

PHÉNOTYPAGE D'ORGANOÏDES : APPORT D'UNE PLATEFORME INTÉGRÉE POUR LEUR CARACTÉRISATION

RIVIÈRE Julie*, VILOTTE Marthe, BEVILACQUA Claudia, GIUFFRA Elisabetta,
EGIDY-MASKOS Giorgia, BLANC Fany

*Plateforme @BRIDGe, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative
(GABI), Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas cedex, France*

* auteur correspondant julie.riviere@inrae.fr

PHENOTYPING OF ORGANOID: CONTRIBUTION OF AN INTEGRATED PLATFORM FOR THEIR CHARACTERIZATION

ABSTRACT

Classical 2D *in vitro* cell cultures have shown their limits, and the development of "organotypic" cell cultures of epithelial tissues seems a good way to replace animal biopsies. Organoids are 3D organotypic cell cultures derived from animal tissue stem cells. Development of protocols for obtaining organoids from different organs is underway at INRAE in Jouy-en-Josas. Their characterization is an important step to verify cell differentiation.

At the Animal Genetics and Integrative Biology unit (INRAE UMR1313 GABI), the Genetics, Microbiota, Health (GeMS) team has developed the production of pig intestinal organoids. The @BRIDGe (Animal Biological Resources for Integrated and Digital Genomics) platform of the GABI unit brings its expertise in histology and molecular biology for the characterization of the organoids obtained by those production protocols.

KEY WORDS

Organoids, characterization, histology, molecular biology

RESUME

Les cultures cellulaires 2D *in vitro* classiques ont montré leurs limites, aussi, le développement de cultures cellulaires "organotypiques" de tissus épithéliaux trouvent toute leur place pour se substituer aux biopsies animales. Les organoïdes sont des cultures cellulaires organotypiques 3D dérivant de cellules souches de tissus animaux. Des mises au point de protocoles d'obtention d'organoïdes issus de différents organes sont en cours à INRAE (Jouy-en-Josas). Leur caractérisation est une étape importante pour vérifier la différenciation des cellules.

Dans l'unité de Génétique Animale et de Biologie Intégrative (INRAE UMR1313 GABI), l'équipe de Génétique, Microbiote, Santé (GeMS) a mis au point la production d'organoïdes intestinaux de porc. La plateforme @BRIDGe (Animal Biological Resources for Integrated and Digital Genomics) de l'unité GABI apporte son expertise en histologie et biologie moléculaire pour la caractérisation des organoïdes obtenus par ces protocoles de production.

MOTS CLES

Organoïdes, caractérisation, histologie, biologie moléculaire

INTRODUCTION

A l'INRAE de Jouy-en-Josas, la plateforme @BRIDGe de l'UMR 1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative (GABI) propose une offre intégrée de services de la conservation de l'échantillon biologique à son analyse au niveau tissulaire, cellulaire et moléculaire. Dédiée à la génomique des animaux domestiques, ses compétences et ses équipements lui permettent également de participer à des projets concernant la biologie humaine ou des modèles biomédicaux. Elle est certifiée ISO 9001:2015 depuis 2018 pour toutes ses activités (www.abridge.inrae.fr).

L'équipe GeMS de l'unité GABI travaille entre autres sur le contrôle génétique de l'immunité et de l'immunocompétence. Une des thématiques de recherche est l'étude de l'architecture génétique des caractères de santé et de bien-être du porc et de la poule, en évaluant la capacité des animaux à effectuer une réponse immune efficace après infection par des pathogènes, vaccination ou bien lors du sevrage chez le porcelet. L'équipe GeMS mène des approches de génétique et de génomique fonctionnelle sur de grands dispositifs expérimentaux et développe également des méthodes de phénotypage *in vitro* (organoïdes, lignées cellulaires) (<https://www6.jouy.inrae.fr/gabi/Les-Recherches/Equipes-de-recherche/GeMS>).

Il apparaît important aujourd'hui de diminuer le nombre d'animaux sacrifiés pour des études biologiques. Les modèles de culture cellulaire *in vitro* en 2D ont trouvé leurs limites, aussi le développement de cultures cellulaires « organotypiques » en 3D de tissus épithéliaux (intestin, glande mammaire...) trouvent toute leur place pour se substituer aux biopsies animales. En effet, basée sur les propriétés d'auto-renouvellement des cellules souches du tissu, la culture d'organoïdes présente des possibilités de maintenance au long cours et de stockage par congélation. C'est pour cela que l'équipe GeMS a mis au point des protocoles de production d'organoïdes intestinaux de porc [1, 2].

L'épithélium intestinal est composé d'une monocouche de différents types cellulaires qui assurent chacun un rôle spécifique dans l'homéostasie de l'organe (**Figure 1**).

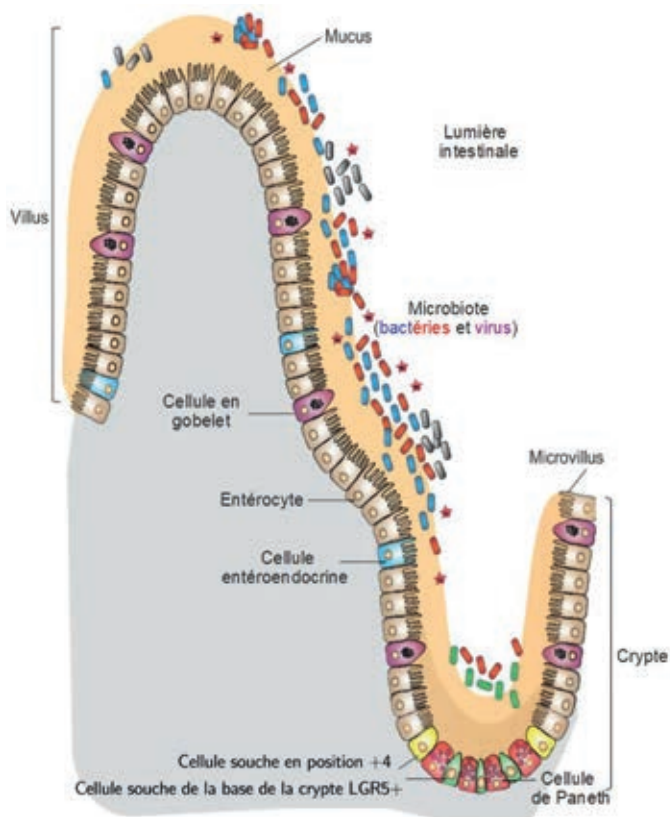


Figure 1 :
Schéma simplifