résolution de l'ordre de $10\text{ }\mu\text{m}$. Le signal obtenu est modulé par la réflectivité des tissus dans le volume focal du système. Les images qui en résultent sont donc des représentations des variations d'indice de réfraction dans l'échantillon. Cette technique a déjà été utilisée par Boudoux *et al.* (2009b) pour observer les cordes vocales, et a été comparée avec d'autres techniques d'imagerie optique. Il n'a pas encore été montré qu'il est possible avec l'OCT de différencier les différentes sous-couches de la lamina propria, mais des études sont en cours en ce sens (Maturo *et al.* (2012)).

Microscopie confocale La microscopie confocale a été développée en 1955 par Minsky. Elle se présente alors comme une puissante alternative à la microscopie optique à grand champ. Cette dernière technique consiste à illuminer une grande zone de l'échantillon à observer, et à faire l'image d'une fraction de cette surface sur une camera ou la rétine de l'expérimentateur (figure 2.3).

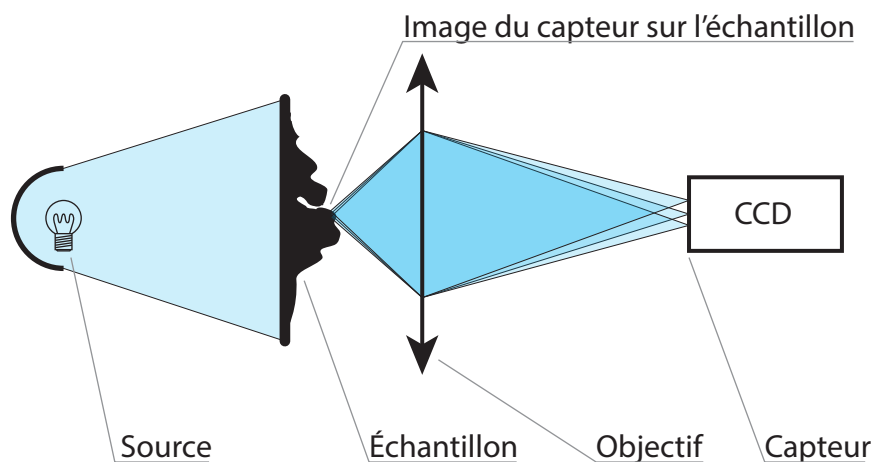


FIGURE 2.3 Schéma de principe de la microscopie optique à grand champ. L'œil nu remplace souvent la caméra illustrée ici.

Parmi les inconvénients de la microscopie à grand champ, on note que l'échantillon doit être suffisamment fin pour que son taux de transmission de la lumière soit élevé. D'autre part, même si chaque point du détecteur reçoit en priorité les photons issus de son image par

le système optique dans l'échantillon, de la lumière diffuse provenant d'autres endroits lui arrive également. Le rapport signal sur bruit des images produites par ce type de microscope est donc diminué par des photons "parasites", étant donnée la nature turbide des tissus biologiques. Enfin, la limite ultime de résolution latérale⁵ de ce microscope est fixée par la fonction de transfert du système optique de collection. On ne reprend pas ici le calcul de cette fonction de transfert, mais Webb (1996) fournit dans son article une formule qui permet d'obtenir sa valeur ($r_{\text{grand champ}}$) en fonction de l'ouverture numérique⁶ (NA) de l'objectif et de la longueur d'onde λ de la source lumineuse :

$$r_{\text{grand champ}} = \frac{0,61\lambda}{NA}$$

La spécificité du microscope confocal tel que décrit par Minsky tient au fait que l'échantillon ne soit plus illuminé sur une grande zone, mais sur un point aussi petit que l'élément de résolution de la microscopie grand champ, qui est balayé dans l'échantillon pour reconstruire des images. Pour obtenir une source lumineuse ponctuelle, Minsky place un sténopé devant une source conventionnelle. Cette approche sera plus tard remplacée par l'utilisation de lasers, dont les rayons collimatés se comportent comme provenant d'une source ponctuelle située à l'infini. Dans un microscope confocal, la collection ne se fait pas avec une caméra, mais avec un détecteur unique et ponctuel. L'alignement du microscope est critique dans cette configuration. L'image de la source lumineuse par le système optique d'illumination doit correspondre à l'image du sténopé du capteur par le système optique de collection pour obtenir le signal d'intérêt.

Comme l'illustre la figure 2.4, il est possible d'utiliser le même objectif pour l'illumination et la détection par le biais d'une lame séparatrice. On dit que le microscope fonctionne en épi-illumination, ce qui permet d'utiliser des échantillons épais. Du fait que l'illumination soit ponctuelle, le volume de l'échantillon qui diffuse de la lumière à un instant donné est beaucoup plus faible qu'en microscopie grand champ, ce qui améliore le rapport signal sur bruit des images. En outre, de par son caractère ponctuel, le détecteur rejette les photons qui ne sont pas issus du point focal. Cette propriété est valable dans les directions normales à l'axe optique de l'objectif de microscope (directions latérales), mais également suivant cet axe (direction axiale). Alors que le rejet dans les directions latérales participe au gain en résolution du microscope, celui dans la direction axiale lui offre une toute nouvelle capacité, nommée "sectionnement optique". Il est possible de faire des images en profondeur dans les

5. Résolution dans les directions normales à l'axe optique de l'objectif de microscope.

6. L'ouverture numérique vaut $NA = n \cdot \sin \alpha$ avec n l'indice de réfraction du milieu à la sortie de l'objectif et α le demi-angle du cône d'illumination. L'ouverture numérique est une indication de la limite de résolution atteignable avec un objectif. Le volume focal en fonction de l'ouverture numérique est une fonction décroissante mais non-linéaire.

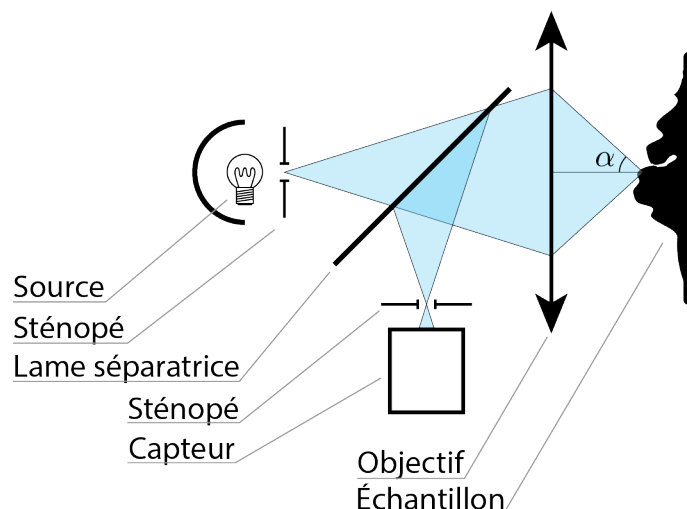


FIGURE 2.4 Schéma de principe de la microscopie confocale à balayage. Le demi-angle α du cône d'illumination est utilisé dans le calcul de l'ouverture numérique de l'objectif.

échantillons et d'en obtenir des représentations tridimensionnelles en balayant le volume focal dans les trois dimensions spatiales. Cette faculté est limitée par la turbidité de l'échantillon étudié qui participe à diffuser les photons incidents avant qu'ils n'atteignent le volume focal, et diminue le rapport signal sur bruit des images obtenues à mesure que la profondeur de pénétration augmente. La résolution latérale ultime n'est plus donnée par la fonction de transfert du système optique de détection, mais par le produit de la fonction d'illumination et de détection, qui est meilleure d'un rapport $\sqrt{2}$ selon Wilson et Carlini (1987). Une valeur approchée de cette résolution est donnée par Webb (1996) avec l'équation suivante :

$$r_{\text{confocal}} = \frac{0,44\lambda}{NA}$$

La microscopie confocale n'est pas limitée à observer les variations d'indice de réfraction dans les tissus. Il est possible de l'utiliser pour observer des phénomènes de fluorescence dans les échantillons. La lame séparatrice est alors remplacée par un miroir dichroïque⁷. Ce dernier doit être ajusté pour transmettre la lumière à la longueur d'onde d'excitation du fluorophore visé (celle de la source lumineuse), et réfléchir les longueurs d'onde d'émission de ce même fluorophore.

Selon Pawley (2006), la microscopie optique en biologie a connu de très grands changements avec l'apparition de la microscopie confocale. Les deux seuls points sur lesquels cette dernière ne surpasse pas dès son apparition la microscopie optique grand champ est la vi-

7. Un miroir dichroïque présente un taux de réflexion de la lumière incidente différent en fonction de la longueur d'onde.

tesse d'acquisition et l'intensité de la source lumineuse requise. Placer un sténopé devant une source lumineuse pour la rendre ponctuelle est en effet très coûteux en terme d'intensité. Ce problème a été réglé avec l'apparition des lasers et leur utilisation dans les microscopes confocaux. Pour trouver une solution au problème de vitesse, White (1991) remplace le miroir oscillant d'un axe de rotation par un polygone rotatif recouvert de miroirs et obtient des acquisitions à quatre images par seconde. Des vitesses bien plus élevées ont été obtenues plus tard avec la même méthode (60 images par seconde par exemple pour Rajadhyaksha *et al.* (1999)). Des techniques différentes ont été développées en parallèle. Petrán *et al.* (1968) remplacent les deux sténopés et les miroirs oscillants du microscope par une roue de Nipkow. Il s'agit d'un disque opaque rotatif percé en plusieurs endroits. À une position donnée, la roue agit comme plusieurs sténopés. Les signaux collectés sont transmis à une camera au lieu d'un détecteur ponctuel. En faisant tourner le disque, les sténopés balayent les points d'illumination et de détection dans l'échantillon et permettent de reconstruire l'image finale. Cette technique permet des vitesses d'acquisition très élevées, mais le taux de photons d'intérêt collectés par le détecteur est faible. Cette mauvaise efficacité a été améliorée grandement par Ichihara *et al.* (1996) qui ont placé sous le disque de Nipkow une matrice de lentilles de collimation. D'autres concepts comme la microscopie par balayage de fente (Ujike (2008)) sacrifient une partie de la résolution de la microscopie confocale pour multiplier considérablement la vitesse d'acquisition.

En dehors de la question de la vitesse pure, la microscopie confocale a également connu des développements qui lui permettent des modes de contrastes différents comme la technique de *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy* (FLIM), développée par Chang *et al.* (2007), qui permet de différencier le temps de vie des fluorophores. D'autre part, Hell et Wichmann (1994) ont montré que la limite de résolution théorique donnée par Wilson et Carlini (1987) peut être dépassée sous certaines conditions. Leur technique nommée “déplétion par émission stimulée” (*Stimulated Emission Depletion Microscopy*, STED), qui utilise la désexcitation stimulée de certaines molécules, a permis de faire des images de fluorophores endogènes avec une résolution atteignant 35 nm. Il existe maintenant beaucoup de principes de super-résolution comme la microscopie par localisation de photoactivation de fluorophores (*Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy*, FPALM) développée par Gould *et al.* (2009) et la microscopie par reconstruction optique aléatoire (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*, STORM) de Rust *et al.* (2006).

La microscopie confocale a été développée directement pour des chercheurs en biologie (Amos et White (2003)). Leurs besoins très spécifiques ont ensuite guidé les développements de cette technique. Ces capacités ont cependant attiré l'attention d'autres domaines de recherche comme le génie biomédical, qui ont voulu mesurer l'intérêt qu'elle peut avoir dans

d'autres environnements et en particulier pour imager des tissus épais *in vivo*. Les défis sont ici très différents, mais des études comme celle de Rajadhyaksha *et al.* (1995) ou Jalbert *et al.* (2003) ont montré en imageant respectivement la peau et la cornée humaine *in vivo* que la microscopie confocale est capable de quitter l'environnement contrôlé du laboratoire pour s'installer en clinique. Dans le domaine de la laryngologie, cette technique a été utilisée en parallèle de l'OCT par Boudoux *et al.* (2009b) pour observer des cordes vocales porcines *ex-vivo* puis *in vivo* (Boudoux *et al.* (2009a)). Il a été montré qu'elle permet une observation fine de l'épithélium, de la membrane basale et de la *lamina propria* supérieure.

Microscopie par fluorescence à deux photons La fluorescence à deux photons (F2P) fait partie des processus d'interaction non-linéaires entre lumière et matière. Cette dénomination sous-entend que la relation entre la polarisation des tissus observés et le champ électrique incident s'écarte de l'approximation linéaire. On peut décomposer la polarisation (\vec{P}) d'un milieu en séries de Taylor pour obtenir la somme de toutes ses composantes de différents ordres qui sont fonction des tenseurs de susceptibilité $\chi^{(i)}$ du matériau et du champ électrique (\vec{E}) incident :

$$\vec{P} \propto \sum_{i=0}^{\infty} \chi^{(i)} \vec{E}^i \quad (2.1)$$

Comme son nom l'indique, la fluorescence à deux photons est l'homologue du second ordre de la fluorescence conventionnelle. La figure 2.5 présente ces transitions en termes énergétiques en utilisant un diagramme de Jablonski.

La première démonstration théorique d'un processus de fluorescence non-linéaire se trouve dans la thèse écrite par Maria Goeppert-Mayer en 1929. Le schéma de principe d'un microscope utilisant la fluorescence à deux photons est très similaire à celui d'un microscope confocal. On en trouve un exemple en figure 2.6. La lame séparatrice du montage confocal est remplacée par un miroir dichroïque qui réfléchit les longueurs d'ondes correspondant aux photons de fluorescence et transmet ceux de la source. D'autre part, le sténopé placé devant le détecteur sur un microscope confocal est ici enlevé. En effet, la probabilité d'interaction non-linéaire est proportionnelle au carré de l'intensité de la lumière incidente. La limite ultime de la résolution latérale est donc donnée par le carré de la fonction de transfert de l'optique d'illumination. Elle est similaire à celle d'un microscope confocal tout en s'affranchissant du sténopé, ce qui permet de collecter plus de lumière.

En hommage à la découverte de Mme Goeppert-Mayer, l'unité de la section efficace des transitions non-linéaires d'ordre deux porte son nom, en abrégé GM. Sa conversion en unités du système international est donnée en équation 2.2.

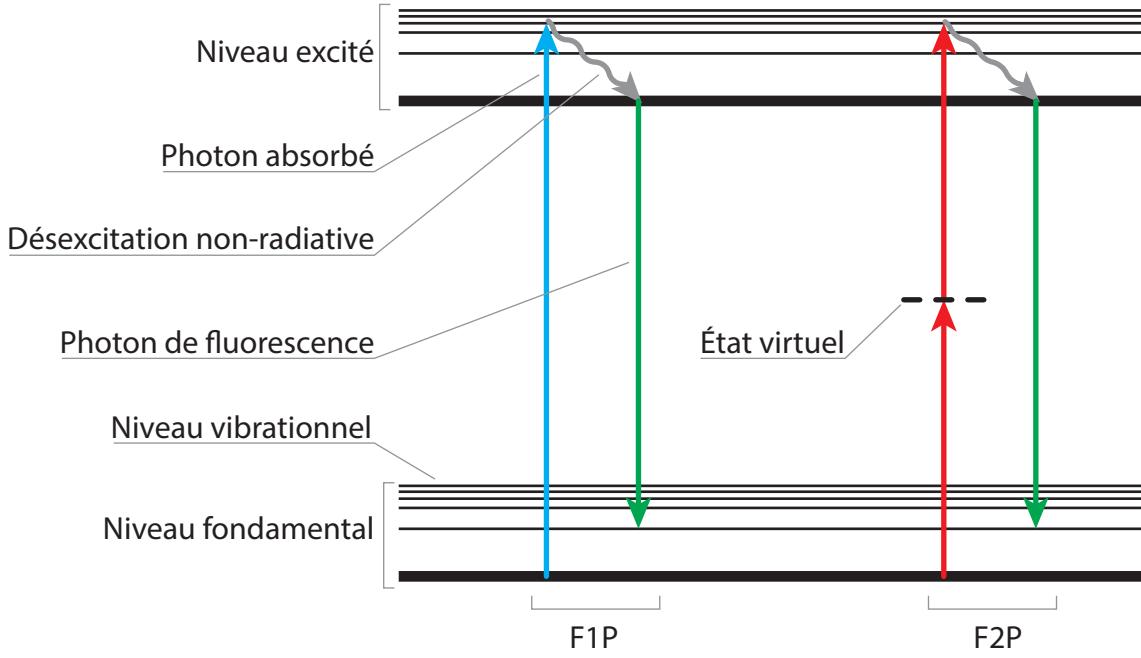


FIGURE 2.5 Diagramme de Jablonski de la fluorescence à un photon (F1P) et de la fluorescence à deux photons (F2P).

$$1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s molecule}^{-1} \text{ photon}^{-1} \quad (2.2)$$

En pratique, les valeurs des sections efficaces des transitions à deux photons sont extrêmement faibles, ce qui justifie que les effets non-linéaires puissent être négligés dans toutes les applications de microscopie conventionnelle. Pour s'en convaincre, on peut donner une application numérique pour le cas de la fluorescéine, dont les sections efficaces d'absorptions sont :

$$\sigma_{1p}(490 \text{ nm}) = 3,4 \times 10^{-16} \text{ cm}^2 \quad (2.3)$$

$$\sigma_{2p}(780 \text{ nm}) = 40 \text{ GM} \quad (2.4)$$

Les longueurs d'ondes choisies correspondent aux pics d'absorption dans les deux modalités. Sachant que les probabilités d'interaction p sont :

$$p_{1p} = \sigma_{1p} \cdot I \quad (2.5)$$

$$p_{2p} = \sigma_{2p} \cdot I^2 \quad (2.6)$$

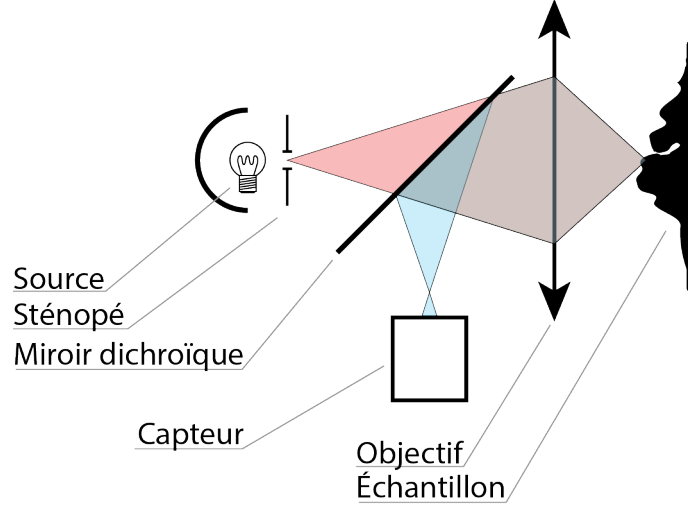


FIGURE 2.6 Schéma de principe d'un microscope non-linéaire utilisant la fluorescence à deux photons. Une représentation qualitative de la transmittance du miroir dichroïque est trouvée en figure 2.9.

L'intensité lumineuse nécessaire pour observer la même quantité de fluorescence dans les deux modalités est :

$$I = 3,4 \times 10^{34} \text{ W m}^{-2} \quad (2.7)$$

Cette valeur d'intensité très élevée justifie qu'il a fallu attendre l'apparition des lasers, puis des années de développement, pour que Denk *et al.* (1990) présentent les premières images de microscopie par fluorescence deux photons. L'observation de phénomènes non-linéaires nécessite des champs électriques très intenses dans les tissus. Pour les atteindre sans causer de dommages thermiques, des lasers impulsionnels sont utilisés. Le rapport très élevé entre la puissance crête et moyenne d'émission de ces sources permet de maintenir l'échauffement des échantillons à des niveaux acceptables tout en obtenant ponctuellement des effets non-linéaires suffisamment intenses pour être mesurables. En revanche, le fait d'utiliser des lasers impulsionnels entraîne des effets secondaires dont certains peuvent être délétères. Par exemple, les amplitudes temporelles et spectrales d'une impulsion étant reliées par la transformée de Fourier, le produit de leur largeur respecte l'inégalité suivante :

$$\sigma_t \geq \frac{1}{\sigma_\nu} \quad (2.8)$$

Avec σ_t l'écart-type temporel de l'impulsion et σ_ν son écart-type spectral. Dans le cas particulier $\sigma_t \cdot \sigma_\nu = 1$, on dit que l'impulsion concernée est "Fourier-limitée". La largeur spectrale des lasers femtosecondes utilisés actuellement est tellement grande qu'elle devient

problématique car l'indice de réfraction de tous les matériaux varie en fonction de la longueur d'onde. Sachant que la vitesse de propagation des ondes lumineuses dans un milieu est inversement proportionnelle à l'indice de réfraction local, une impulsion a tendance à s'élargir temporellement en se déplaçant. Ce phénomène, appelé dispersion, doit être traité en introduisant dans les systèmes optiques des éléments compensateurs. On trouve un exemple de mesure de cette variation pour différents verres dans l'article de Wray et Neu (1969).

La fluorescence à deux photons présente plusieurs différences majeures par rapport à la microscopie confocale. Premièrement, son mode de contraste est totalement différent. Le signal provient des composés qui fluorescent à une longueur d'onde moitié de celle de la source lumineuse, et non plus des variations d'indice de l'échantillon. Deuxièmement, la profondeur de pénétration est améliorée car le détecteur ne sélectionne pas spatialement les photons incidents, et il est donc possible d'exploiter les photons de fluorescence diffus (Helmchen et Denk (2005)). En utilisant des marqueurs appropriés, Theer *et al.* (2003) ont démontré des profondeurs de pénétration atteignant 1 mm. Troisièmement, de par le fait que le signal non-linéaire soit proportionnel à l'intensité surfacique du signal incident au carré, changer la taille du volume focal, et donc la section du laser au point focal, a des conséquences importantes sur le rapport signal sur bruit des images obtenues. En pratique, il est indispensable d'utiliser des objectifs dont l'ouverture numérique est supérieure à 0,5. Les optiques qui offrent une si grande ouverture numérique n'offrent pas un très grand champ de vue. Les microscopes non-linéaires sont donc limités à environ $0,25 \text{ mm}^2$ d'aire observable.

Cette dernière limitation n'est pas gênante pour un grand nombre d'applications, et c'est pourquoi la microscopie par fluorescence à deux photons a été utilisée pour imager des tissus biologiques comme des embryons de drosophiles (Desprat *et al.* (2008)) ou des ganglions lymphatiques (Miller *et al.* (2002)). Elle a également montré des applications potentielles intéressantes comme le contrôle de l'intégration de tissus cardiaques transplantés (Rubart (2004)). Pour les techniques où un grand champ de vue est nécessaire, des systèmes de mosaïques d'images ont été développés comme celui de Drive *et al.* (2006) qui automatise la prise de vue par le microscope.

Les fluorophores utilisés pour faire les images de TPEF peuvent soit être ajoutés à l'échantillon par l'expérimentateur, soit y être présents naturellement. Pour assurer que la technique d'imagerie développée pendant ce projet soit non-invasive, il est choisi de ne pas utiliser de fluorophores exogènes. Les possibilités de la fluorescence à deux photons seront donc limitées aux fluorophores endogènes. Selon Zipfel *et al.* (2003), les deux principales classes de ces composés dans les tissus humains sont les dérivés d'acides aminés aromatiques et les dérivés de vitamines. L'élastine fait partie de cette seconde catégorie, et représente la principale source d'autofluorescence non-linéaire dans la matrice extracellulaire. Sachant que

l'élastine est selon Hirano *et al.* (1983) une des molécules dont la concentration varie suivant les différentes couches de la *lamina propria*, la fluorescence à deux photons se présente comme un excellent candidat pour observer les cordes vocales.

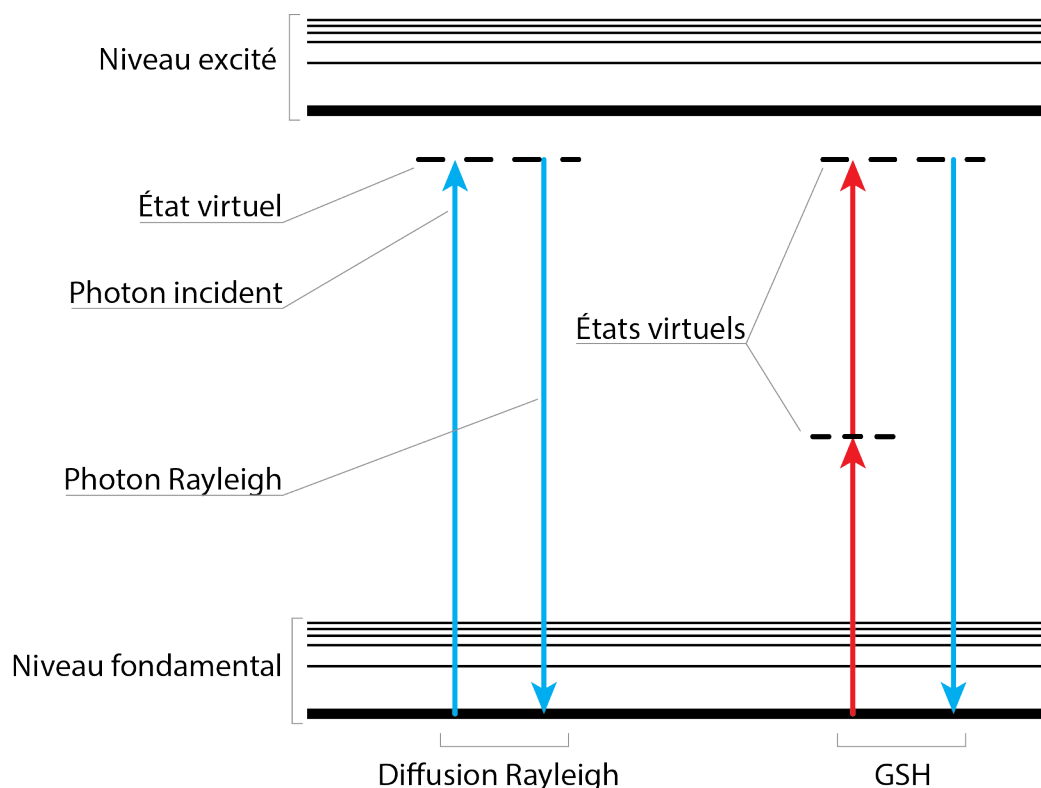


FIGURE 2.7 Diagramme de Jablonski représentant la diffusion Rayleigh et la génération de seconde harmonique (GSH).

Microscopie par génération de seconde harmonique Après la mise en application pour la microscopie de la fluorescence à deux photons, de nouvelles modalités non-linéaires ont été démontrées parmi lesquelles se trouve la génération de seconde harmonique (GSH). Franken *et al.* (1961) ont observé ce phénomène expérimentalement, et Roth et Freund (1979) l'ont utilisé pour la première fois à des fins de microscopie. De la même manière que la fluorescence à deux photons est la réciproque non-linéaire de la fluorescence classique, la génération de seconde harmonique est la réciproque non-linéaire de la diffusion Rayleigh. On trouve un diagramme de Jablonski représentant ces deux phénomènes en figure 2.7. Selon la décomposition en séries de Taylor vue précédemment de la polarisation d'un milieu, on remarque que la GSH n'apparaît que dans des matériaux de $\chi^{(2)}$ non-nul. Cette condition se traduit pour les électrons des molécules par le fait qu'ils soient contenus dans des puits

de potentiels anharmoniques⁸. Une représentation de ce type de puits est donnée en figure 2.8. La GSH est un processus cohérent qui nécessite une conformation spatiale régulière du matériau dans lequel il est généré. La longueur d'onde des photons générés par ce processus est exactement la moitié de ceux de la source. Pour qu'ils soient observables, il est nécessaire d'une part qu'un grand nombre de molécules génèrent ces photons d'énergie double et d'autre part que ces derniers interfèrent constructivement entre eux. Cela signifie en particulier que l'intensité du signal de GSH dépend de l'angle de la détection. Le signal est la plupart du temps généré essentiellement vers l'avant, mais il est possible d'en récupérer une partie dans un montage en épi-illumination grâce à la diffusion du milieu environnant, comme le montre la figure 2.10.

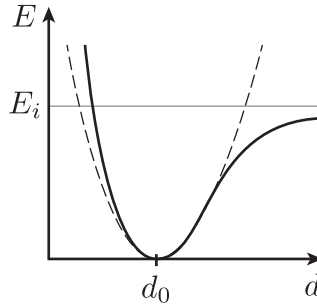


FIGURE 2.8 Représentation de l'énergie potentielle E d'un électron en fonction de sa distance d au noyau. La distance au repos est notée d_0 et l'énergie d'ionisation E_i

Le collagène qui se trouve dans les cordes vocales forme une structure très régulière. C'est un bon candidat pour fournir du signal en GSH, comme l'ont montré Georgiou et Theodossiou (2000). La génération de seconde harmonique a déjà été utilisée pour imager cette macromolécule dans des tissus, par exemple par Strupler *et al.* (2012) dans le rein.

Dans la mesure où la GSH et la F2P générées avec la même lumière d'excitation ont des contenus spectraux suffisamment distincts, il est possible de les sélectionner avec un miroir dichroïque pour faire des acquisitions simultanées de ces deux modalités. Enfin, on note que les composants nécessaires pour réaliser un système d'imagerie non-linéaire n'entrent pas en conflit avec ceux qui permettent de faire un microscope confocal. Il est donc tout à fait envisageable de concevoir un appareil permettant de faire simultanément des acquisitions en fluorescence à deux photons, en génération de seconde harmonique et en microscopie confocale. A titre d'information, on trouve en figure 2.9 une représentation des différents spectres des phénomènes physiques en jeu dans un microscope non-linéaire.

8. La fonction énergie potentielle en fonction du déplacement de l'électron par rapport à sa position d'équilibre pour un puits anharmonique est sans parité.

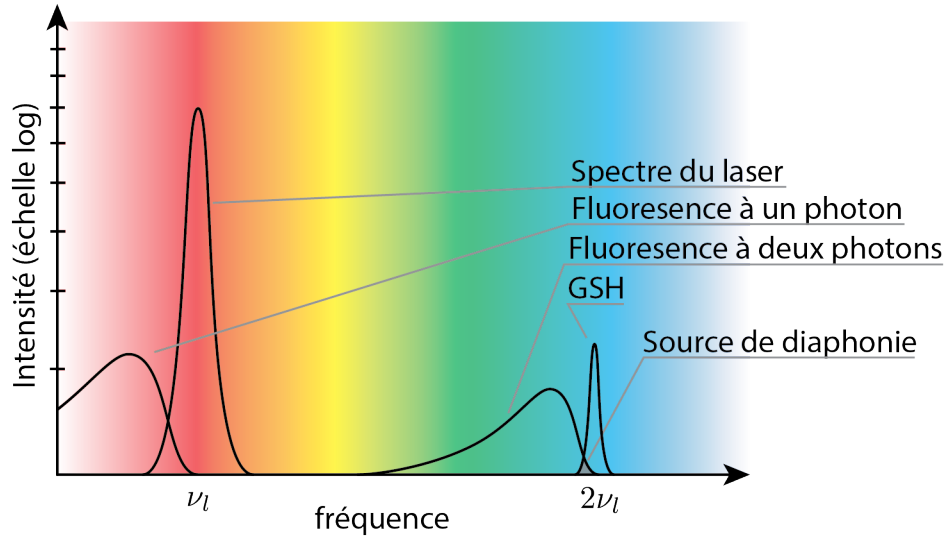


FIGURE 2.9 Représentation qualitative des spectres des différents phénomènes physiques en œuvre dans un microscope non-linéaire. On considère ici un laser de fréquence ν_l . La superposition entre les spectres de F2P et de GSH constitue une source possible de diaphonie.

La GSH a déjà été utilisée en parallèle de la F2P par Miri *et al.* (2012) pour observer les cordes vocales. Des variations de signaux non-linéaires en fonction de la profondeur dans les tissus ont été observées et correspondent aux variations de concentrations en élastine et en collagène énoncées par Hirano *et al.* (1983). Cette étude supporte le fait qu'un microscope utilisant simultanément la microscopie confocale, la GSH et la F2P constitue une approche intéressante pour dépasser les limites des techniques actuelles pour observer les cordes vocales. Elle souffre cependant de ne pas présenter de comparaison directe entre des images histologiques et non-linéaires, ce qui aurait permis de valider les résultats obtenus. La comparaison est difficile car le champ de vue nécessaire pour colocaliser un échantillon de cordes vocales sur deux modalités est de l'ordre de la taille de leur structures internes ($5\text{ mm} \times 5\text{ mm}$), alors que la microscopie non-linéaire ne couvre directement que des surfaces d'environ $500\text{ }\mu\text{m} \times 500\text{ }\mu\text{m}$

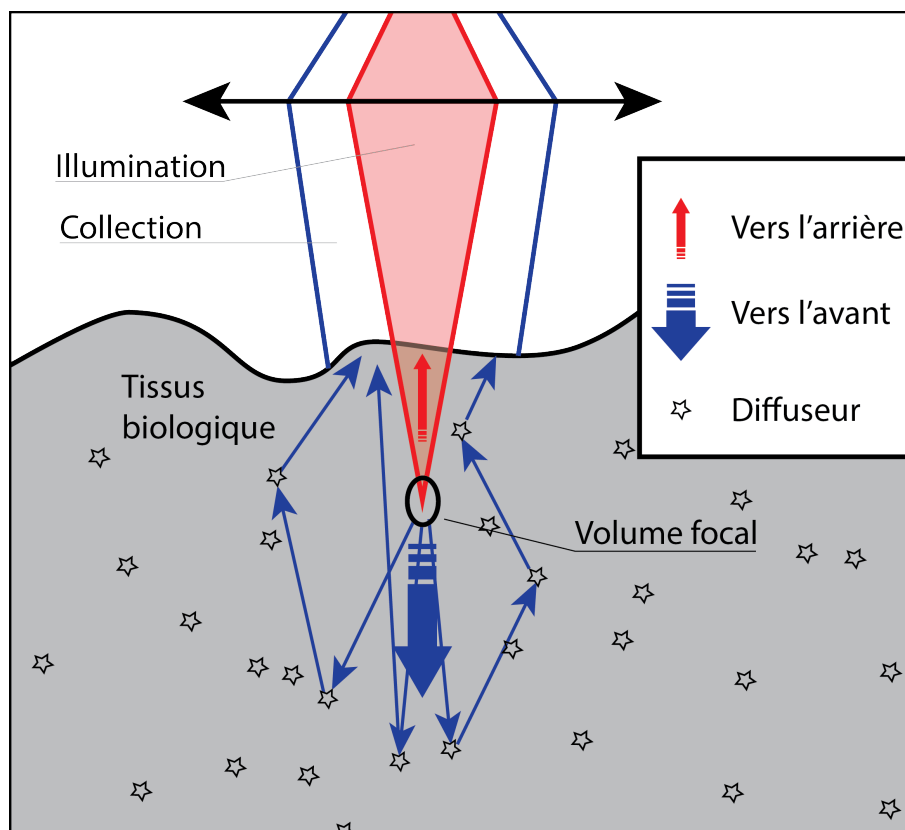


FIGURE 2.10 Schéma représentant les directions de propagation typiques des photons issus de la génération de seconde harmonique. Le signal généré vers l'avant peut être récupéré même dans un montage en épi-illumination grâce à la diffusion du tissu environnant.

2.3 Propositions de recherche

Pour comprendre pourquoi la microscopie non-linéaire a été envisagée dans ce projet, nous avons exposé dans les sections précédentes l'état des connaissances sur la structure des cordes vocales. En parallèle, nous avons vu que l'histologie, la technique de référence pour étudier ce tissu, limite actuellement la progression des recherches. Les différentes modalités qui permettent d'imager les cordes vocales ont ensuite été exposées. À la lumière de ces informations, on présente ici les objectifs énoncés pour ce projet de recherche.

Objectif principal

Développer un système d'imagerie non-linéaire pour évaluer la capacité de ce type d'imagerie à observer les cordes vocales.

Objectifs spécifiques

- Concevoir un microscope non-linéaire qui réponde aux besoins de l'imagerie à grand champ d'échantillons de cordes vocales ;
- Valider les capacités du microscope en observant des coupes histologiques de cordes vocales et en comparant les résultats obtenus avec l'histologie ;
- Étudier le potentiel de la microscopie non-linéaire à être utilisée *in vivo* en prenant des images d'échantillons épais de cordes vocales.

Chapitre 3

SYSTÈME D'IMAGERIE

Controlling a laser with Linux is crazy

Linus Torvalds

La conception et l'implémentation du système d'imagerie non-linéaire utilisé constituent une étape majeure de ce projet de recherche. Bien que des microscopes similaires existent dans le commerce¹, il a été choisi d'assembler notre système à partir de composants optiques de base. Cette approche augmente grandement notre contrôle sur les paramètres d'imagerie, et nous permet de personnaliser les fonctions du système pour correspondre parfaitement aux besoins des expériences. Après avoir présenté la partie matérielle du système dans son ensemble, nous détaillerons les choix de conception. Enfin, nous discuterons du développement de la partie logicielle du système qui concerne le contrôle du microscope, l'acquisition et le traitement des images.

3.1 Présentation du système

Le système optique exposé en figure 3.1 se compose d'un laser femtoseconde Titane-Saphire (FemtoRose 10, *R&D Ultrafast Lasers Ltd.*, Hongrie), pompé par un laser continu à 532nm (Verdi V-10, *Coherent Inc.*, Californie). Pendant son fonctionnement, le laser femtoseconde est réglé de sorte que son spectre de sortie ait une largeur à mi-hauteur d'environ 50nm, centré à 780nm. Cela correspond à une durée à mi-hauteur minimale de 42 femtosecondes si on suppose les impulsions Fourier-limitées (voir section 2.2).

La suite du système optique peut se décomposer en plusieurs grandes sections. La première correspond au module de caractérisation du faisceau permettant de mesurer le spectre du laser infrarouge. On tourne la polarisation de la lumière en sortie de l'oscillateur à l'aide d'une lame demi-onde placée sur une platine de rotation motorisée (PRM1Z8E, *Thorlabs, NJ*). Un cube séparateur de polarisation prélève une fraction du faisceau incident pour l'envoyer vers la tête de mesure d'un spectromètre optique. La partie non-déviée du faisceau poursuit sa route vers un miroir semi-réfléchissant (BP108, *Thorlabs, NJ*) qui en prélève 8%. Cette portion est dirigée vers un puissance-mètre (PM100 USB et sphère intégratrice S142C, *Thorlabs*,

1. Parmi les constructeurs de microscopes non-linéaires, on peut citer Olympus (Fluoview FV1000MPE) et Nikon (A1rMP).

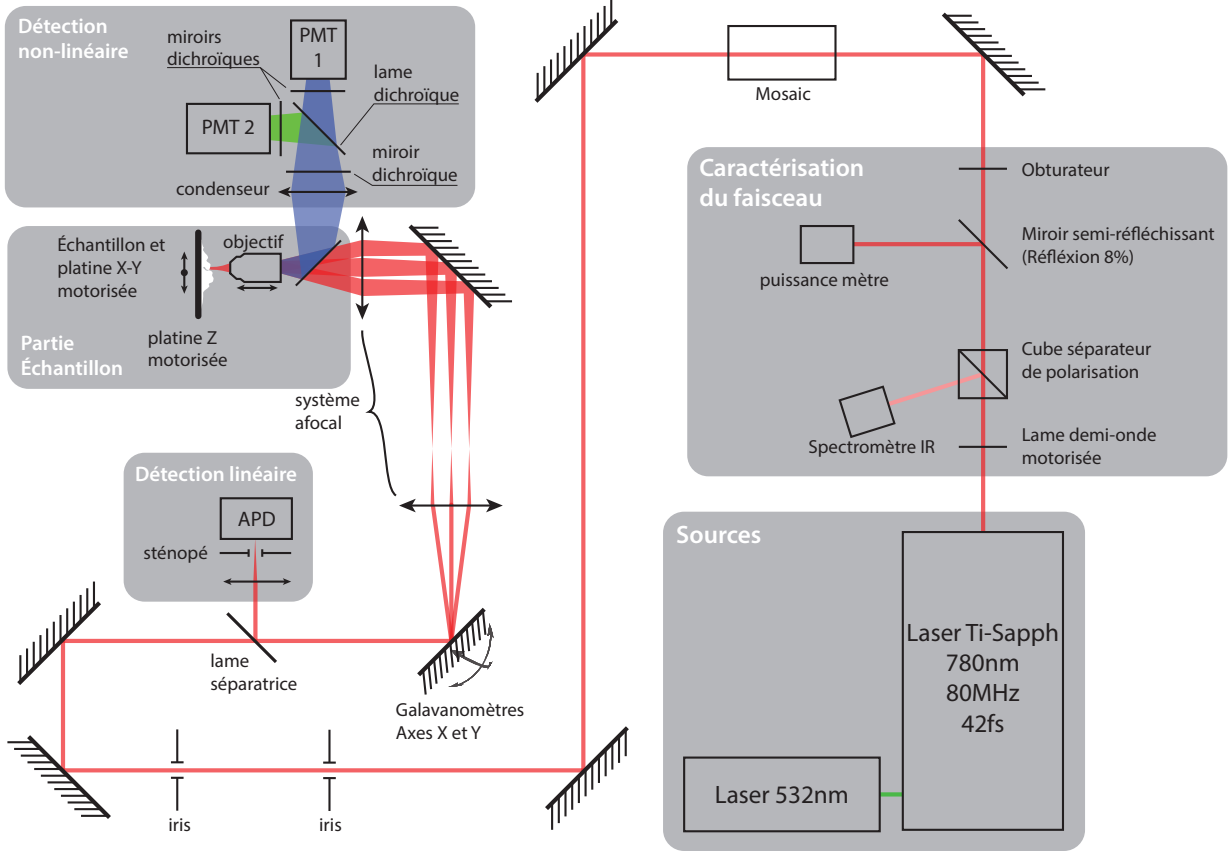


FIGURE 3.1 Vue d'ensemble du microscope non-linéaire

NJ). La section de caractérisation du faisceau se termine par un obturbateur contrôlé par ordinateur (SH05 avec contrôleur SC10, *Thorlabs, NJ*). L'ensemble est enfermé dans une enceinte opaque pour que les faisceaux laser soient confinés lorsque l'obturbateur est fermé. L'opérateur peut alors travailler sur le module d'échantillon sans danger.

En sortie de la section de caractérisation du faisceau, le laser passe par un système de compensation de dispersion (MosaicTM Pro, *Femtolasers, Autriche*). Ce dernier est nécessaire pour conserver la faible durée des impulsions comme vu en section 2.2. Il est composé de miroirs à dispersion de vitesse de groupe négative, qui compensent la dispersion créée par les lentilles du microscope. Le laser atteint ensuite un ensemble de miroirs galvanométriques (6215H, *Cambridge Technology, États-Unis*) à deux axes, avant de passer par un système afocal et, enfin, l'objectif de microscope (UMPLFLN 20XW, LUMPLFLN 40XW, 60XW et XLUMPLFLN 20XW, ouvertures numériques respectives 0,5, 0,8, 1 et 1, *Olympus, Japon*). Ce dernier est fixé sur une platine de translation motorisée (M-111.1DG, *Physik instrumente, Allemagne*) qui permet une translation le long de l'axe Z (dimension de la profondeur et

axe optique de l'objectif) pour les acquisitions. Par ailleurs, l'échantillon est installé sur une platine de translation motorisée suivant les deux axes X et Y normaux à l'axe optique de l'objectif (MAX202, *Thorlabs*, États-Unis). Bien que le mouvement des galvanomètres déplace également le faisceau de l'échantillon suivant ces axes, la platine permet de faire des acquisitions avec un beaucoup plus grand champ de vue en assemblant plusieurs images.

Le microscope est un montage en épi-illumination. Un objectif unique sert donc pour la détection et l'illumination. Pour mesurer les signaux générés par les tissus, le microscope est équipé de deux modules distincts. Les signaux non-linéaires, pour lesquels les photons diffus sont exploitables (voir 2.2) sont détectés au plus près de l'échantillon. On insère donc un miroir dichroïque (650dcxru, *Chroma Technology Corp.*, États-Unis) entre l'objectif et le montage afocal pour sélectionner par longueur d'onde le signal non-linéaire et l'envoyer vers les photomultiplicateurs. On s'assure que le signal du laser ne rentre pas dans cette zone avec un second miroir dichroïque (ET670sp-2p8, *Chroma Technology Corp.*, États-Unis). Un troisième miroir dichroïque sépare ensuite les photons de génération de seconde harmonique de ceux de fluorescence à deux photons (440dcxru ou 425dcxru, *Chroma Technology Corp.*, États-Unis). Les signaux sont une dernière fois filtrés (HQ400/40m-2p ou HQ400/20m-2p d'un côté, HQ420lp de l'autre, *Chroma Technology Corp.*, États-Unis) avant d'atteindre les photomultiplicateurs (H10492-003, *Hamamatsu*, Japon). La transmittance en fonction de la longueur d'onde des miroirs dichroïques d'importance se trouve en figure 3.2. Le signal confocal est quant à lui prélevé en amont des galvanomètres car il est nécessaire de maintenir la colocalisation des points focaux d'illumination et de détection en permanence (voir 2.2). Un miroir semi-réfléchissant (BP145B2, *Thorlabs*, États-Unis) en dirige une partie vers une lentille de collimation, un trou de sténopé et une photodiode à avalanche (PDA10CF, *Thorlabs*, États-Unis).

Les trois détecteurs sont reliés par une carte d'acquisition (PCI-6115, *National Instruments*, États-Unis) à un ordinateur. Un logiciel centralise toutes les fonctions commandées numériquement du microscope.

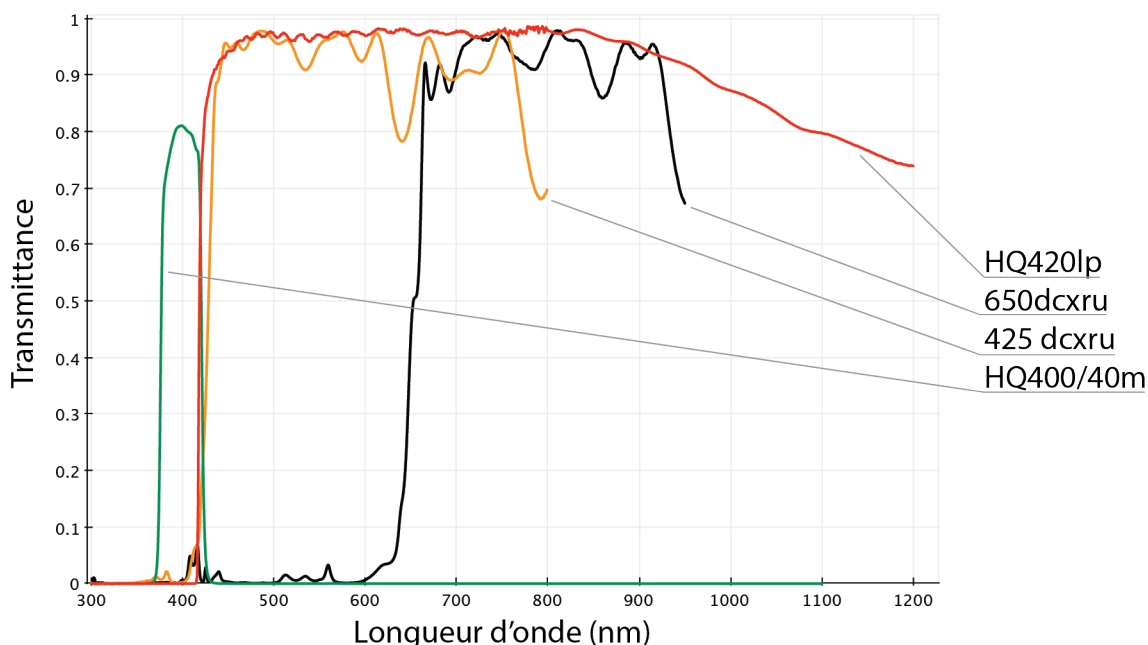


FIGURE 3.2 Transmittance en fonction de la longueur d'onde des miroirs dichroïques du montage.

3.2 Choix des composants utilisés

Nous allons ici détailler quelques-uns des choix de conception qui ont été faits pour le microscope. Dans un premier temps, le bloc de caractérisation du faisceau répond à plusieurs besoins. Il confine le faisceau lorsque l'obturateur est fermé pour protéger l'échantillon en l'absence d'acquisition. Il permet aussi de surveiller les caractéristiques du laser. Avec la mesure de puissance, on cherche à connaître l'énergie absorbée par l'échantillon. Les pertes qui ont lieu tout au long du chemin optique entre la lame séparatrice du puissance-mètre et l'objectif sont mesurées pour étalonner le système, mais il serait possible d'obtenir une estimation plus précise de la puissance transmise à l'échantillon en déplaçant le détecteur à proximité de l'objectif. Il a cependant été choisi de le placer très en amont pour que la mesure puisse être faite même lorsque l'obturateur est fermé. Le logiciel peut alors optimiser la puissance du faisceau avant de commencer l'imagerie.

Pour moduler l'intensité du laser, le système utilisé permet de dévier une partie du faisceau incident au lieu de l'absorber. On met à profit ce second faisceau pour le spectromètre. On gagne ainsi en puissance, car il n'est pas nécessaire de prélever une partie du faisceau ailleurs dans le système. En revanche, il n'est plus possible de faire la mesure de spectre lorsque le montage est réglé pour une intensité maximale à l'objectif.

Une fois que le laser a traversé la partie de caractérisation du faisceau, il est dirigé vers les galvanomètres. Les deux contraintes spécifiques sur ces derniers portent sur la surface des miroirs et la vitesse de rotation. La surface doit être suffisante pour réfléchir le faisceau laser au complet. Ce dernier mesure environ 4 mm de diamètre à ce niveau du microscope. D'autre part, les galvanomètres doivent être assez rapides pour permettre l'acquisition d'images de 512 par 512 pixels en moins d'une demi seconde. Le couple de galvanomètres choisi (6215H, *Cambridge Technology*, États-Unis) permet d'atteindre une vitesse de balayage de $2kHz$ avec des miroirs de 6 mm de diamètre d'acceptance. Il est donc possible de faire l'acquisition de quatre images par seconde si on utilise un algorithme de balayage unidirectionnel.

À la sortie des galvanomètres, le faisceau entre dans un système afocal pour être élargi, et ainsi remplir complètement la pupille de l'objectif. Le microscope est conçu pour être utilisé avec plusieurs objectifs en fonction de la taille de la région d'intérêt dans l'échantillon. Il est donc nécessaire de faire varier le facteur de grossissement du montage afocal pour remplir chacune des pupilles au mieux tout en limitant les pertes d'énergie par écrêtage. C'est pourquoi le microscope est équipé avec deux jeux de lentilles ; un couple de focales 100 mm et 200 mm pour obtenir un grandissement de facteur 2, et un couple 50 mm - 250 mm pour un facteur 5. On note que l'espacement total entre les lentilles reste inchangé pour augmenter leur interchangeabilité.

En plus de remplir au mieux la pupille des objectifs, le montage afocal doit permettre le passage du faisceau sans écrêtage aux débitements angulaires importants. Les angles admissibles varient en fonction des objectifs. A titre d'exemple, le XLUMPLFLN 20XW autorise 3 degrés d'angle d'écart par rapport à son axe optique. La lentille du montage qui est la plus proche est à 250 mm. Le centre du faisceau peut passer au niveau de cette lentille jusqu'à 13 mm de l'axe optique. Si son diamètre est de 4 mm aux galvanomètres, il fait donc 20 mm au niveau de la dernière lentille. Le faisceau s'étend donc ici jusqu'à 23 mm de l'axe optique. On comprend que les lentilles conventionnelles de 1 pouce (25,4 mm) de diamètre ne seront pas suffisantes ici. Elles sont donc remplacées par des lentilles de 2 pouces.

Intéressons nous maintenant à la manipulation de l'échantillon. Il doit être possible de faire des images en volume des cordes vocales sur des dimensions de l'ordre du millimètre en profondeur (axe noté Z) et du centimètre dans les deux autres directions (X et Y). Les galvanomètres permettent d'obtenir des images d'un champ de vue limité à 500 μm dans les directions X et Y , ce qui ne correspond pas à nos besoins. Des platines de translation motorisées suivant les trois axes sont donc nécessaires. Les besoins en débatement sont extrêmement différents pour les axes X et Y comparativement à Z . C'est pourquoi les deux premiers sont pris en charge par une première platine (MAX202, *Thorlabs*, États-Unis) alors qu'une seconde permet un déplacement suivant Z . Cela nous permet d'obtenir à coût égal

un positionnement plus précis en profondeur.

Outre la sélection des miroirs dichroïques, le choix des détecteurs est critique pour la zone de détection non-linéaire. Des tubes photomultiplicateurs ont été choisis pour leur très haute sensibilité ainsi que leur grande surface active. Le microscope a été équipé avec des modules complets comprenant le tube de photomultiplication, une alimentation à haute tension et un amplificateur transimpédance pour obtenir un signal de sortie encodé en tension. Le modèle retenu est le H10492-003 (*Hamamatsu*, Japon) pour son pic de sensibilité centré à 400 nm et sa bande passante de 8 MHz qui permet une grande résolution temporelle.

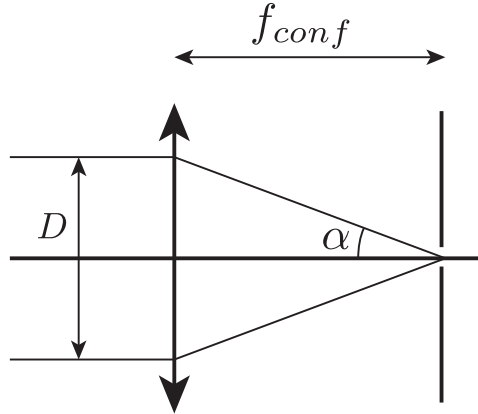


FIGURE 3.3 Schéma du couple lentille-sténopé du détecteur confocal

La combinaison de la lentille de collimation et du sténopé détermine le compromis entre le sectionnement optique, la résolution latérale et le rapport signal sur bruit au sein du détecteur confocal. Ce compromis est détaillé dans l'article de Wilson et Carlini (1987), avec en particulier l'introduction d'une mesure de la taille du sténopé en "coordonnées optiques" : $v_p = k.r.\sin(\alpha)$ (figure 3.3). Dans cette expression, $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ avec λ la longueur d'onde et r est le rayon du sténopé circulaire. v_p représente la valeur de la taille du sténopé en "coordonnées optiques".

L'article donne des détails sur les valeurs de v_p à choisir pour optimiser chacun des trois facteurs du compromis. Pour maximiser le signal collecté sans compromettre la résolution axiale, une valeur $v_p = 5$ est choisie lors de cette expérience. Les calculs donnent un diamètre de sténopé de 50 μm pour une lentille de distance focale 100 mm (v_p est alors environ égal à 5,05).

3.3 Cahier des charges de la partie logicielle

Les logiciels qui permettent de faire fonctionner le microscope ont été conçus spécifiquement pour cette expérience. Il a été choisi de séparer l'implémentation en deux applications distinctes, l'une pour contrôler directement le microscope et acquérir les images et l'autre pour les traiter et les visualiser. Les points du cahier des charges sont divisés entre les deux programmes détaillés ci-dessous.

3.3.1 Contraintes communes aux deux logiciels

Les deux programmes doivent employer là où c'est possible des outils facilitant son déploiement sur différentes plateformes informatiques². Si des interfaces de programmation liées à un environnement doivent être utilisées, l'implémentation du logiciel doit s'en protéger en séparant les accès qui y sont fait dans le code source, et en les désactivant sélectivement à la compilation.

D'autre part, pour faciliter l'interopérabilité avec les autres logiciels développés au laboratoire, le code doit se baser sur le langage de programmation C++ (version C++98 ou C++03). Dans le même esprit, la librairie standard du C++ doit être utilisée là où c'est possible.

3.3.2 Programme de contrôle du microscope

La fonction principale du programme de contrôle est de commander les galvanomètres et de reconstruire des images à partir des signaux de sortie des détecteurs pour les présenter à l'opérateur. Le cœur du programme est donc une interface avec la carte d'acquisition (PCI-6115, *National Instruments*, États-Unis) connectée à l'ordinateur de contrôle. Cette carte dispose de quatre canaux de conversion analogique-numérique dont trois sont occupés par les signaux des détecteurs. Elle compte aussi deux canaux de conversion numérique-analogique qui sont reliés aux galvanomètres.

Algorithme de balayage : Le cahier des charges du balayage des galvanomètres est simple. Il faut que l'acquisition d'une image de 512 lignes soit réalisable en moins d'une demi-seconde, et que la position des galvanomètres soit précise. Le microscope répond à l'ensemble de ces besoins avec un algorithme dit "unidirectionnel" dont le principe est illustré

2. Une plateforme ou environnement informatique définit principalement une architecture de processeur et un système d'exploitation.

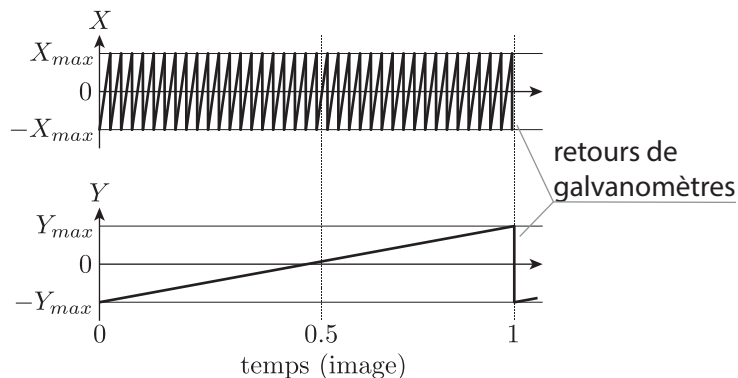


FIGURE 3.4 Schéma de principe du balayage unidimensionnel représentant l'angle des deux galvanomètres en fonction du temps.

en figure 3.4. Les images sont acquises ligne par ligne. Ces dernières sont orientées suivant l'axe "rapide" de l'image (X sur la figure 3.4).

Cet algorithme suppose une vitesse du galvanomètre de l'axe rapide infinie entre l'acquisition de chaque ligne. Cette impossibilité se traduit par des imprécisions sur la position du laser dans l'échantillon pendant l'acquisition. Les extrémités des images dans le sens de l'axe rapide sont déformées. Pour éliminer ces zones appelées "retours de galvanomètres", l'algorithme est complété par la possibilité pour l'opérateur d'ajouter un temps de retour non-nul dans la commande de position de l'axe rapide. Les échantillons acquis par la carte pendant cette période sont ensuite rejetés, comme illustré en figure 3.5.

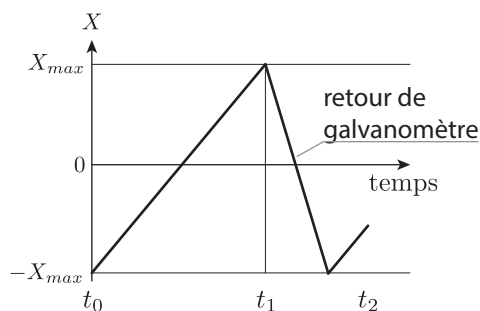


FIGURE 3.5 Retour de l'axe rapide du balayage unidirectionnel. On ne garde les points acquis qu'entre t_0 et t_1 . L'opérateur contrôle le ratio $\frac{t_2-t_1}{t_1-t_0}$.

Sessions d'imagerie et métadonnées : Le logiciel doit permettre à l'opérateur de faire des session d'imagerie au cours desquelles plusieurs images du même échantillon sont enregistrées automatiquement à des positions différentes dans le but de les assembler. Il doit

également supporter un protocole de métadonnées pour que les informations relatives à la position et aux paramètres du microscope soit enregistrées et qu'elles puissent être lues par le logiciel de traitement.

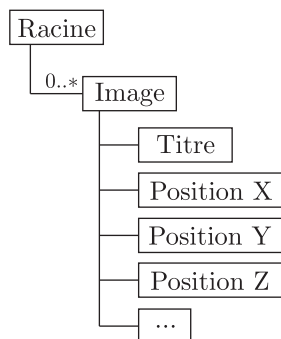


FIGURE 3.6 Structure de donnée du fichier XML de session d'imagerie.

En ce qui concerne les métadonnées, il a été choisi de ne pas utiliser les possibilités spécifiques aux différents formats numériques d'images car ces derniers ne correspondent pas parfaitement à nos besoins et varient d'un format à l'autre. Au lieu de cela, les images d'une session sont enregistrées en parallèle d'un fichier XML qui répertorie toutes les informations suivant un arbre de données représenté en figure 3.6.

Obturbateur Le logiciel doit disposer d'un mode automatique de gestion de l'obturbateur du laser. Dans ce mode, l'obturbateur ne s'ouvre que pendant l'acquisition des images et reste fermé entre les sessions d'imagerie et pendant les temps de déplacement des platines motorisées.

Contrôle de la puissance Le logiciel doit contrôler en permanence la puissance de sortie du laser et faire les ajustement nécessaires pour respecter une consigne donnée par l'opérateur. En outre, si un changement de puissance trop important ou brusque est détecté, le logiciel doit le considérer comme une anomalie et interrompre l'acquisition.

3.3.3 Programme de traitement des images

Le cœur de ce logiciel est un moteur graphique tridimensionnel en temps réel. Des sessions d'imagerie peuvent être chargées, et les images correspondantes sont placées suivant les informations du fichier XML à la position à laquelle elles ont été acquises dans un espace virtuel.

La première mission de ce programme est d'ouvrir les fichiers XML de session d'imagerie et d'afficher à l'utilisateur une reconstitution où les images sont à la position où elles ont été acquises. Le logiciel doit permettre de se déplacer dans l'espace reconstruit pour observer les détails des structures. Enfin, il doit permettre d'exporter les mosaïques finales pour qu'elles puissent être traitées par d'autres logiciels.

3.4 Implémentation des logiciels

La première partie de cette section s'intéresse aux choix de la librairie d'interface graphique sur laquelle les logiciels reposent, car cette décision influence leur structure au complet. Dans un second temps, on énonce les paradigmes qui ont dirigé la programmation. Enfin, on présente les deux logiciels en eux-mêmes.

3.4.1 Librairie d'interface graphique

Si on simplifie les composants d'un logiciel à l'extrême, on peut dire qu'il est fait d'un langage de programmation et d'un ensemble de bibliothèques qui lui donnent accès à des fonctions tierces. Il existe une très grande variété de bibliothèques qui correspondent à des besoins spécifiques. Par exemple, on souhaite que le logiciel soit contrôlable avec une interface graphique (GUI pour *Graphical User Interface*) plutôt qu'en ligne de commande. Pour cela, il nous a fallu faire un choix parmi les bibliothèques appropriées. Ces dernières ont généralement un impact très fort sur la manière dont le programme est structuré, et modifient parfois le fonctionnement même du langage de programmation sur lequel elles reposent. On les appelle donc infrastructures (de l'anglais *framework*). La table 3.1 liste quelques-unes des infrastructures de GUI les plus utilisées. En parallèle, elle donne le système d'exploitation pour lequel ces infrastructures sont conçues et un indicateur de leur portabilité sur d'autres environnements.

TABLEAU 3.1 Liste de différentes infrastructures de GUI, de leur système d'exploitation par défaut et indication de leur portabilité.

Infrastructures de GUI	Système natif	Portabilité
MFC, WinForms, WPF	Windows	Mauvaise
Carbon, Cocoa	OS X	Mauvaise
Gnome, KDE	Linux	Moyenne
wxWidgets, Qt	Aucun	Excellente

Les infrastructures proposées par Windows et OS X ne sont peu ou pas portables sur

différents environnements. Gnome et KDE sont beaucoup plus adaptés pour ce besoin, mais sachant qu’une des premières charges de nos logiciels est d’être multiplateformes, nous avons opté pour une librairie qui n’est pas développée pour un système d’exploitation en particulier. Des logiciels d’imagerie ont déjà été développés au laboratoire, et reposent sur l’infrastructure Qt. Par souci de compatibilité, et dans la mesure où cela n’est pas contraire aux impératifs de notre cahier des charges, la même librairie a été choisie pour nos applications.

Paradigmes de programmation

Le style de programmation choisi pour les logiciels conçus pendant ce projet de recherche est dit “orienté objet”. Avant d’être implémenté, le programme est sectionné en plusieurs parties qui remplissent des fonctions spécifiques. Ces parties, nommées “classes”, contiennent des données et des méthodes³ qui permettent de les manipuler. Ce principe d’encapsulation permet de cacher la complexité du fonctionnement interne des classes et de ne présenter à l’extérieur qu’une interface de programmation⁴ minimaliste. Quand ce principe est bien appliqué, il permet aux éléments du programme de communiquer entre eux sans avoir à connaître le détail de leur fonctionnement interne.

Par extension, les programmes sont conçus de manière modulaire. C’est à dire qu’il est possible de remplacer une classe par une autre du même type sans avoir à faire de modifications à l’ensemble du code. Par exemple, un des modules du programme de contrôle du microscope constitue une interface vers la carte d’acquisition. Il est possible de changer la carte pour un autre modèle sans que cela nécessite de modifier le code de modules sans rapport. Sans rentrer dans les détails de l’implémentation, cette modularité est obtenue en utilisant une fonctionnalité du langage C++ nommée héritage, qui permet de définir une interface de programmation valable pour tous les types de carte d’acquisition. Un diagramme modélisant ce fonctionnement pour le cas de la carte d’acquisition se trouve en figure 3.7.

Du point de vue de l’interface graphique, les programmes adoptent un fonctionnement qui limite au maximum la superposition. Les programmes sont contenus dans une fenêtre principale unique généralement en plein-écran. L’utilisateur peut y diviser l’espace comme il le préfère entre tous les panneaux de fonctions actifs, de sorte à visualiser en permanence tous les paramètres du microscope, et à pouvoir y accéder directement. Enfin, l’interface réduit au maximum les fonctions bloquantes. L’utilisateur est contraint aussi peu que possible à réaliser des actions dans un ordre prédéfini. Ce principe s’oppose au paradigme des assistants de configuration qui étaient populaires sur les anciennes versions de Windows. Un exemple

3. Une méthode est une fonction contenue dans une classe.

4. Une interface de programmation est un ensemble de fonctions fournies par une classe ou un ensemble de classes pour rendre possible leur interaction avec l’extérieur.

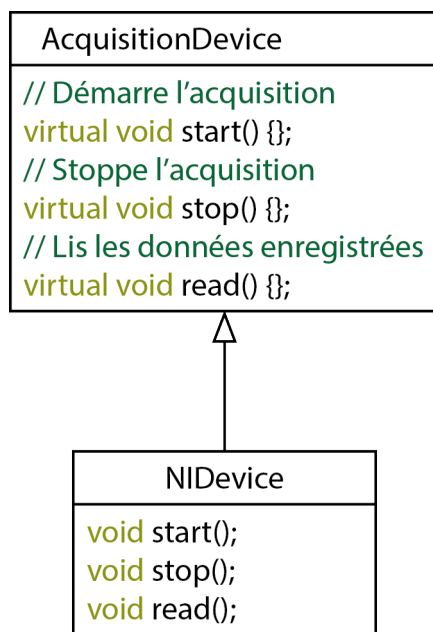


FIGURE 3.7 Diagramme UML (*Unified Modeling Language*) présentant la classe qui interface les cartes d'acquisition de la marque *National Instruments* : **NIDevice**. Cette classe dérive d'une autre, plus générique (**AcquisitionDevice**) à laquelle le reste du programme fait référence.

est fourni en figure 3.8. Les assistants de configuration supposent que l'utilisateur comprend mal le fonctionnement du logiciel, et qu'il est nécessaire de l'informer des conséquences de ses actions. Les programmes de contrôle du microscope ne sont pas faits pour être utilisés par des utilisateurs novices, et justifient donc le rejet des fonctions bloquantes. De cette manière, la rapidité avec laquelle il est possible de configurer les logiciels pour une utilisation donnée est augmentée.



FIGURE 3.8 Exemple d'assistant de configuration (Configuration réseau pour Windows XP).

Programme de contrôle du microscope

La figure 3.9 présente une capture d'écran du programme de contrôle du microscope. Le thème général de l'interface est volontairement sombre pour limiter l'illumination parasite de la salle du microscope. La partie centrale (A) est divisée en deux fenêtres qui accueillent les dernières images prises par le microscope. Le nombre de fenêtres est modifiable à souhait pour rendre compte des différentes modalités que le microscope peut acquérir. Les barres latérales (B et C) contiennent tous les panneaux de paramétrage du microscope, que l'utilisateur peut agencer comme il le souhaite. Le registre du programme se trouve au bas de l'écran (D). Tous les modules peuvent y écrire des messages pour rendre compte de leur état de fonctionnement. D'autre part, l'utilisateur peut accéder grâce à cette fenêtre à un module de script contenu dans l'application. Ce dernier permet d'accéder en ligne de commande à toutes les fonctions du logiciel. Le langage de programmation de ce module n'est pas le C++, mais un langage dérivé du JavaScript normalisé sous le nom ECMAScript. Pour permettre à l'utilisateur de tirer pleinement profit de cette fonctionnalité, la partie centrale du logiciel peut être modifiée pour afficher un éditeur de texte à la place des fenêtres d'acquisition (figure 3.10). Il est alors possible d'ouvrir et d'exécuter des scripts complexes directement dans le programme d'acquisition.



FIGURE 3.9 Capture d'écran du logiciel de contrôle du microscope. Les rectangles exposent la partie centrale (A), les barres latérales (B et C) et le registre du programme (D).

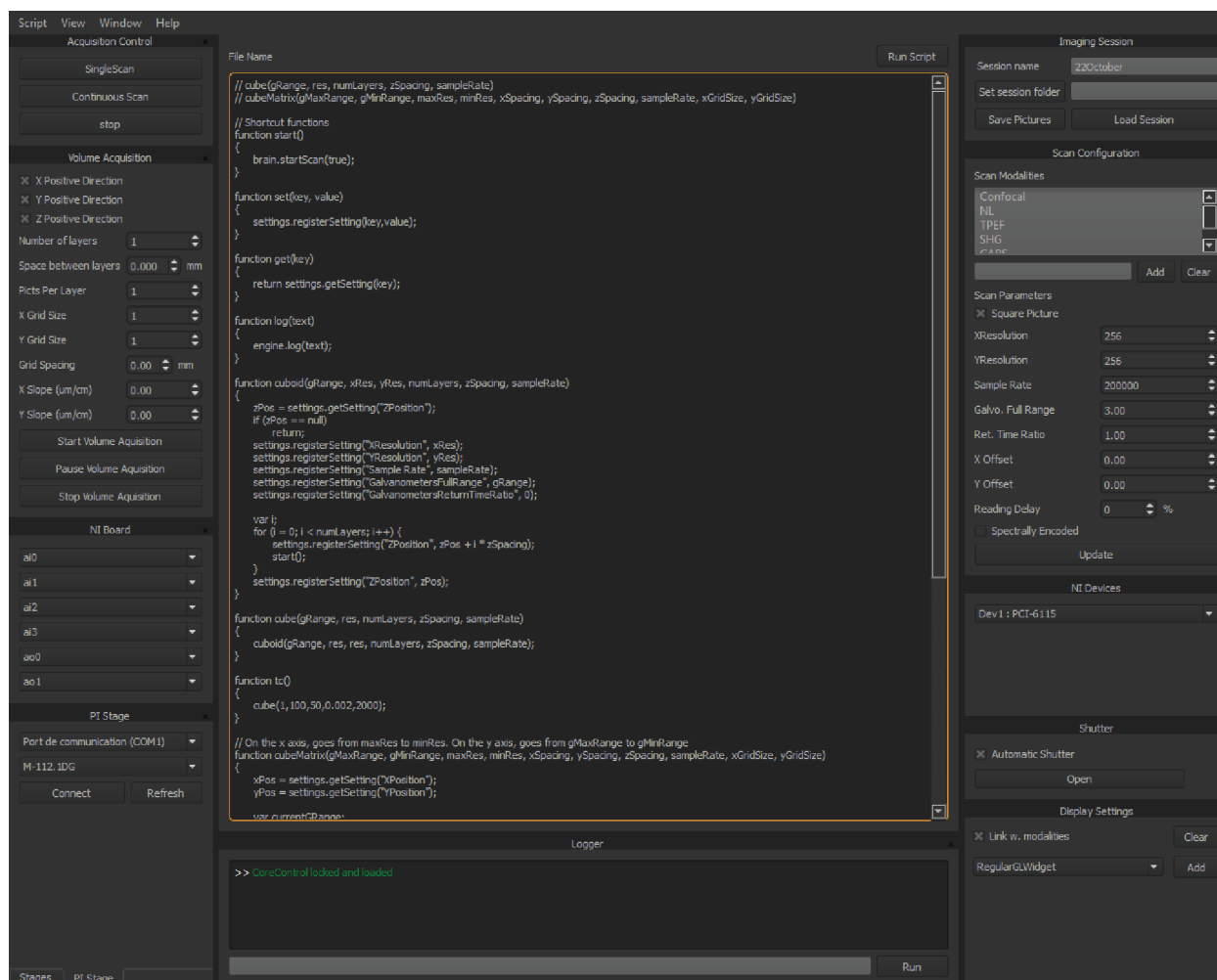


FIGURE 3.10 Capture d'écran du logiciel de contrôle du microscope montrant en partie centrale l'éditeur de texte du module de script.

Programme de traitement des images

On trouve en figure 3.11 une capture d'écran du logiciel de traitement des images du microscope. Son ergonomie est très ressemblante au programme de contrôle présenté précédemment, car les deux utilisent une base de code commune. L'utilisation de ce logiciel est très simple : avec un bouton, l'utilisateur ouvre une session d'imagerie créée précédemment. Le programme charge en mémoire toutes les images associées avec cette session, et les affiche dans la liste présente au bas de l'écran (A). En utilisant le panneau de paramètres d'affichage (B), l'accès à tous les traitements offerts par le logiciel est possible. L'information relative à la position des images dans l'échantillon se trouve dans le fichier de session d'imagerie. Dès que l'utilisateur sélectionne une modalité à afficher, les images correspondantes se mettent en place directement dans la fenêtre centrale. Dépendamment des réglages du microscope (choix de l'objectif en particulier), la taille relative des pixels des images dans l'échantillon varie. Il est nécessaire d'entrer la valeur correspondante dans le champ *Microns per pixel*. Le champ *Rotation Angle* permet de tourner l'image à l'écran et ainsi par exemple de faire correspondre son orientation aux histologies prises séparément. Les réglages suivant permettent de changer la luminosité et la correction gamma des images.

Bien que le logiciel ait été majoritairement utilisé pour afficher des images en deux dimensions, il est capable de prendre en compte et de représenter des images à des profondeurs différentes dans l'échantillon (figure 3.12). Pour ce faire, il est nécessaire d'activer la transparence des images avec l'option *Transparency*. D'autre part, sachant que l'information de la position des images est encodée avec précision par les platines motorisées du microscope, le logiciel peut afficher une barre d'échelle sur la mosaïque assemblée. Les paramètres qui suivent dans le panneau de réglages servent à régler la résolution souhaitée pour exporter des images au format JPEG. Les deux dernières fonctions de ce panneau servent à limiter le bruit dans les images affichées. La première est un seuillage classique qui rend noirs tous les pixels d'intensité inférieure à une valeur donnée. La seconde est une fonction de soustraction très utile pour supprimer les réflexions parasites de certains composants du microscope. L'utilisateur indique une modalité et une image qui ne contient pas d'échantillon. L'intensité de l'image sélectionnée est soustraite pixel par pixel à toutes les images de la modalité sélectionnée.

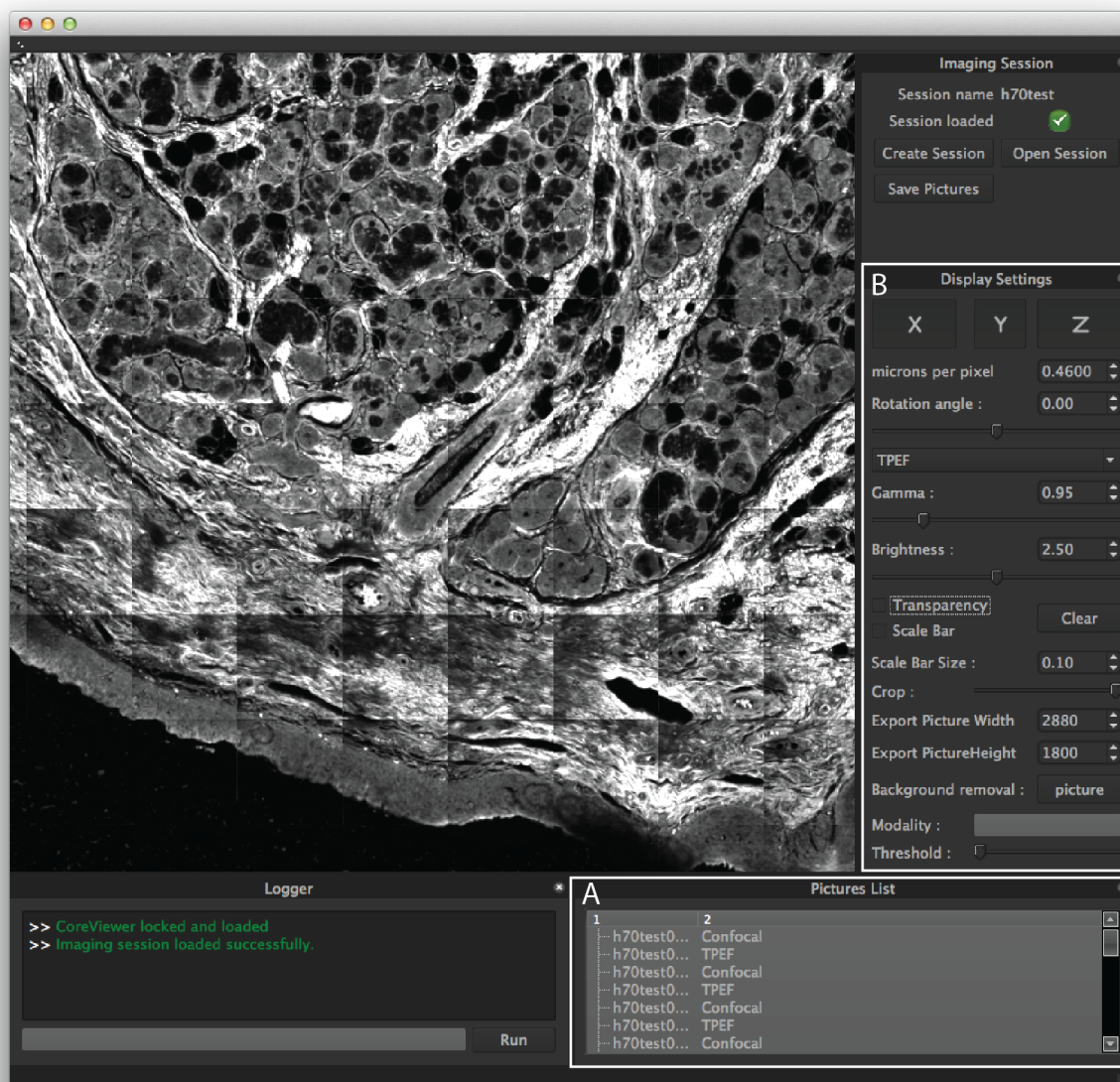


FIGURE 3.11 Capture d'écran du logiciel de traitement des images. La liste des images correspond au rectangle (A), et le panneau de paramètres d'affichage se trouve en (B).

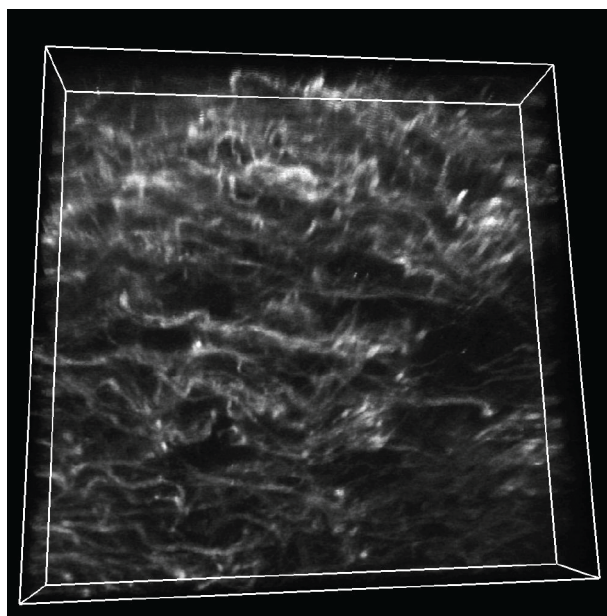


FIGURE 3.12 Pile en Z (direction de la profondeur dans l'échantillon) visualisé avec le logiciel de traitement des images.

Chapitre 4

ÉCHANTILLONS OBSERVÉS & PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX

Le réel n'a pas forcément fait Polytechnique.

Étienne Klein

La première section de ce chapitre se consacre à la description des échantillons observés et de leur mode de préparation. On détaille dans un deuxième temps les paramètres utilisés pour l'imagerie de ces spécimens.

4.1 Échantillons observés

Les échantillons étudiés dans le cadre de cette étude sont de deux types : des coupes histologies de cordes vocales et des cordes vocales entières.

4.1.1 Coupes histologies

Les coupes histologiques de cordes vocales ont été prélevés au *Massachusetts Eye and Ear Infirmary* par l'équipe du docteur Christopher J. Hartnick. Pour chaque spécimen étudié, la corde vocale a été fixée avec une solution de formaline à 10%, puis incorporée dans de la paraffine. Trois coupes sérielles¹ ont ensuite été obtenues. L'une d'elle a été teintée à l'hématoxyline et à l'éosine, la seconde au trichrôme et la troisième laissée sans coloration. La figure 4.1 présente la direction suivant laquelle les coupes histologiques sont faites dans la corde vocale, et la position des points d'encre ajoutés à l'échantillon encore entier.

Ce protocole a été appliqué avec des épaisseurs de coupes variables. Trois spécimens humains adultes et un fœtus ont été étudiés avec une coupe de 5 μm . Une épaisseur de 20 μm a été utilisée pour un autre fœtus, deux spécimens porcins et quatre humains adultes. La table 4.1 liste les différents spécimens étudiés avec leur numéro d'identification.

1. Des coupes sérielles sont successives dans l'échantillon. L'espace qui les sépare dans le tissu initial est donc minimal.

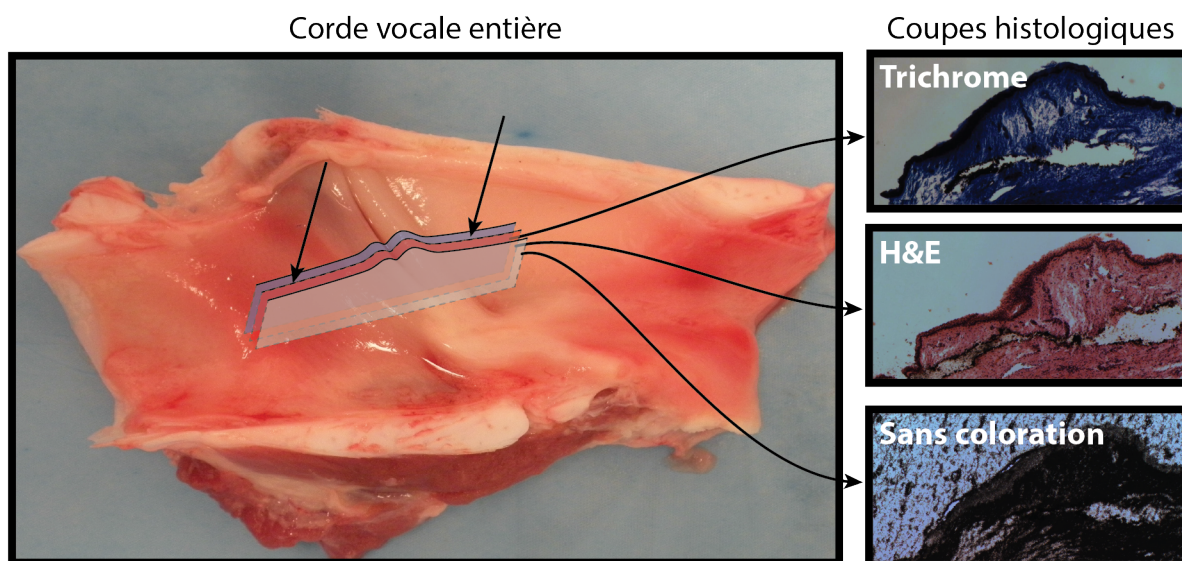


FIGURE 4.1 Présentation de la direction des coupes histologiques prises sur les échantillons de cordes vocales. Les flèches indiquent la position des marquages faits à l'encre.

TABEAU 4.1 Liste des spécimens étudiés pour ce projet.

Spécimen	Population	Épaisseur de coupe
2	Fétus	5 μm
7	Fétus	20 μm
23	Porc	20 μm
28	Porc	20 μm
88	Porc	20 μm
46	Humain	5 μm
48	Humain	5 μm
49	Humain	5 μm
65	Humain	20 μm
67	Humain	20 μm
70	Humain	20 μm
75	Humain	20 μm

4.1.2 Cordes vocales entières

Deux larynx de porc ont été obtenues à l'abattoir L. G. Hebert & fils (Ste-Helene-de-Bagot, QC). Ils ont été conservés à 0 °C pendant deux heures avant d'être ouverts (figure 4.2.A). Chaque larynx a été coupé suivant le plan sagittal et les cordes vocales en ont été extraites sans les endommager, et en conservant leur attachement au cartilage thyroïdal

(figure 4.2.B). De cette manière, la tension des structures internes aux cordes vocales est conservée. Pour l'imagerie, les cordes vocales ainsi extraites sont placées sur une lamelle de microscope d'épaisseur standard numéro 2 (0,19 mm - 0,23 mm) après avoir été humidifiées avec une solution de tampon phosphate salin (PBS). Une lame de scalpel est utilisée pour permettre la colocalisation (figure 4.2.C).

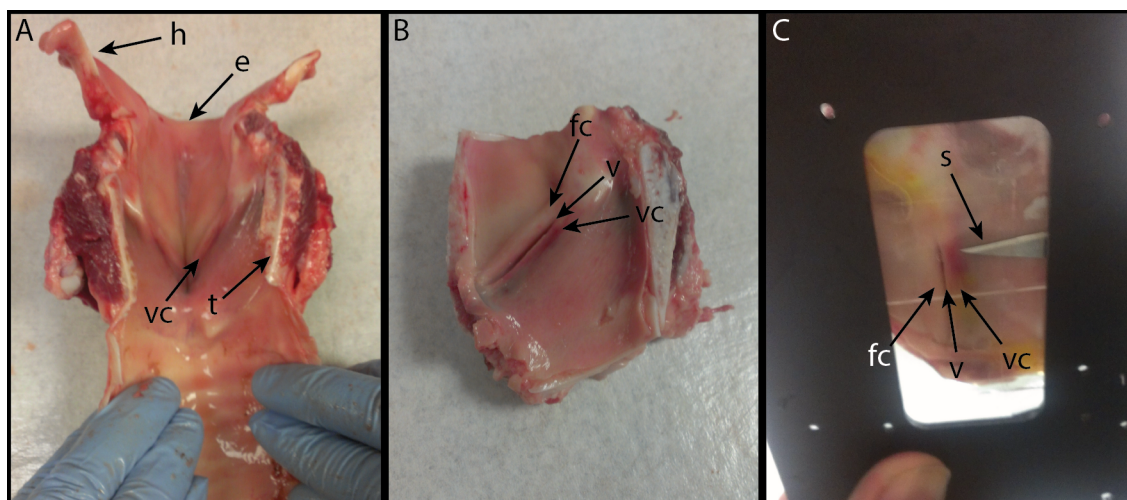


FIGURE 4.2 Étapes de préparation des larynx de porc pour l'imagerie. A : ouverture du larynx, avec les cordes vocales (vc), le cartilage thyroïde (t) et l'épiglotte (e). B : section selon le plan sagittal. On identifie la fausse corde (fc), le ventricule (v) et la vraie corde (vc). C : placement sur une lamelle de microscope après humidification. Une lame de scalpel (s) sert pour la localisation.

4.2 Paramètres d'imagerie

Pour toutes les sessions d'imagerie réalisées durant ce projet, le microscope non-linéaire a été utilisé avec une puissance en sortie du laser impulsionnel de 200 mW. La puissance à la sortie de l'objectif est de 10 mW. L'objectif LUMPLFLN 40XW à immersion d'eau d'ouverture numérique 0,8 (Olympus, Japon) est utilisé pour toutes les acquisitions.

Pour se déplacer dans l'échantillon et chercher la zone à imager, le programme d'acquisition est réglé de sorte à avoir un grand champ de vue et une vitesse de rafraîchissement élevée. L'amplitude de tension envoyée aux galvanomètres est de 5 V, la vitesse d'acquisition de 200 000 pixels/s et la résolution de 256 pixels par 256 pixels.

Les réglages sont différents pour les acquisitions de sorte à optimiser la qualité des images obtenues. L'amplitude de tension aux galvanomètres est de 3 V, la vitesse d'acquisition de 3 500 000 pixels/s et la résolution de 512 pixels par 512 pixels.

Chapitre 5

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Young man, in mathematics you don't understand things.
You just get used to them.

John von Neumann

Ce chapitre expose les résultats des manipulations effectués sur le microscope non-linéaire conçu pour ce projet. On s'intéresse d'abord à la caractérisation des performances du microscope, puis à l'évaluation du potentiel de la microscopie non-linéaire pour imager les cordes vocales.

5.1 Caractérisation des performances du microscope

5.1.1 Validation des effets physiques

A chaque session d'imagerie, le microscope produit des images suivant trois modalités différentes (GSH, F2P et microscopie confocale). La première étape de validation du bon fonctionnement du microscope consiste à vérifier que chacun des phénomènes physiques associés à ces modalités se produit dans l'échantillon et est détecté. Cette étape permet de valider que l'alignement du microscope est correct et que le laser est en mode impulsionnel.

On étudie dans un premier temps la F2P et la microscopie confocale uniquement, car il est facile de les mettre en évidence expérimentalement. Pour cela, une lame de plastique fluorescent à 400 nm a été placée sur le microscope. Le signal relatif aux deux modalités a été enregistré pour différentes positions du volume focal en profondeur.

La figure 5.2 présente le résultat obtenu pour la mesure de l'intensité des modalités confocale et F2P en fonction de la profondeur d'acquisition. Le signal confocal est nul partout sauf dans une zone très localisée. En théorie, si l'indice de réfraction varie très peu à l'intérieur de la lame, le seul point qui peut générer du signal est le dioptre entre le milieu d'immersion de l'objectif et la lame. L'intensité mesurée doit être maximale lorsque la moitié du volume focal est à l'intérieur du plastique (position B sur la figure 5.1). On déduit donc du signal mesuré la position du dioptre. Du côté de la F2P, on remarque que le signal est nul dans le milieu d'immersion et augmente au niveau du dioptre. Il reste élevé dans la lame fluorescente, mais diminue légèrement à mesure que la profondeur augmente. Si on observe plus précisément

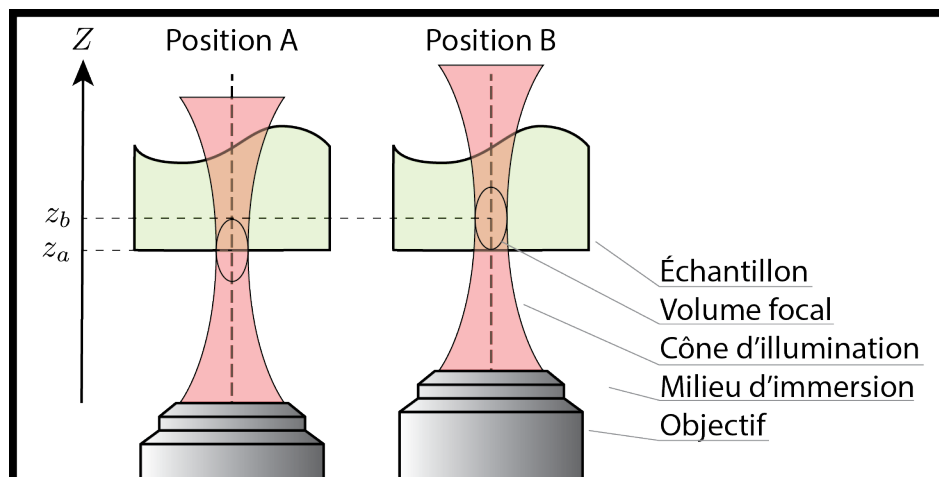


FIGURE 5.1 Représentation des positions du volume focal de l'objectif par rapport à une lame fluorescente qui offre le signal le plus élevé en microscopie confocale (Position A) et en fluorescence à deux photons (Position B).

l'évolution des intensités autour du dioptre, on remarque que le signal confocal atteint son maximum le premier et que le signal non-linéaire cesse de croître pour atteindre une intensité proche de son maximum dès que le signal confocal est éteint. La théorie prévoit que le signal maximal soit atteint en fluorescence à deux photons lorsque le volume focal est complètement dans la lame (position B sur la figure 5.1). En pratique, l'extremum est atteint beaucoup plus loin que prévu dans l'échantillon. On attribue cette différence à la notion de volume focal qui montre ses limites. Les interactions non-linéaires ont en grande majorité lieu à l'intérieur de ce volume défini à partir de la longueur de Rayleigh, mais il s'en produit également en dehors.

Avant d'aller plus loin dans l'utilisation du microscope, il serait en théorie nécessaire de vérifier que la génération de seconde harmonique peut se produire avec des échantillons adéquats. Il est cependant raisonnable de considérer cette étape superflue, car les conditions qui s'appliquent sur le système optique pour que la génération de seconde harmonique puisse avoir lieu sont rigoureusement les mêmes que pour la fluorescence à deux photons.

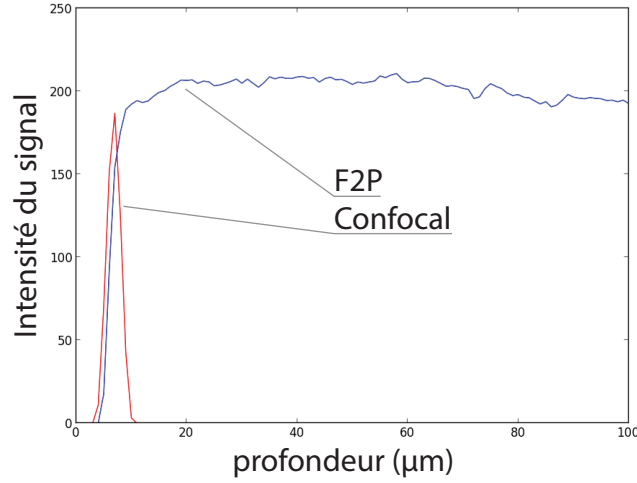


FIGURE 5.2 Mesure de l'intensité du signal confocal (rouge) et de F2P (bleu) en fonction de la profondeur dans une lame de plastique fluorescent.

5.1.2 Validation de la résolution

Nous avons montré dans la section précédente que l'alignement du microscope est suffisamment bon pour que du signal parvienne aux détecteurs. mais il n'est pas encore prouvé que le microscope peut produire des images de bonne qualité. Pour cela, on souhaite avoir une mesure grossière des résolutions (axiale et radiale) du système dans chaque modalité. Pour la direction axiale, on peut se servir des résultats de la section précédente. L'image d'un dioptre d'une plaque fluorescente par un système optique idéal est une impulsion de Dirac en microscopie confocale et une fonction échelon en F2P. Ces distributions idéales sont en pratique convoluées par la fonction de transfert du système optique pour obtenir des fonctions dites d'étalement du point (*Point spread function*) et d'étalement de la bordure (*Edge spread function*). En mesurant la largeur à mi-hauteur de la fonction d'étalement du point, on obtient une première approximation de la résolution du système optique. Pour la fonction d'étalement de la bordure, on mesure l'écart entre les positions qui donnent 10% et 90% du signal maximal. On trouve une résolution axiale valant entre 3 μm et 4 μm dans les deux modalités.

Par comparaison, la résolution théorique axiale z_0 en microscopie non-linéaire est donnée selon Masihzadeh (2010) en fonction de l'ouverture numérique NA , de la longueur d'onde λ de la source lumineuse et de l'indice de réfraction n du milieu par :

$$z_0 = \frac{2n\lambda}{NA^2}$$

Avec nos paramètres, on obtient une valeur numérique de $z_0 = 3,325 \mu\text{m}$, qui correspond bien au résultat obtenu. Pour la microscopie confocale, Webb (1996) donne l'expression suivante :

$$z_0 = \frac{1,5n\lambda}{\text{NA}^2}$$

Cette expression donne une valeur $z_0 = 2,5 \mu\text{m}$ qui est inférieure mais comparable au résultat obtenu expérimentalement.

Pour la mesure de la résolution latérale du microscope, on s'intéresse d'abord à la microscopie confocale. Il suffit de prendre une image d'un échantillon de réflectivité variable présentant des structures de taille connues pour obtenir le résultat. On utilise pour cela une cible de résolution normalisée, dont l'image est trouvée en figure 5.3. On remarque que l'on peut résoudre toutes les barres présentes sur l'image, dont la plus petite est large de $2,2 \mu\text{m}$. On est loin de la valeur limite de $r_{\text{conf}} = \frac{0,44\lambda}{\text{NA}} = 0,44 \mu\text{m}$ donné par Webb (1996), mais on ne dispose pas de cible de résolution présentant des barres plus fines pour tester les limites de notre microscope.

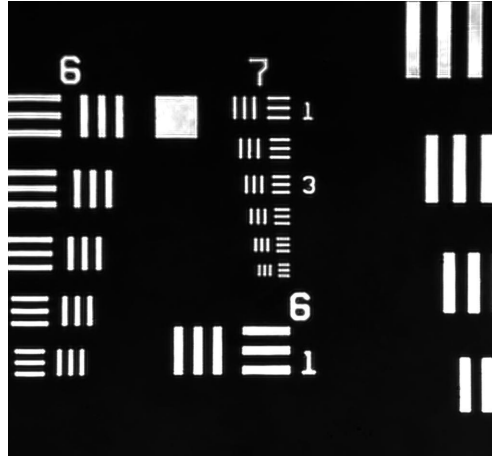


FIGURE 5.3 Image de microscopie confocale présentant une cible de résolution USAF 1951.

La question de la résolution latérale de la F2P est un peu plus difficile à évaluer. Il existe des cibles fluorescentes qui permettent de mesurer avec précision la résolution d'un microscope non-linéaire, mais il ne nous a pas été possible de faire des mesures sur de telles références pendant le temps de ce projet. Pour évaluer grossièrement la qualité de la résolution obtenue avec cette modalité, on présente en figure 5.4 des images de la surface de la lame de plastique fluorescent utilisé pour les tests de résolution axiale. On observe sur l'image un des bords de la lame, qui n'est malheureusement pas assez net pour faire une mesure de la fonction d'étalement de la bordure. On peut cependant extraire une information sur la résolution de

cette image à partir du détail de petite taille visible simultanément en F2P et en microscopie confocale. Cette impureté moins large que $2,5\mu\text{m}$ nous amène à penser que la résolution en F2P est bonne.

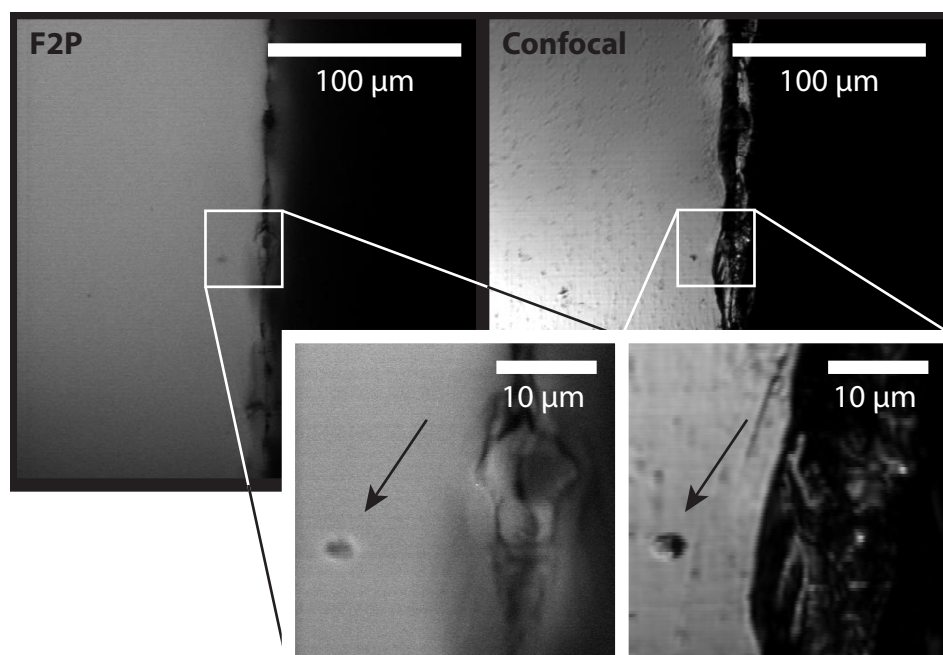


FIGURE 5.4 Images de la surface de la lame de plastique fluorescent utilisée pour les tests de résolution axiale. On note le détail de faible dimension résolu en F2P et en microscopie confocale (flèches).

De la même manière qu'à la section précédente, il serait maintenant temps de s'intéresser à la génération de seconde harmonique, mais ce signal ne présente pas de différence avec la F2P du point de vue du système optique et il n'est donc pas nécessaire de l'étudier.

5.1.3 Séparation des signaux obtenus

Maintenant que nous savons que laser fonctionne en mode impulsionnel et que le système optique est bien aligné, il est temps de s'intéresser à la séparation des différents signaux. Sachant que certaines longueurs d'onde sont communes à la GSH et à la F2P pour notre laser, même un système parfait ne pourrait pas être exempt de diaphonie¹. Hormis la superposition partielle en longueur d'ondes de la GSH et de la F2P, les autres sources possibles de diaphonie sont par exemple la mauvaise réjection des miroirs dichroïques ou la mauvaise

1. Interférence de deux signaux entre eux. Dans le cadre du microscope, on désigne par diaphonie le manquement des composants du système à faire en sorte que chaque canal d'acquisition ne prenne en compte que les événements issus de sa modalité d'imagerie associée.

isolation des canaux de la carte d'acquisition du système. Notre projet requiert que le seuil de diaphonie soit négligeable devant le signal moyen des différentes modalités. Il est possible de mesurer ce seuil, mais nous avons préféré observer directement son impact sur un premier échantillon de corde vocale. La figure 5.5 présente les images d'une corde vocale de porc (spécimen 28). Les trois modalités données par le microscope sont exposées en parallèle avec une coupe histologique colorée à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E). On remarque que les images mettent en valeur des parties différentes de la corde vocale. Par exemple, les flèches pointent sur la figure vers l'épithélium. Cette couche est beaucoup plus claire que le reste du tissu en confocal, alors qu'elle est absente de l'image en génération de seconde harmonique. De la même manière, la *lamina propria* supérieure située juste sous l'épithélium est majoritairement sombre en confocal, alors qu'elle est très lumineuse en F2P. Ces informations nous invitent à penser que le niveau de diaphonie est bas. En revanche, les signaux semblent être d'intensité similaire pour l'épithélium entre la microscopie confocale et la F2P.

Pour être capable d'en dire plus sur le niveau de diaphonie du système, on s'intéresse en figure 5.6 à un grossissement de la corde vocale de la figure 5.5, qui nous permet d'observer plus en détail les structures au niveau cellulaire. On observe sur cette figure que les signaux provenant de l'épithélium sont effectivement très différents entre la microscopie confocale et la F2P ; les flèches *A* pointent vers une zone de plus faible signal en F2P qui correspond à un maximum en confocal. En revanche, les structures pointées par les flèches *B* sont très ressemblantes en F2P et en GSH, et peuvent être dues au recouvrement spectral entre ces deux modalités. Il convient donc de garder à l'esprit que les zones de faible intensité dans les modalités non-linéaires peuvent être dues à de la diaphonie.

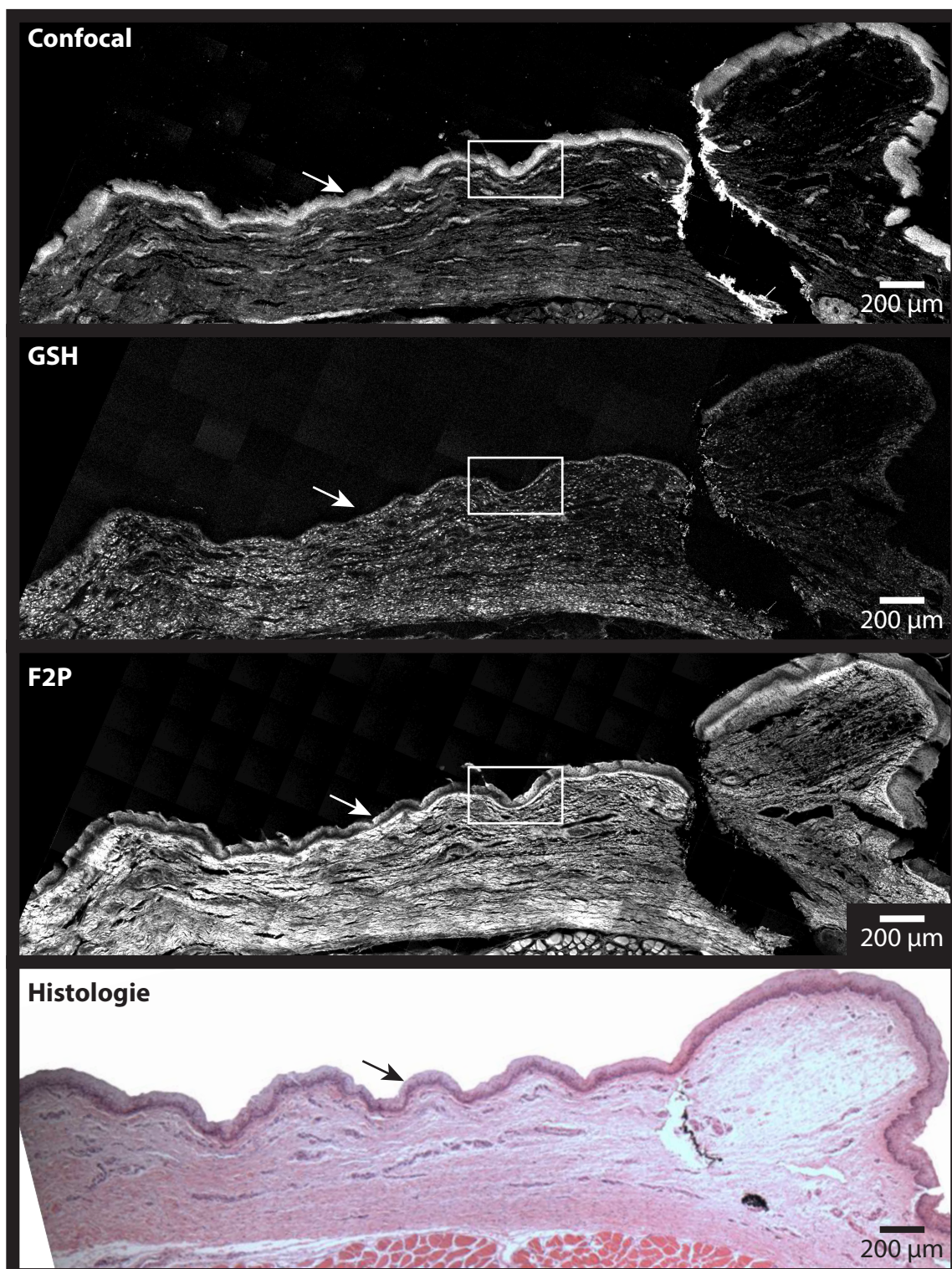


FIGURE 5.5 Images à grand champ de vue de corde vocale porcine (spécimen 28). Les flèches indiquent l'épithélium de la corde vocale. Les rectangles présentent une zone qui est grossie et exposée en figure 5.6

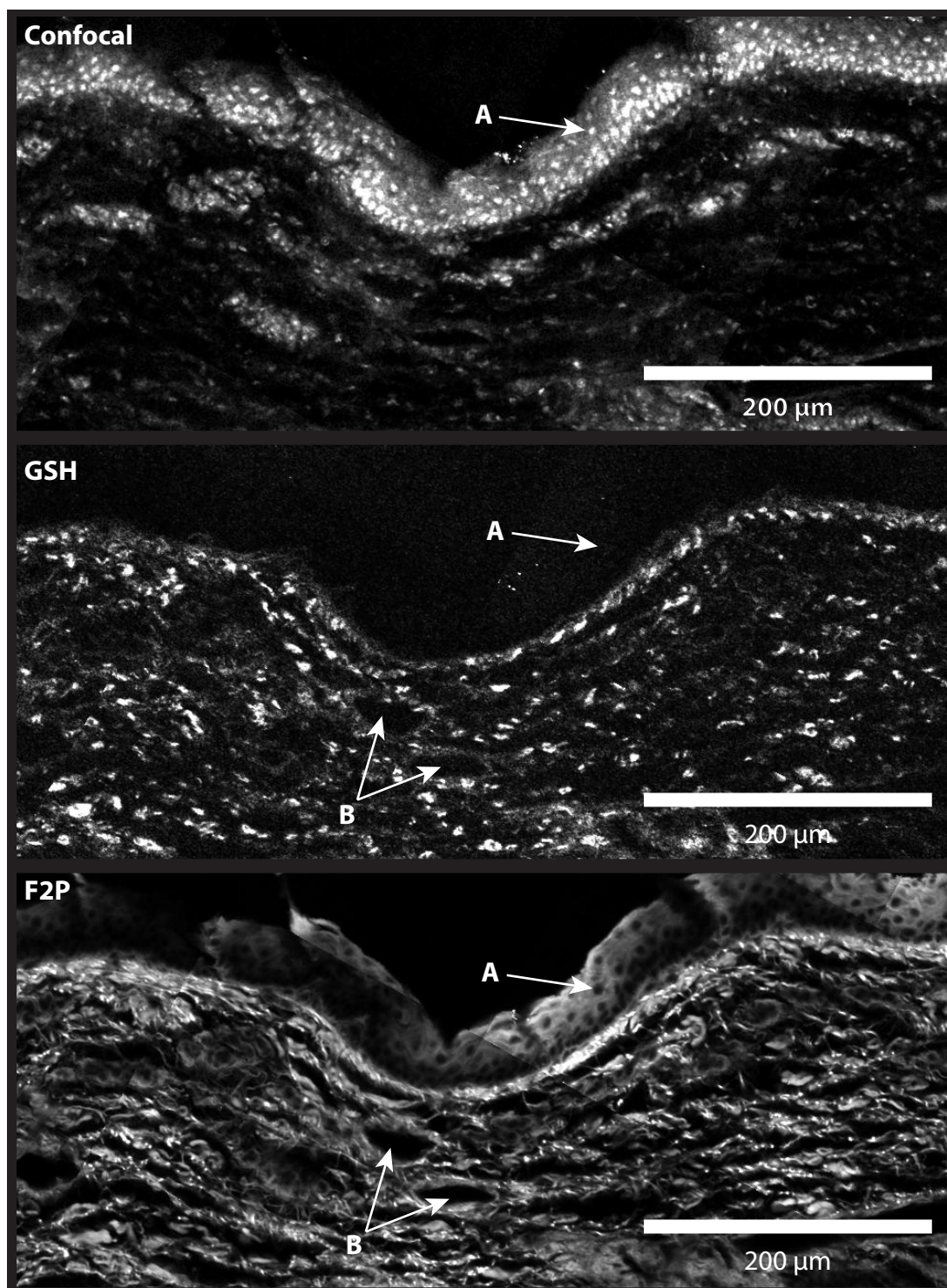


FIGURE 5.6 Grossissement d'une partie de la corde vocale porcine de la figure 5.5 montrant l'épithélium et une partie de la *lamina propria*.

5.1.4 Rétrodiffusion du signal de seconde harmonique

Dans la section 2.2 de la revue de littérature, la direction de propagation privilégiée du signal de GSH a été abordée. Sachant qu'une partie du signal de cette modalité qui revient au détecteur provient de la rétrodiffusion par le milieu environnant, il est possible que l'épaisseur de l'échantillon imagé influe sur les images obtenues. Pour mettre en évidence cette rétrodiffusion, on compare sans modifier aucun paramètre du microscope les images obtenues avec le protocole habituel avec d'autres pour lesquelles on a placé un miroir sur la lame de l'échantillon. La figure 5.7 montre les deux images obtenues à partir d'une coupe histologique de 5 μm d'épaisseur. On remarque que le signal est beaucoup plus fort lorsque le miroir est en place. Si on souhaite simuler le comportement du microscope dans des conditions proches de l'imagerie *in vivo*, on note que cette épaisseur de coupe n'est pas suffisante.

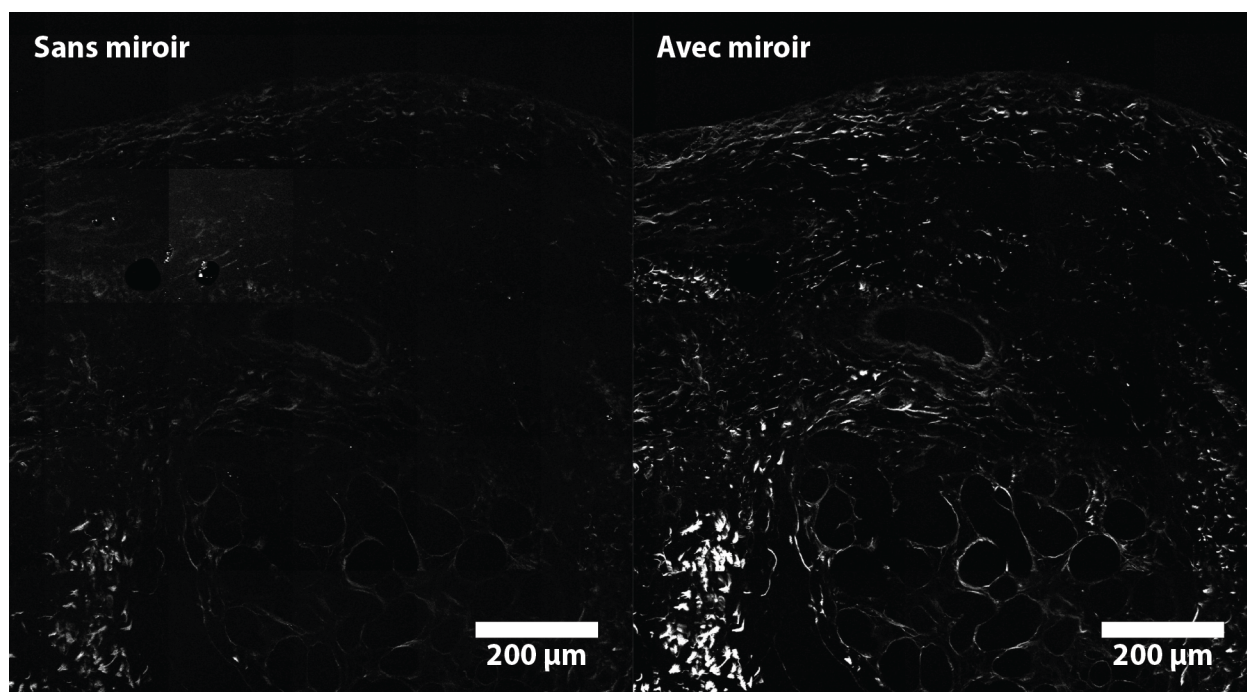


FIGURE 5.7 Comparaison des images de GSH obtenues avec et sans miroir placé sur la lame de l'échantillon pour une épaisseur de coupe histologique de 5 μm .

La figure 5.8 présente les images obtenues pour la même comparaison avec des coupes de 20 μm d'épaisseur. La différence est beaucoup moins nette qu'avec l'échantillon précédent. On note même la tendance inverse ; l'image avec miroir est légèrement moins lumineuse que celle sans. Ce comportement s'explique du fait qu'aucun paramètre du microscope n'a été modifié entre les deux acquisitions, pas même la profondeur d'acquisition. La pression exercée

sur l'échantillon par le miroir a pu modifier sa hauteur relative à l'objectif de microscope et faire sortir le volume focal de la zone meilleure zone d'observation. On peut donc dire que l'épaisseur de 20 μm se rapproche fortement des caractéristiques que l'on peut obtenir avec un échantillon épais du point de vue de la rétrodiffusion du signal de seconde harmonique.

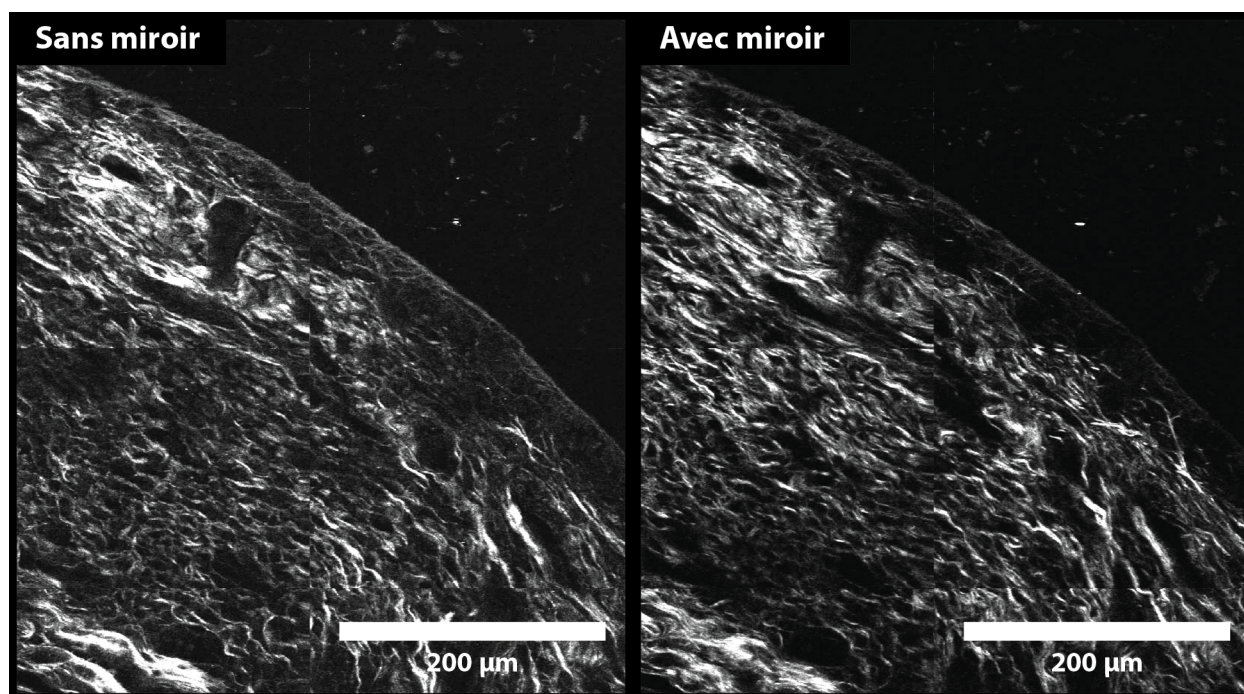


FIGURE 5.8 Comparaison des images obtenues avec et sans miroir placé sur la lame de l'échantillon pour une épaisseur de coupe histologique de 20 μm .

5.1.5 Imagerie non-linéaire de lames colorées pour l'histologie

Dans cette étude, on souhaite comparer des images de lames colorées pour l'histologie et des images non-linéaires. Il est nécessaire d'observer la même région d'un échantillon avec les deux techniques, mais le protocole de préparation des tissus diffère de l'une à l'autre. Une coloration est nécessaire pour l'image histologique, mais il est préférable d'observer des coupes non teintées en microscopie non-linéaire pour s'approcher le plus possible des conditions *in vivo*. Pour cette raison, les cliniciens qui préparent les échantillons étudiés dans ce projet ont préparé pour chaque spécimen trois coupes histologiques sérielles. L'une est teintée en H&E, l'autre au trichrome et la dernière est laissée non teintée. Pour les coupes d'une épaisseur de 5 μm , les structures sur les différentes coupes sont très proches, mais ce n'est plus vrai pour des coupes de 20 μm . Trois options s'offrent à nous. On peut chercher à obtenir des

coupes sérielles d'épaisseur variable chez chaque spécimen ($5\text{ }\mu\text{m}$ pour les coupes colorées et $20\text{ }\mu\text{m}$ pour la coupe non teintée) ; de cette manière, on conserve une très grande similarité des structures tout en utilisant une épaisseur suffisante pour la microscopie non-linéaire. Alternativement, on peut se contenter de comparer des images présentant des structures différentes ou faire des images non-linéaire d'échantillons colorés.

Pour choisir quelle option on souhaite utiliser, on teste des images de coupes histologiques avec des colorations différentes du même échantillon. On laisse de côté rapidement l'imagerie de lames colorées au trichrome car on constate que les échantillons brûlent avec la puissance habituelle du laser. On attribue ce comportement à l'absorption trop grande des colorants du trichrome. Pour les lames colorées au H&E en revanche, on remarque que les signaux sont très similaires. La figure 5.9 présente une comparaison entre les images non colorées et colorées au H&E. Le gain des détecteurs a été modifié entre les acquisitions, mais on note une très grande similitude dans les images obtenues en F2P et en GSH. En microscopie confocale, le signal est très fort même en dehors de la corde vocale pour l'échantillon non coloré alors qu'il est nul pour l'échantillon H&E. On n'attribue pas cette différence à la coloration elle-même, mais au mode de préparation des échantillons qui varie. La coupe colorée est déposée sur la lame et recouverte d'une lamelle de microscope, alors que la coupe non teintée est laissée sans lamelle. Il est possible que la lamelle aide à aplatir la tranche de paraffine qui contient l'échantillon. L'aplanétisme plus fort pour l'échantillon non coloré pourrait générer le signal observé et expliquer l'image que l'on obtient.

Pour mettre en évidence la corrélation entre les images prises avec différentes techniques, il est très important de maximiser la proximité des structures imagées. Dans la mesure où il est très difficile pour les cliniciens d'obtenir des coupes d'épaisseur différentes pour un échantillon donné, nous avons préféré prendre des images des lames de $20\text{ }\mu\text{m}$ colorés en H&E.

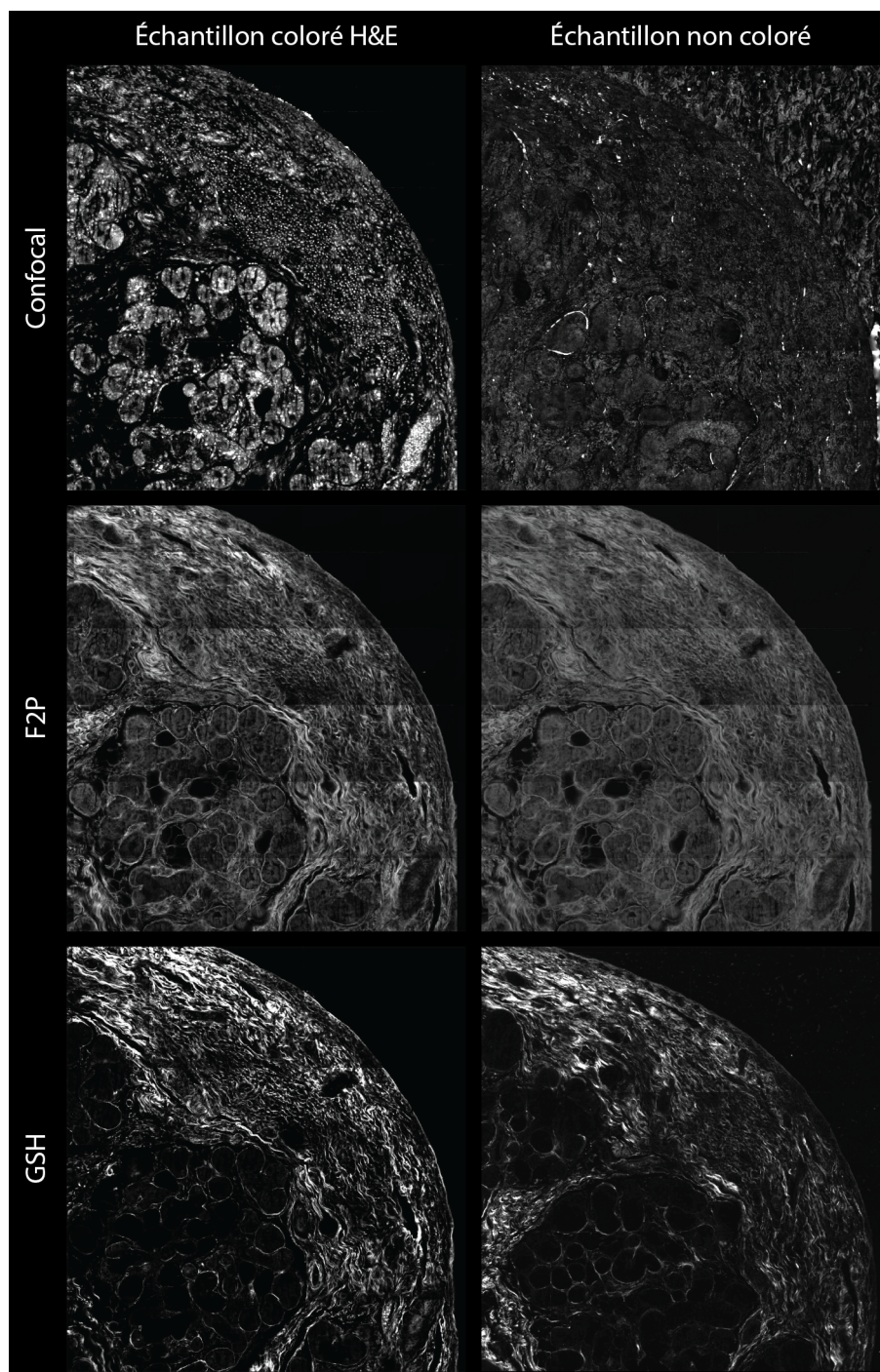


FIGURE 5.9 Comparaison des images non linéaires obtenues avec différentes colorations pour le même échantillon.

5.1.6 Convention pour l’affichage des images non-linéaires

La suite de ce chapitre présente des images non-linéaires colorisées par modalité. Ce choix a été fait pour accélérer la lecture des résultats. Il a été choisi de convertir les images en niveaux de gris de chaque modalité en une couleur additive primaire (rouge, vert et bleu) pour ensuite les regrouper en une image unique. Les différentes couleurs n’ont pas un impact égal sur la luminance totale d’une image, c’est pourquoi le choix de leur attribution aux modalités doit être justifié. Dans un premier temps, on souhaite mettre en avant les images de GSH et F2P par rapport au confocal, car elles présentent un mode de contraste pertinent pour observer les molécules fibrillaires des cordes vocales. D’autre part, on constate que la variance des images GSH est pour nos échantillons beaucoup plus importante que celle de la F2P. Cela implique que beaucoup de sections des images SHG sont noires, et qu’il n’est pas dommageable aux autres modalités qu’elle soit mise en avant.

Pour connaître la relation entre canaux de couleur et luminance, on se base sur un standard de l’union internationale des télécommunications² qui donne la décomposition suivante, avec L la luminance et (R, V, B) les intensités respectives du rouge vert, et bleu :

$$L = 0,299R + 0,587V + 0,114B$$

Sachant que le vert est mis en avant par rapport aux autres couleurs, on y attribue la GSH. Le rouge vient ensuite et représente donc la F2P dans nos images. Enfin, le signal confocal apparaît en bleu.

5.2 Analyse des images obtenues

Dans le cadre de cette étude, nous avons pu étudier trois populations distinctes de spécimens : des fœtus humains, des porcs et des humains adultes. Les structures qu’il est possible d’observer sur chaque population sont différentes, et c’est pourquoi nous les séparons dans le reste de cette section. Pour chaque spécimen étudié, les cliniciens qui ont préparé les échantillons ont donné des indications sur la position des ventricules et de la *lamina propria*. D’autre part, les échantillons ont été marqués avec des gouttes d’encre pour faciliter la co-localisation entre plusieurs modalités d’imagerie. Quand elles sont visibles, ces marques sont également indiquées.

2. Standard 1250/50/2 :1 de la recommandation 709-5 du secteur de radiocommunications de l’union internationale des télécommunications

5.2.1 Spécimens fœtus

Dans le cadre de ce projet, nous avons pu analyser les cordes vocales de deux fœtus identifiés spécimens 2 et 7. Les images obtenues dans les différentes modalités sont dans un premier temps exposées, ainsi qu’une courte analyse des structures visibles. On s’intéresse ensuite à tirer des conclusions sur la population au complet. Dans ce cas précis, il est bien évident que la pertinence de notre analyse est sévèrement limitée par le nombre trop faible d’échantillons.

Spécimen 2

La figure 5.10 présente en parallèle une image colorée au trichrome, une image H&E, et la composite des images non-linéaires. On remarque une très grande similarité dans la forme générale de l’échantillon. La goutte d’encre de colocalisation est superflue, dans la mesure où il est évident qu’on observe la même région avec toutes les modalités. On observe cependant sa trace sur l’image composite en microscopie confocale (tâches bleues). L’épithélium est facilement discerné aussi sur les trois images. Il apparaît moins lumineux que la *lamina propria* en trichrome et H&E. Dans l’image composite, on le discerne également car la GSH y est nulle. On discerne aussi les fibres musculaires, plus foncées à l’histologie quelle que soit la coloration et générant un fort signal de F2P. La lamina s’étend en profondeur entre l’épithélium et le muscle, il est donc possible de la localiser en microscopie non-linéaire dans cette direction. En revanche, son extension latérale (sens horizontal sur la figure 5.10) n’est pas nécessairement très importante, et il n’est pas évident qu’il soit aussi facile de la retrouver sur les images non-linéaires qu’en utilisant l’histologie.

La résolution offerte par les modalités du microscope non-linéaire permettent d’observer plus finement la *lamina propria* et ses alentours. La figure 5.11 présente un grossissement de cette zone. On peut voir les cellules de l’épithélium dont les noyaux sont très marqués en microscopie confocale (b) et apparaissent comme un vide de signal en F2P (a). On remarque que ces deux modalités ne présentent pas les noyaux aux mêmes endroits. On peut attribuer cette différence aux faits que pendant la même acquisition, les régions imagées dans les modalités non-linéaires ne sont pas parfaitement à la même profondeur qu’en confocal (voir section 5.1.1). On voit également sur la figure 5.11 les fibres musculaires (f), dont on peut déduire leur orientation en se basant sur leur forme dans l’image. Elles sont le plus souvent normales au plan d’imagerie sur cette figure. Enfin, on note qu’il est possible de voir la forme des groupements de fibres de collagène en GSH (c).

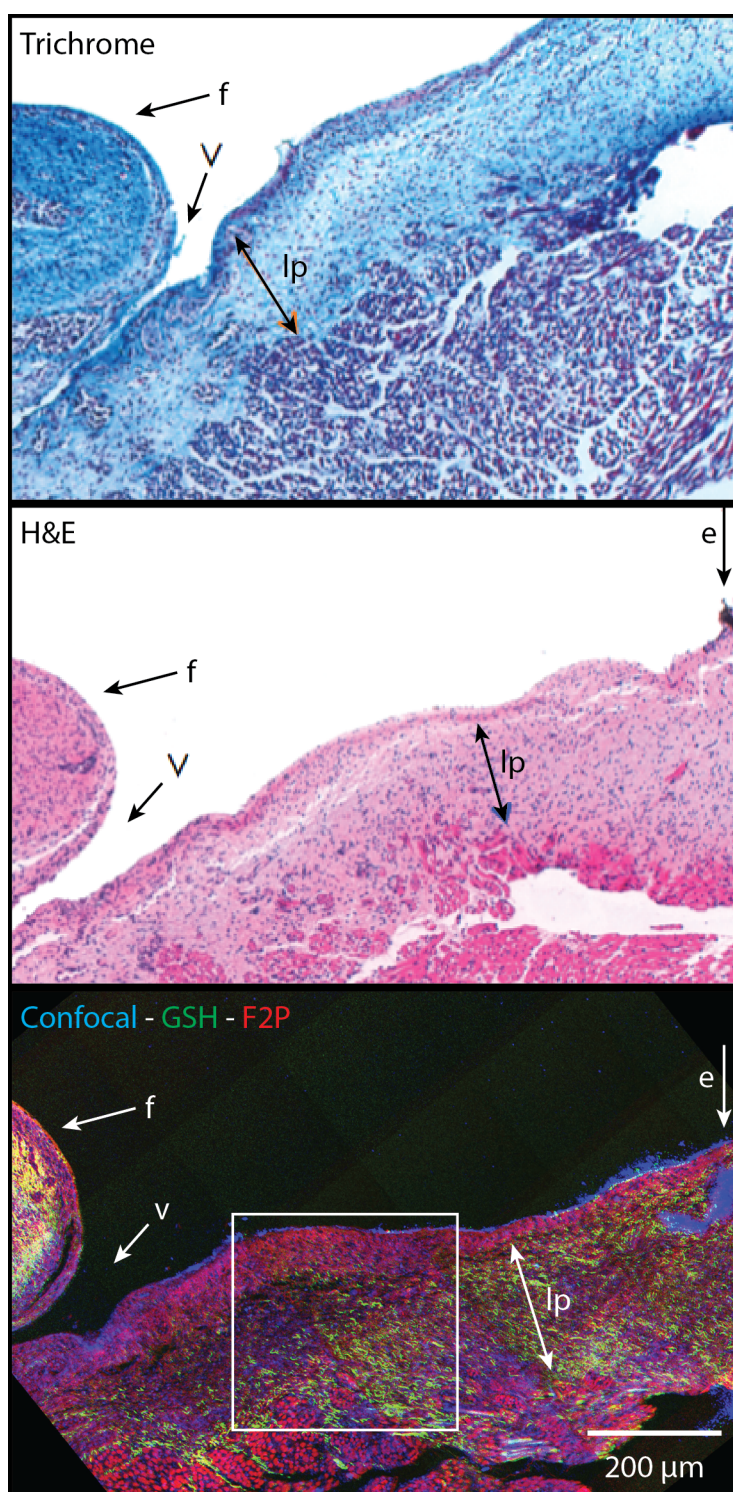


FIGURE 5.10 Spécimen 2 (fœtus). Les flèches indiquent le ventricule (v), les marques d'encre (e), la fausse corde vocale (f) et la *lamina propria* (lp). Le rectangle présente une zone grossie en figure 5.11.

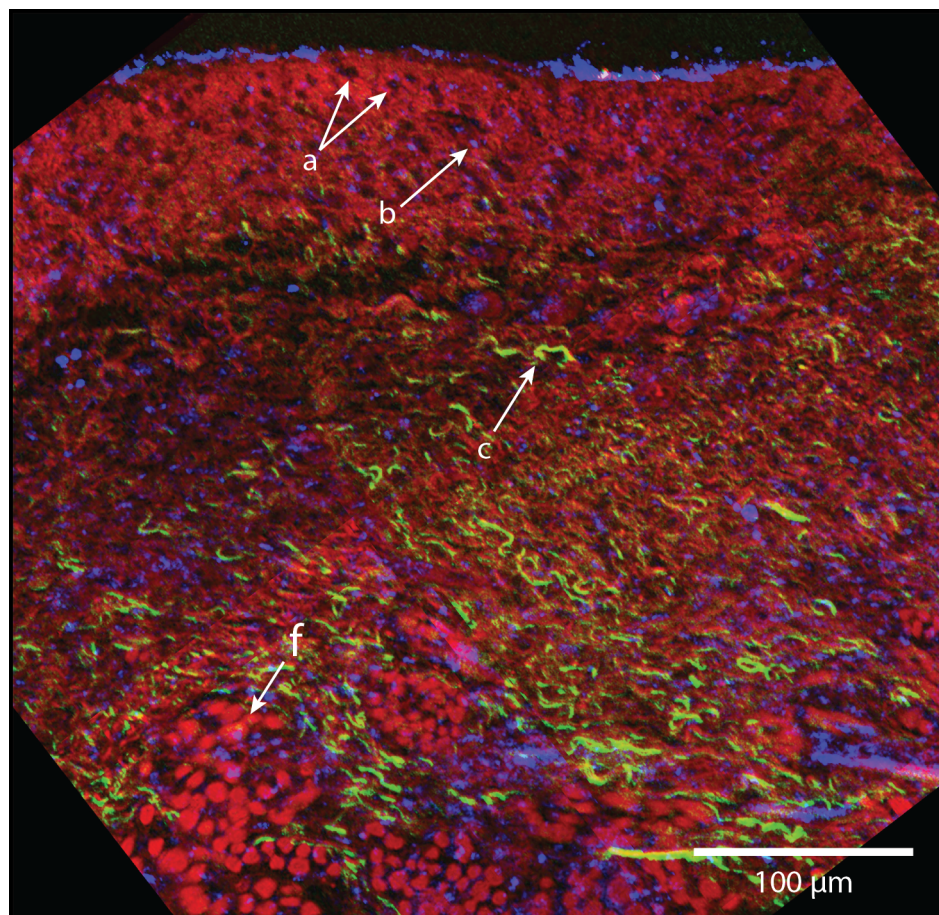


FIGURE 5.11 Spécimen 2 (fœtus). Les flèches indiquent des noyaux de cellules (a et b), du collagène (c) et des fibres musculaires (f).

Spécimen 7

On montre en figure 5.12 une image H&E en vis-à-vis avec la composite non-linéaire. De la même manière que sur le spécimen 2, on distingue très bien l'épithélium et les fibres musculaires. Sur l'histologie, on distingue une grande variation de la densité de noyaux cellulaires. La région notée (n) est très dense alors que la région notée (lp) l'est beaucoup moins. On retrouve bien cette variation sur l'image composite. La zone (n) apparaît plus bleutée. Le spécimen 7 est intéressant car on peut l'observer sur un champ de vue suffisant pour étudier les différences entre la *lamina propria* et les autres régions de la corde vocale à profondeur égale. On remarque que les régions périphériques sont beaucoup plus chargées en collagène, à l'exception de la zone (n) qui est remplie de cellules.

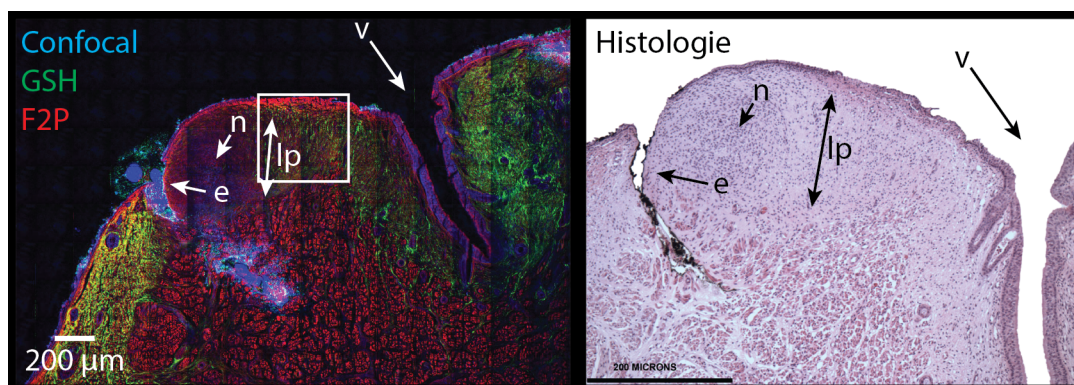


FIGURE 5.12 Spécimen 7 (fétus). Les flèches indiquent le ventricule (v), les marques d'encre (e), la *lamina propria* (lp) et une région très dense en noyaux cellulaires (n). Le rectangle présente une zone grossie en figure 5.13.

La figure 5.13 montre des noyaux cellulaires (a), des fibres musculaires (f) et du collagène (c) qui sont visibles de la même manière que sur le spécimen 2. On remarque aussi dans le coin inférieur droit le début de la zone à grande concentration en noyaux cellulaires.

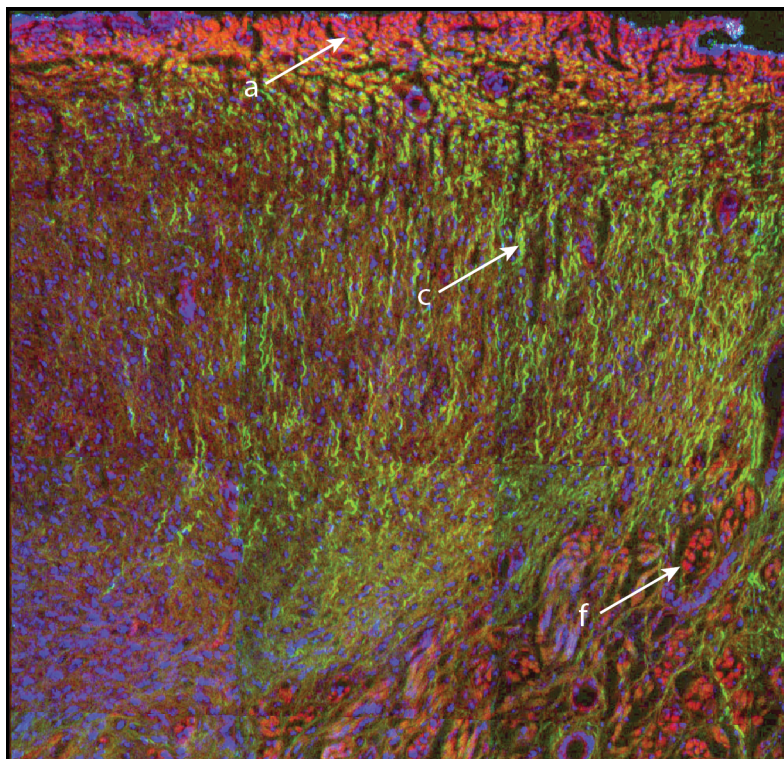


FIGURE 5.13 Spécimen 7 (fœtus). Les flèches indiquent des noyaux de cellules (a), du collagène (c) et des fibres musculaires (f).

Conclusions sur les spécimens fœtus

D'après les comparaisons faites ici, il semble qu'il soit possible de faire la différence entre la *lamina propria* et les régions adjacentes en regardant l'image composite issue du microscope non-linéaire. Ce résultat est important, mais la difficulté réelle pour l'observation des structures internes des cordes vocales consiste à différencier les sous-couches de la *lamina propria*. Ces dernières ne sont pas encore formées chez le fœtus. C'est pourquoi il est nécessaire d'observer d'autres populations de spécimens.

5.2.2 Spécimens porcins

Dans le cadre de cette étude, trois spécimens porcins identifiés 23, 28 et 88 ont été identifiés. On présente ici les images obtenues pour le spécimen 28. La littérature indique que deux sous-couches de la *lamina propria* sont visibles chez cette population.

Spécimen 28

La figure 5.14 présente une coupe histologique colorée en H&E et une image composite du spécimen porcin 28. On trouve sur l'histologie les indications données par des cliniciens de la position des deux couches de la *lamina propria*. Au lieu de reproduire ces marques sous formes de flèches sur l'image composite, il a été choisi de définir deux zones qui leur correspondent. Kurita *et al.* (1983) indique que la couche supérieure (lps) est relativement pauvre en élastine et en collagène, et que la couche inférieure (lpi) est encore plus pauvre en élastine mais fournie en collagène. Qualitativement, on observe bien une augmentation de la quantité de signal de GSH dans la zone (lpi) par rapport à la zone (lps) qui correspond à une augmentation de la quantité de collagène, mais il est difficile de se prononcer à propos du contenu en élastine.

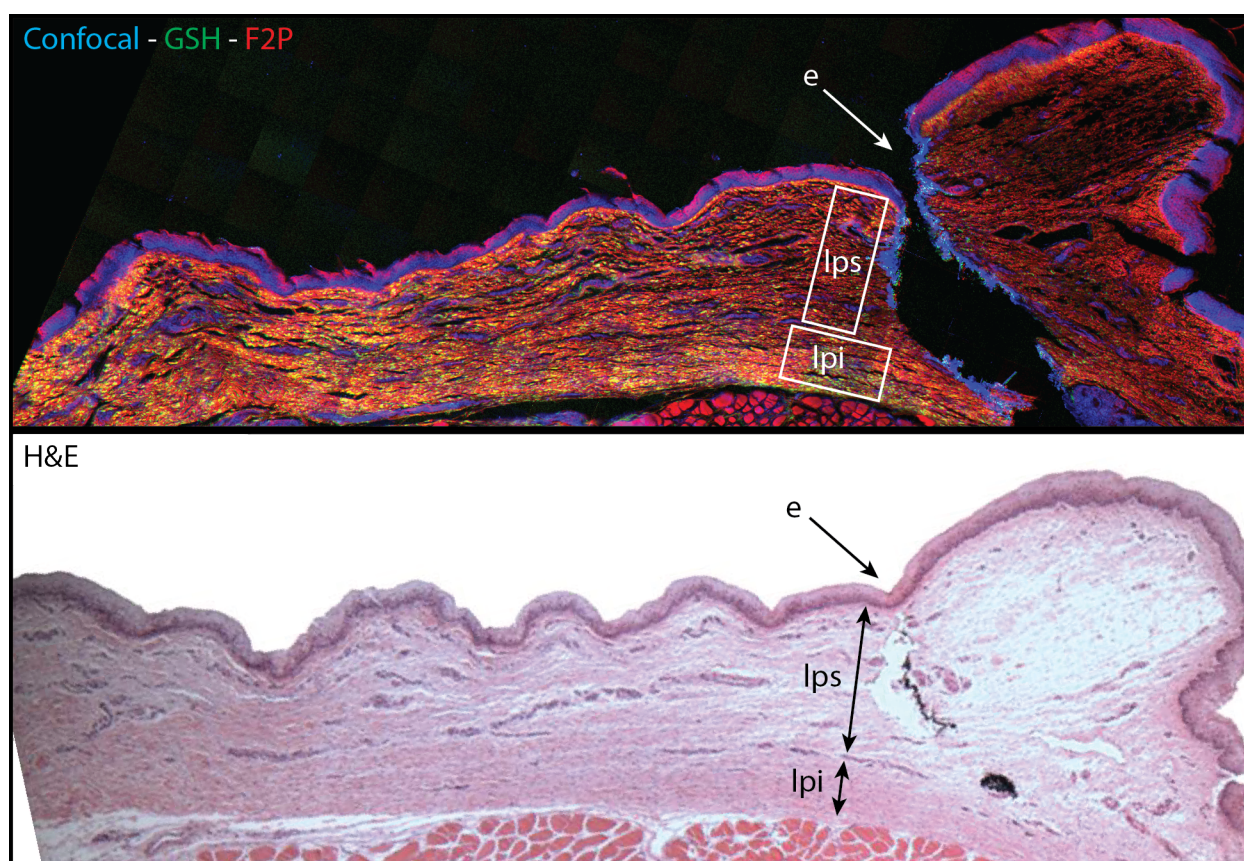


FIGURE 5.14 Spécimen 28 (porc). Les flèches indiquent l'encre (e), la *lamina propria* inférieure (lpi) et supérieure (lps).

Si on souhaite quantifier réellement les variations de densité de collagène et d'élastine, il faut revenir aux principes physiques des signaux de F2P et GSH. Si on suppose que la

puissance du laser d'illumination ne varie pas pendant une session d'imagerie, et que la forme des impulsions reste également stable dans le temps, alors le signal de fluorescence à deux photons obtenu au détecteur pour un pixel est directement proportionnel à la quantité de molécules qui fluorescent dans le volume focal de l'objectif, pondéré par la section efficace de leur transition de fluorescence à deux photons. Dans la mesure où l'élastine est la source dominante de ce type de fluorescence dans les cordes vocales pour une illumination à 800 nm, on peut supposer qu'il y a une relation de proportionnalité entre l'intensité au détecteur et le taux d'élastine dans le volume focal. Si on ajoute à nos hypothèses la linéarité du détecteur et de l'électronique de la carte d'acquisition, alors l'intensité des images est proportionnelle à la densité d'élastine.

Pour mesurer les variations du taux d'élastine, il est donc possible d'extraire du programme de traitement des images une mosaïque en niveaux de gris en F2P en prenant garde à conserver une correction gamma unitaire pour ne pas perdre la linéarité de la relation précédente. Il faut ensuite sélectionner dans cette image les régions indiquées en figure 5.14, et obtenir la valeur moyenne d'intensité de ces zones. On utilise pour cela la fonction d'histogramme du programme ImageJ car elle nous permet d'obtenir une information sur l'écart-type de la distribution d'intensité. Les résultats obtenus sont affichés en figure 5.15. On remarque que la valeur moyenne d'intensité est plus élevée pour la couche profonde que pour la couche médiane, même si la différence n'est pas statistiquement significative car les écarts-types sont élevés. Ce résultat va à l'encontre de la littérature en indiquant qu'il y a plus d'élastine dans la couche profonde que supérieure.

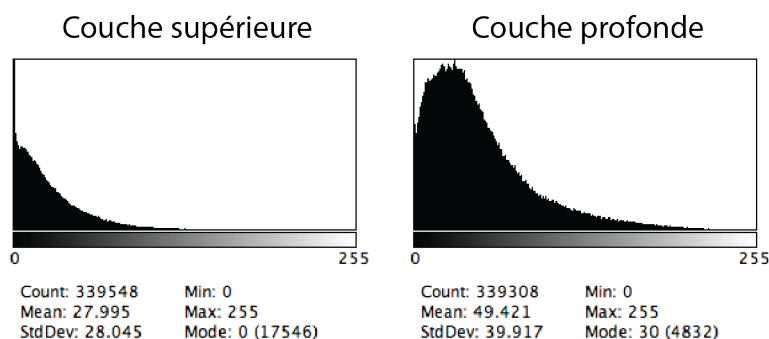


FIGURE 5.15 Histogrammes de la F2P des deux régions marquées (lpi) et (lps) en figure 5.14.

La question de la génération de seconde harmonique est plus difficile à étudier quantitativement car il s'agit d'un processus cohérent. Si la taille des fibres de collagène est constante ainsi que leur espacement au sein d'un groupe de fibres et que la taille du volume focal est négligeable devant la longueur de cohérence du signal de GSH, alors l'intensité du signal

de seconde harmonique pour un pixel doit évoluer comme la racine de la fraction du volume focal occupé par les fibres. Ces hypothèses sont extrêmement difficiles à vérifier, et il n'est donc pas souhaitable de tenter d'interpréter le signal mesuré en terme de quantité de collagène dans le volume focal. Une autre approche, utilisée par Strupler (2008), propose d'évaluer la surface de la corde vocale qui contient du collagène. Cette technique est possible si on suppose que les groupes de fibres sont désordonnés, ce qui semble raisonnable en observant une image de microscopie électronique d'une corde vocale extraite du larynx et donc sans tensions internes (Hirano (1977)). Pour l'appliquer, une image est extraite de la même manière que précédemment avec une correction gamma unitaire. Elle est rendue binaire avec un seuil choisi à partir du bruit de fond. On mesure pour cela l'histogramme d'une région de l'image sans échantillon pour connaître la valeur moyenne de l'intensité et celle de l'écart-type. On place le seuil trois écarts-types au dessus du bruit de fond de sorte à en exclure la majorité (99,8 %). Le ratio de l'image blanche dans les deux régions correspond maintenant directement à fraction de surface couverte par le collagène. Nos mesures donnent une couverture de 18,82 % dans la couche supérieure et 51,76 % dans la couche profonde. Ce résultat confirme avec un fort taux de confiance notre analyse qualitative. Il correspond également avec la littérature en indiquant que le collagène est plus présent dans la *lamina propria* profonde que supérieure.

Conclusions sur les spécimens porcins

L'analyse des spécimens porcins montre un bon degré de cohérence avec la littérature pour le taux de collagène en fonction des sous-couches de la *lamina propria*, mais la rejette pour le taux d'élastine sans que ce résultat soit statistiquement significatif. On note que l'analyse quantitative confirme ce qui est visible à l'oeil sur les images. D'autre part, on remarque que les deux sous-couches sont différenciables en observant uniquement l'image composite issue du microscope non-linéaire.

5.2.3 Spécimens humains adultes

Sept spécimens humains adultes différents ont été observés pendant cette étude (identifiés 46,48,49,65,67,70 et 75). Par souci de concision, on ne détaille pas ici les images issues de chacun des spécimens étudiés.

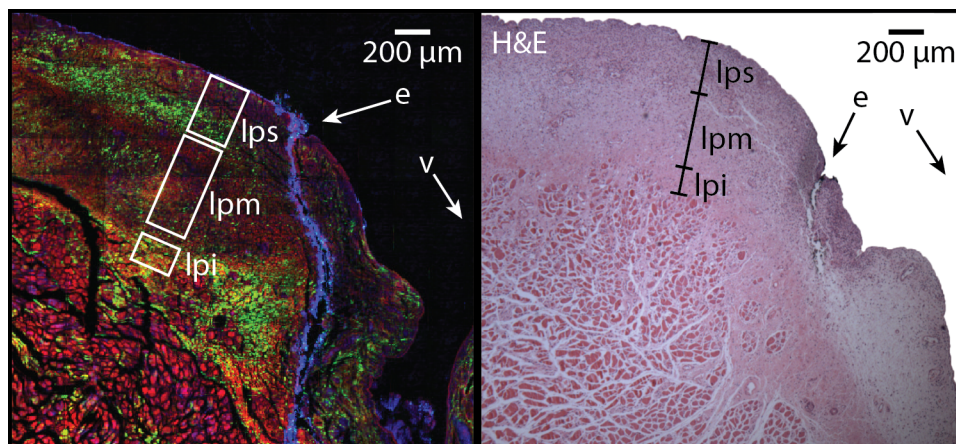


FIGURE 5.16 Spécimen 67 (humain). Les flèches indiquent l'encre (e), le ventricule (v), la *lamina propria* inférieure (lpi), médiane (lpm) et supérieure (lps).

Spécimen 67

On trouve en figure 5.16 la comparaison entre une image H&E du spécimen 67 et une image composite issue du microscope non-linéaire. L'encre (e) et le ventricule (v) sont présents sur les deux images. De même que pour les échantillons porcins, des zones relatives aux trois sous-couches de la *lamina propria* ont été tracées sur l'image composite à partir des indications des cliniciens. Suivant le modèle d'Hirano (1975), la couche supérieure contient peu d'élastine et peu de collagène, la couche médiane se démarque par sa forte concentration en élastine et la couche profonde par un taux de collagène élevé. La couche supérieure est également décrite comme hypocellulaire. Hors, en observant l'image H&E, on reconnaît dans la *lamina propria* supérieure une teinte bleutée donnée par des noyaux de cellules. D'autre part, on voit une bande à forte concentration de collagène sur l'image composite (qui apparaît très verte) au niveau de la moitié inférieure de la *lamina propria* supérieure (lps). Il est possible que ces phénomènes soient des effets secondaires du traitement que le patient a reçu juste avant que les cordes vocales soient extraites, comme par exemple une intubation.

Outre ces incompatibilités avec le modèle d'Hirano qui ne sont pas le fait de la microscopie non-linéaire, il est toujours possible de faire une analyse quantitative de la manière présentée pour l'étude du spécimen porcine 28. Les histogrammes de l'image F2P de correction gamma unitaire sont présentées en figure 5.17. On remarque que la couche supérieure présente une valeur moyenne légèrement supérieure à la couche médiane, ce qui correspond à la littérature tout en n'étant pas statistiquement significatif. En revanche, la couche profonde montre plus d'élastine que la couche médiane, toujours sans écart statistiquement significatif.

Pour la GSH, l'image de correction gamma unitaire présente un bruit de fond de valeur

moyenne 2,01 et d'écart-type 5,12. Avec ces valeurs, le seuil entier à trois écarts-types est de 18. Ce seuil induit une fraction occupée par le collagène de 10 % dans la couche supérieure, 8,9 % dans la couche médiane et 32,9 % dans la couche profonde. Ces résultats correspondent bien avec la littérature et avec nos observations qualitatives. s

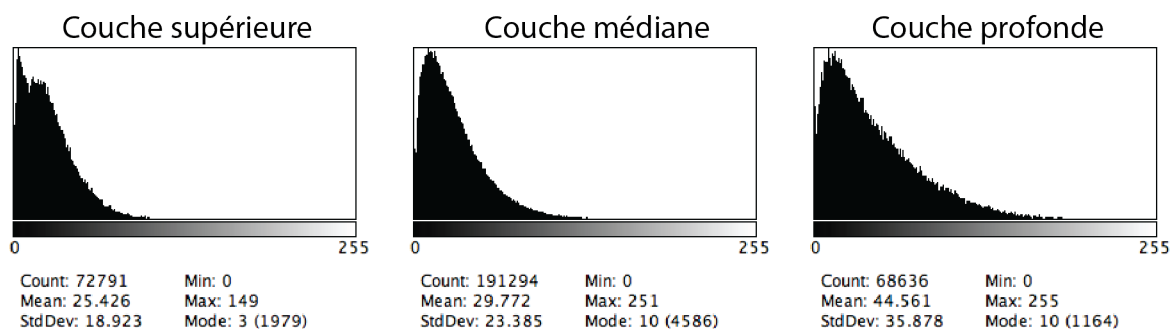


FIGURE 5.17 Histogrammes de la F2P des régions marquées (lpi), (lpm) et (lps) en figure 5.16.

Spécimen 70

Le spécimen 70 (figure 5.18) présente un intérêt particulier car l'histologie en H&E montre que la *lamina propria* ne contient que très peu de cellules, comme c'est le cas chez les humains adultes sains. En revanche, on remarque que la sous-couche supérieure est fragmentée sur l'histologie ; des bandes blanches qui ne sont pas présentes sur un patient sain la traversent (repère b sur la figure 5.18). Enfin, on remarque également des acini³ (repère a sur la figure 5.18) qui trahissent la présence de glandes sécrétrices. Ces dernières ne sont normalement pas présentes dans la vraie corde vocale.

Sans faire de mesure quantitative, on remarque qu'il y a plus de collagène dans la couche profonde que dans la couche médiane. D'autre part, il y a plus d'élastine dans la couche médiane que dans la couche profonde. La composition de la couche supérieure défie le modèle d'Hirano car on y trouve beaucoup de collagène. Cependant, vu que son état ne semble pas parfait, il est plus prudent d'incriminer l'échantillon plutôt que les résultats d'Hirano (1975) pour cette variation.

3. Variété d'unité sécrétrice exocrine de forme sphérique appendue à un canal excréteur d'une glande.

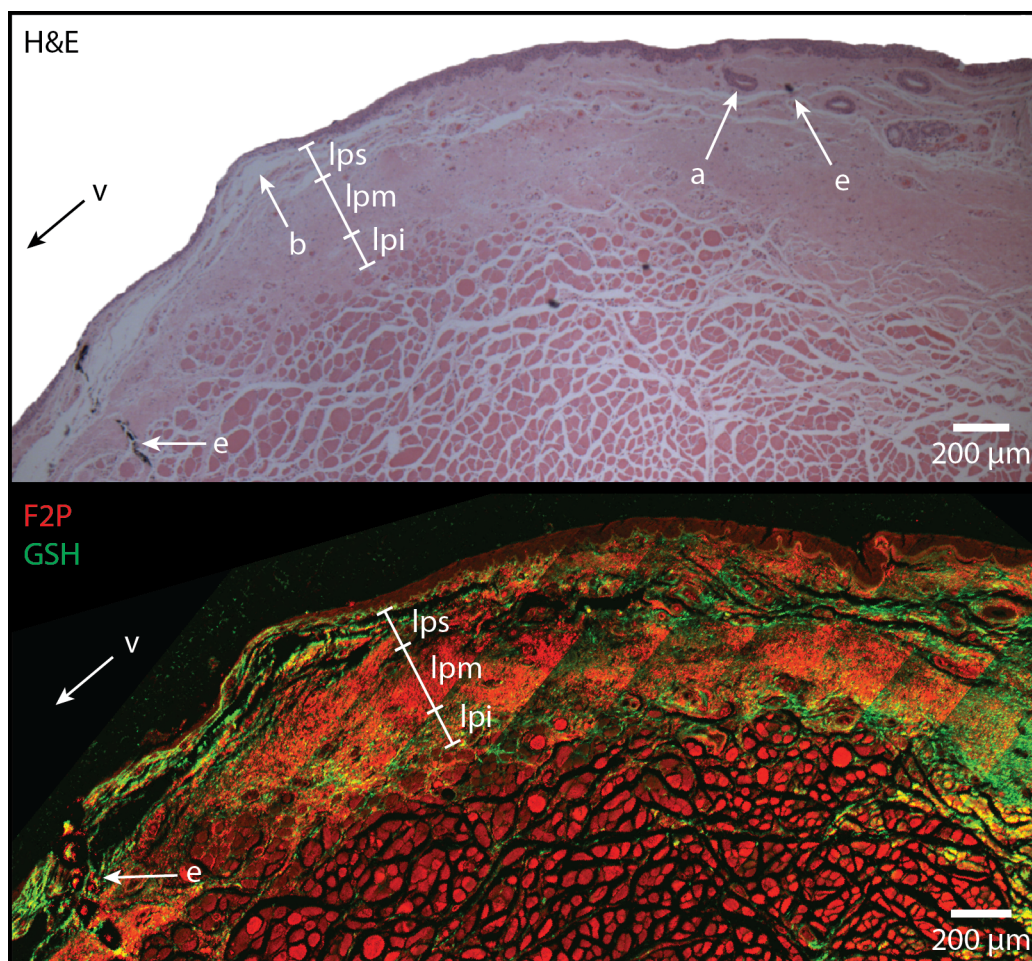


FIGURE 5.18 Spécimen 70 (humain). Les flèches indiquent l'encre (e), le ventricule (v), des parties de l'échantillon fragmentées (b), des acini (a), la *lamina propria* inférieur (lpi), médiane (lpm) et supérieure (lps).

Conclusion sur les spécimens humains adultes

Bien que seuls deux échantillons aient été présentés dans cette section, les conclusions qui suivent sont valables pour tous les autres spécimens. Dans un premier temps, on note qu'il est très facile de retrouver la structure macroscopique d'un échantillon observé à l'histologie sur les images non-linéaires. C'est ce qui permet en particulier de reproduire avec confiance les indications données par les cliniciens sur les images composites. D'autre part, les sous-couches indiquées par les cliniciens sont toujours différenciables sur l'image composite. En revanche, les variations de concentrations de collagène et d'élastine ne correspondent pas toujours aux indications données par la littérature.

5.3 Imagerie d'échantillons épais

Dans la partie précédente, nous avons montré que la microscopie non-linéaire est capable de faire des images de coupes histologiques non colorés comparables à celles obtenues par microscopie grand champ d'échantillons colorés. Sachant que le contraste étant obtenu uniquement avec les molécules naturellement présentes dans les cordes vocales et que la microscopie non-linéaire peut faire des images en profondeur dans les tissus, elle se présente comme un candidat intéressant pour faire des observations *in vivo* des cordes vocales. Cependant, il y a beaucoup de chemin à parcourir pour aller de coupes histologiques non colorées à l'imagerie *in vivo*. L'objet de cette section n'est pas de présenter une liste exhaustive des défis à relever pour y parvenir, mais plutôt de présenter les conditions dans lesquelles il est possible de faire des images de cordes vocales entières.

La première différence entre l'imagerie d'une coupe histologique et celle d'une corde vocale entière est liée au axes de l'image. Un des axes d'une coupe histologique correspond à la direction de la profondeur tandis que l'autre est latéral. Au contraire, les images obtenues sur des échantillons entiers sont dites "en face", c'est que tous les points sont pris à une profondeur approximativement égale dans l'échantillon. Il est donc nécessaire de faire une pile virtuelle avec les images obtenues à différentes profondeurs pour observer les différentes sous-couches de la *lamina propria*. D'autre part, bien qu'il soit possible de descendre en profondeur dans l'échantillon pour faire des images, la profondeur de pénétration de la microscopie non-linéaire est de l'ordre d'une centaine de microns. Il n'est donc pas possible d'avoir accès à la *lamina propria* en dehors de la sous-couche supérieure. Enfin, si on souhaite comparer les images obtenues en microscopie non-linéaire avec d'autres modalités d'imagerie, il est nécessaire comme pour les coupes histologiques de mettre en place des marqueurs pour la colocalisation. Pour tester la faisabilité du marquage de colocalisation, nous avons obtenu dans un abattoir⁴ un larynx de porc (figure 5.19) que nous avons préparé pour l'imagerie. Une lame de scalpel a été utilisée pour relocaliser les images non-linéaires obtenues par rapport à la partie B de la figure 5.19.

La figure 5.20.A présente un assemblage tridimensionnel à très grand champ de l'échantillon étudié. On note qu'il a été possible de retrouver la lame de scalpel. Cela n'a pas été facile cependant à cause du sectionnement optique du microscope. Il a été nécessaire de prendre des images à beaucoup de profondeurs différentes dans le tissu pour retrouver la pointe du scalpel. Les deux zones entourées en rouges représentent les endroits où des piles en profondeur en GSH (figure 5.20.B) et F2P (figure 5.20.C) ont été acquises.

4. Abattoir L G Hebert & fils, 428 rue Hebert, Ste-Helene-de-Bagot, QC

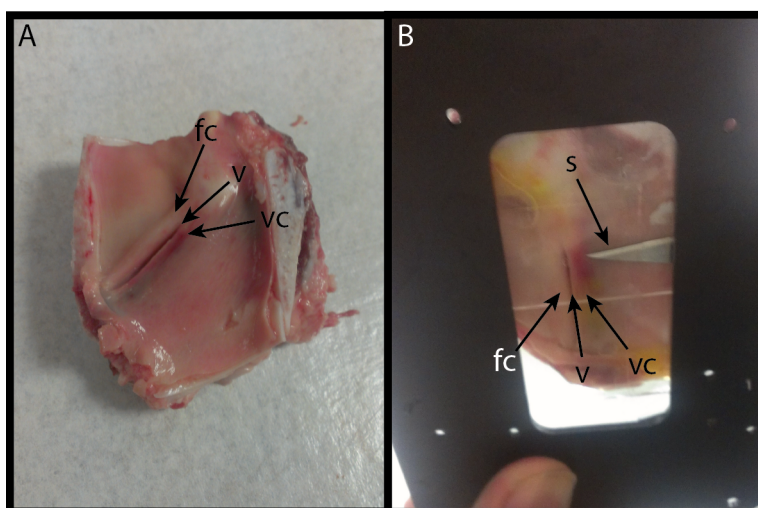


FIGURE 5.19 Corde vocale entière de porc utilisée pour l'imagerie. A : Cordes vocales extraites du larynx. Sont indiqués la fausse corde (fc), le ventricule (v) et la vraie corde (vc). B : Corde vocale en position sur la lamelle de microscope. Une lame de scalpel (s) sert pour la localisation

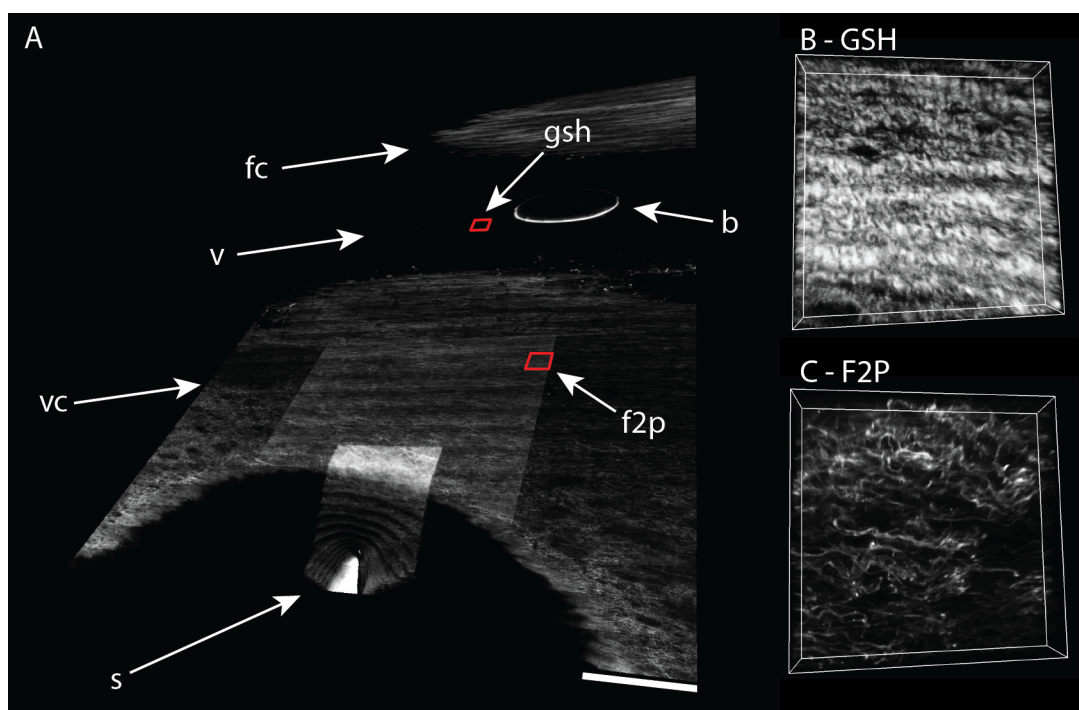


FIGURE 5.20 A : Image en microscopie confocale de la corde vocale de porc vue en figure 5.19. On retrouve le ventricule (v), la fausse et la vraie corde vocale (fc et vc respectivement), une bulle d'air (b) et la pointe de la lame de scalpel (s). Barre d'échelle : 500 μm . Les flèches (gsh) et (f2p) indiquent les points d'acquisition des piles B et C en GSH et F2P respectivement.

Chapitre 6

CONCLUSION

I have always wished for my computer to be as easy to use as my telephone ; my wish has come true because I can no longer figure out how to use my telephone.

Bjarne Stroustrup

À la lumière des connaissances théoriques et des résultats exposés dans les chapitres précédents, nous tirons ici des éléments de réponse pour évaluer la capacité de la microscopie non-linéaire à imager les cordes vocales. Dans un premier temps, tous les travaux effectués et les résultats qui ont été obtenus sont résumés. On décrit ensuite les limitations de la solution proposée avant de tracer un plan de marche pour la poursuite du projet.

6.1 Synthèse des travaux

Dans ce projet, un microscope non-linéaire a été conçu pour faire des images à grand champ de vue de cordes vocales. L'illumination et la détection se font du même côté de l'échantillon (épi-illumination) pour répondre aux besoins de l'imagerie de tissus épais. De cette manière, le microscope a permis de s'approcher des conditions d'imagerie *in vivo*. L'histologie a été choisie comme technique de référence pour comparer les résultats obtenus, car c'est celle que les chercheurs utilisent actuellement pour caractériser la structure des cordes vocales. Le microscope a donc été également conçu pour faire des images de coupes histologiques. Pour être capable de retrouver les mêmes structures sur les différentes modalités, il est nécessaire que le champ de vue des images non-linéaires soit du même ordre que celui de l'histologie. Une fonction qui permet d'acquérir et de reconstruire automatiquement des mosaïques d'images a donc été implémentée dans le microscope.

Les échantillons histologiques diffèrent des tissus épais sur plusieurs points comme la coloration (H&E, trichrome, ...) et l'épaisseur. Pour évaluer l'impact de la coloration, des coupes sérielles de cordes vocales avec et sans teinture ont été obtenues auprès de l'équipe du Pr. Hartnick au *Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Harvard Medical School*. Par l'expérience, on a remarqué que les coupes colorées à l'hématoxyline et à l'éosine donnent des images très proches de celles sans coloration. D'autre part, des échantillons d'épaisseurs

variables ont été observés pour évaluer l'influence de la taille de la coupe sur les images non-linéaires obtenues. On a constaté que 20 μm est une épaisseur suffisante pour s'approcher du comportement d'un échantillon épais.

Il a été vérifié que les images non-linéaires de coupes histologiques s'approchent des résultats obtensibles sur des échantillons épais non-traités pour l'histopathologie. Il a donc été possible d'étendre les informations obtenues des coupes histologiques à tous les types d'échantillons. La suite de cette étude a consisté à vérifier si les images non-linéaires contiennent autant d'informations pertinentes du point de vue médical que leurs équivalents histologiques. Sachant que l'histopathologie est une discipline médicale à part entière, il a été convenu de faire appel à des spécialistes pour analyser les échantillons de cordes vocales étudiées et extraire l'information d'intérêt. Notre étude s'est concentrée sur la distinction des sous-couches de la *lamina propria*, car ces structures jouent un rôle important dans la phonation et sont très difficiles à identifier. Pour tous les échantillons étudiés, les différentes zones marquées par l'équipe du Pr. Hartnick ont présenté des différences statistiquement significatives dans les modalités non-linéaires, traduites en quantités de collagène et d'élastine.

Pour chaque population étudiée, on a ensuite vérifié si les différences observées correspondent aux variations de concentrations de protéines fibreuses que décrit la littérature. Les résultats statistiquement significatifs ont fait état d'une bonne correspondance avec les recherches menées par Hirano. Cependant, on a remarqué également beaucoup de cas qui contredisent la littérature, bien que généralement avec un seuil de signification faible.

Ayant vérifié que les informations contenues dans les images non-linéaires sont pertinentes, on s'est tourné vers la possibilité de l'imagerie *in vivo*. Les défis à relever pour y parvenir sont nombreux et hors du cadre de ce projet de recherche. Une manipulation a été menée avec un échantillon porcin pour étudier la possibilité d'identifier la fausse et la vraie corde vocale avec les modalités non-linéaires. On a montré que la fonction d'imagerie à grand champ du microscope permet de créer une mosaïque contenant les deux cordes vocales. Il a été possible de se localiser sans faire appel à des modalités extérieures, et donc d'observer spécifiquement ces régions d'intérêt.

6.2 Limitations de la solution proposée

Avant de pouvoir utiliser la microscopie non-linéaire pour l'imagerie des cordes vocales *in vivo*, il reste à surpasser certaines limitations inhérentes à ce type d'imagerie. La première est la profondeur de pénétration. Bien que des valeurs de l'ordre du millimètre aient été obtenues dans le cerveau, la limite de pénétration dans les cordes vocales est plutôt de quelques centaines de microns, du fait de la présence de chromophores tels que l'hémoglobine.

L'observation non-invasive de ce tissu est donc limitée à l'épithélium et à la sous-couche superficielle de la *lamina propria*.

D'autre part, l'imagerie endoscopique *in vivo* requiert un taux de rafraichissement des images élevé pour s'affranchir des déplacements naturels entre la sonde et l'échantillon, comme ceux causés par la respiration. Des efforts importants doivent être apportés sur la vitesse d'acquisition du système actuel, limitée à quatre images par seconde, pour répondre à ce besoin.

L'imagerie endoscopique présente d'autres difficultés du point de vue du système optique. Il est nécessaire de créer une sonde de petit diamètre à travers laquelle les impulsions du laser puissent se propager sans être trop modifiées. Il est également nécessaire de trouver un moyen de focaliser avec une grande ouverture numérique le laser au bout de la sonde pour que la conversion non-linéaire se fasse avec une bonne efficacité.

Enfin, avant de pouvoir utiliser cette technique de microscopie sur des patients, des études supplémentaires sur les dangers liés à l'utilisation de lasers ultrarapides doivent être menées. Certains appareils médicaux utilisant des lasers femtosecondes ont déjà été autorisés par la *Food and Drug Administration*¹, mais il reste encore à définir dans quelles conditions l'imagerie de tissus épithéliaux est possible sans risque.

Du point de vue de la comparaison entre l'histologie et la microscopie non-linéaire, le caractère cohérent du processus de génération de seconde harmonique est un problème. Les variations d'intensité visibles sur les images ne reflètent pas directement les changements de concentration des fibres de collagène dans les tissus. Il s'agit plutôt d'une interaction complexe entre la proximité des fibres, leur taille et leur orientation. Il n'est donc pas possible pour le moment de faire d'observation quantitative de la densité de collagène dans les tissus à partir des images de génération de seconde harmonique.

6.3 Améliorations futures

Au cours de ce projet de recherche, différentes directions possibles pour la microscopie non-linéaire des cordes vocales sont apparues. L'imagerie *in vivo* bien sûr, mais il semble également que les recherches fondamentales menées sur les cordes vocales puissent profiter des avantages offerts par les modalités non-linéaires en complément des techniques histologiques. Cette section présente quelques-unes des améliorations possibles pour chacune de ces applications.

1. Par exemple, le laser *Microkeratome* de la société *Surgical Instrument Engineering* (<http://www.accessdata.fda.gov>).

6.3.1 Partie logicielle

On présente ici tout d’abord des remarques générales quant à la conception des logiciels conçus pour ce projet de recherche, avant d’aller dans le détail de leurs fonctionnalités.

Dans un premier temps, on remarque que le logiciel du microscope contrôle la puissance du laser envoyé dans l’échantillon. Bien que cela ne soit généralement pas le cas, les logiciels contrôlant du matériel dangereux ne devraient pas fonctionner sur des systèmes d’exploitation classiques, mais sur des environnements dits “temps réel” qui peuvent garantir des temps de traitement finis pour les requêtes internes aux programmes. Implémenter le logiciel de contrôle du microscope sur une telle plateforme est une amélioration intéressante.

D’autre part, il serait possible d’implémenter des “tests unitaires” dans chacun des logiciels utilisés pour aider à la détection d’erreurs dans la programmation. Cette pratique consiste à ajouter au code du logiciel des fonctions qui testent son bon fonctionnement et permettent de minimiser le risque de bogues.

Logiciel de traitement des images

Sur les mosaïques de grande taille que l’on trouve dans ce mémoire, un effet de quadrillage est visible. Il est dû à une perte de puissance du faisceau laser aux angles élevés dans le système optique (phénomène de *vigneting*), et peut être compensé si il est assez faible en utilisant l’information redondante dans les zones de superposition des images.

D’autre part, l’algorithme de visualisation des volumes 3D doit être amélioré pour permettre des visualisations de meilleure qualité. Dans la version actuelle du logiciel, chaque image prise par le microscope est affichée comme une texture sur un plan dans l’espace tridimensionnel. Cette approche n’est pas bonne quand on souhaite observer des volumes d’imagerie sous différents angles. Pour intégrer la dimension de la profondeur du volume focal d’imagerie, il faut utiliser la technique de “lancer de rayons”. Les pixels des images sont alors considérés comme des “voxels”, ou éléments de volume.

Enfin, le logiciel de visualisation souffre de ralentissements importants lorsque des grandes mosaïques d’image sont chargées (surfaces de l’ordre du gigapixel). Cela est dû au fait que la quantité d’information à afficher dépasse la taille de la mémoire graphique disponible sur l’ordinateur. Il est possible de résoudre ce problème sans augmenter la limite de mémoire de la carte, mais plutôt en ne chargeant qu’un sous-ensemble des données disponibles. L’algorithme du choix du sous-ensemble n’est pas simple à implémenter, mais on peut trouver des exemples proches facilement (Google Maps ou Microsoft DeepZoom).

Logiciel de contrôle du microscope

Dans sa version actuelle, le logiciel de contrôle du microscope ne présente pas à l'utilisateur les mosaïques reconstruites, mais seulement la dernière image pour chaque modalité. L'affichage des mosaïques est une amélioration possible.

D'autre part, si on souhaite que le logiciel puisse être déployé facilement sur différents systèmes d'imagerie, un effort de modularité supplémentaire doit être fait dans sa programmation. Une version parfaitement modulaire pourrait être proposée comme projet à code source libre. Une plateforme logicielle similaire existe déjà. Il s'agit du programme HelioScan², basé sur LabView.

6.3.2 Partie matérielle

Pour répondre aux besoins de l'imagerie *in vivo*, nous avons discuté à la section précédente la nécessité d'augmenter la vitesse d'acquisition du microscope non-linéaire. Les miroirs galvanométriques sont les points limitants dans le montage de ce point de vue. Remplacer un de ces miroirs par un polygone rotatif est une solution possible.

Nous avons également vu que le caractère cohérent de la génération de seconde harmonique est un frein pour quantifier la densité de collagène dans les tissus. Une méthode pour modifier la polarisation du laser pourrait offrir une solution pour obtenir de l'information quant à l'orientation des fibres de collagène en plus de leur quantité.

Pour faciliter l'acquisition des mosaïques à grand champ, il serait intéressant d'ajouter une caméra à grand champ au montage actuel. En observant l'image de l'échantillon obtenue par cette caméra, l'utilisateur pourrait choisir facilement la zone qu'il souhaite observer avec les modalités non-linéaires.

Enfin, si on souhaite se diriger vers l'endoscopie, le système optique doit bien sûr être modifié pour faire des images à travers une sonde de petit diamètre. Le montage doit aussi répondre aux besoins de l'imagerie clinique : être transportable et satisfaire aux conditions de sécurité liées aux appareils médicaux.

2. <https://wiki-bsse.ethz.ch/display/HSC/HelioScan+Home>

RÉFÉRENCES

- AMOS, W. et WHITE, J. (2003). How the Confocal Laser Scanning Microscope entered Biological Research. *Biology of the Cell*, 95, 335–342.
- BOUDOUX, C., LEUIN, S. et OH, W. (2009a). Optical microscopy of the pediatric vocal fold. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 135, 53–64.
- BOUDOUX, C., LEUIN, S., OH, W., SUTER, M., A.E. DESJARDINS, VAKOC, B., BOUMA, B., HARTNICK, C. et TEARNEY, G. (2009b). Preliminary Evaluation of Noninvasive Microscopic Imaging Techniques for the Study of Vocal Fold Development. *Journal of Voice*, 23, 269–276.
- CHANG, C., SUD, D. et MYCEK, M. (2007). Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *Methods in cell biology*.
- DEDECJUS, M., ADAMCZEWSKI, Z., BRZEZIŃSKI, J. et LEWIŃSKI, A. (2010). Real-time, high-resolution ultrasonography of the vocal folds—a prospective pilot study in patients before and after thyroidectomy. *Langenbeck’s archives of surgery / Deutsche Gesellschaft für Chirurgie*, 395, 859–64.
- DENK, W., STRICKLER, J. et WEBB, W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*.
- DESPRAT, N., SUPATTO, W., POUILLE, P.-A., BEAUREPAIRE, E. et FARGE, E. (2008). Tissue deformation modulates twist expression to determine anterior midgut differentiation in *Drosophila* embryos. *Developmental cell*, 15, 470–7.
- DRIVE, G., BUILDING, B. S. et JOLLA, L. (2006). Automated microscopy system for mosaic acquisition. 222, 76–84.
- FERREIN, A. (1741). *De la formation de la voix de l’homme*.
- FRANKEN, P., HILL, A., PETERS, C. et WEINREICH, G. (1961). Generation of optical harmonics. *Physical Review Letters*, 7, 118–120.
- GEORGIOU, E. et THEODOSSIOU, T. (2000). Second and third optical harmonic generation in type I collagen, by nanosecond laser irradiation, over a broad spectral region. *Optics Communications*, 253–260.
- GOULD, T. J., VERKHUSHA, V. V. et HESS, S. T. (2009). Imaging biological structures with fluorescence photoactivation localization microscopy. *Nat. Protocols*.
- HARTNICK, C. J., REHBAR, R. et PRASAD, V. (2005). Development and maturation of the pediatric human vocal fold lamina propria. *The Laryngoscope*, 115, 4–15.

- HAWKE, M. (1997). Diagnostic Handbook of Otorhinolaryngology.
- HELL, S. W. et WICHMANN, J. (1994). Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission : stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics letters*, 19, 780–2.
- HELMCHEN, F. et DENK, W. (2005). Deep tissue two-photon microscopy. 2.
- HIRANO, M. (1975). Phonosurgery : basic and clinic investigations. *Otologia Fukuoka*, 21, 239–245.
- HIRANO, M. (1977). Structure and vibratory behaviour of the vocal folds. M. Sawashima et F. S. Cooper, éditeurs, *Dynamic Aspects of Speech Production*, University of Tokyo Press. 13–27.
- HIRANO, M., KURITA, S. et NAKASHIMA, T. (1983). Growth, development and aging of human voice folds. *Vocal Fold physiology*. 22–43.
- HUANG, C.-C., SUN, L., DAILEY, S. H., WANG, S.-H. et SHUNG, K. K. (2007). High frequency ultrasonic characterization of human vocal fold tissue. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 122, 1827.
- ICHIHARA, A., TANAAMI, T., ISOZAKI, K., SUGIYAMA, Y., KOSUGI, Y., MIKURIYA, K., ABE, M. et UEMURA, I. (1996). High-Speed Confocal Fluorescence Microscopy Using a Nipkow Scanner with Microlenses for 3-D Imaging of Single Fluorescent Molecule in Real Time. *Bioimages*, 4, 57–62.
- JALBERT, I., STAPLETON, F., PAPAS, E., SWEENEY, D. F. et CORONEO, M. (2003). In vivo confocal microscopy of the human cornea. *The British journal of ophthalmology*, 87, 225–36.
- KURITA, S., NAGATA, K. et HIRANO, M. (1983). *Vocal fold physiology*.
- MASIHZADEH, O. (2010). *Improved resolution and speed in nonlinear microscopy*. Thèse de doctorat, Colorado State University.
- MATURO, S., BENBOUJJA, F., BOUDOUX, C. et HARTNICK, C. J. (2012). Quantitative Distinction of Unique Vocal Fold Subepithelial Architecture Using Optical Coherence Tomography. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*.
- MILLER, M. J., WEI, S. H., PARKER, I. et CAHALAN, M. D. (2002). Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science (New York, N.Y.)*, 296, 1869–73.
- MINSKY, M. (2011). *Memoir on inventing the confocal scanning microscope*.
- MIRI, A. K., TRIPATHY, U., MONGEAU, L. et WISEMAN, P. W. (2012). Nonlinear laser scanning microscopy of human vocal folds. *The Laryngoscope*, 122, 356–63.

- PAWLEY, J. (2006). *Handbook of biological confocal microscopy*, vol. 13.
- PETRÁŇ, M., HADRAVSKÝ, M., EGGER, M. D. et GALAMBOS, R. (1968). Tandem-Scanning Reflected-Light Microscope. *Journal of the Optical Society of America*, 58, 661.
- RAJADHYAKSHA, M., ANDERSON, R. R. et WEBB, R. H. (1999). Video-rate confocal scanning laser microscope for imaging human tissues in vivo. *Applied optics*, 38, 2105–15.
- RAJADHYAKSHA, M., GROSSMAN, M., ESTEROWITZ, D., WEBB, R. H. et ANDERSON, R. R. (1995). In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin : melanin provides strong contrast. *Journal of Investigative dermatology*.
- ROTH, S. et FREUND, I. (1979). Second harmonic generation in collagen. *The Journal of Chemical Physics*, 70, 1637.
- RUBART, M. (2004). Two-photon microscopy of cells and tissue. *Circulation research*, 95, 1154–66.
- RUST, M. J., BATES, M. et ZHUANG, X. (2006). imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). 3, 793–795.
- SATO, K., HIRANO, M. et NAKASHIMA, T. (2001). Fine structure of the human newborn and infant vocal fold mucosae. *The Annals of otology, rhinology*.
- STRUPLER, M. (2008). *Imagerie du collagène par microscopie multiphotonique. Application aux fibroses rénales*. Thèse de doctorat.
- STRUPLER, M., HERNEST, M., FLIGNY, C., MARTIN, J.-L., THARAUX, P.-L. et SCHANNE-KLEIN, M.-C. (2012). Second harmonic microscopy to quantify renal interstitial fibrosis and arterial remodeling. *Journal of biomedical optics*, 13, 054041.
- THEER, P., HASAN, M. T. et DENK, W. (2003). Two-photon imaging to a depth of 1000 microm in living brains by use of a Ti :Al₂O₃ regenerative amplifier. *Optics letters*, 28, 1022–4.
- UJIKE, T. (2008). Slit-Scanning Confocal Microscope. *WO Patent WO/2008/099,778*.
- WEBB, R. H. (1996). Confocal optical microscopy. *Rep. Prog. Phys.*, 59, 427–471.
- WHITE, J. (1991). Confocal imaging system. *US Patent 5,032,720*.
- WILSON, T. et CARLINI, A. R. (1987). Size of the detector in confocal imaging systems. *Optics letters*, 12, 227–9.
- WRAY, J. et NEU, J. (1969). Refractive Index of Several Glasses as a Function of Wavelength and Temperature. *JOSA*, 59, 774–776.
- ZIPFEL, W., WILLIAMS, R. et WEBB, W. (2003). Nonlinear magic : multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature biotechnology*.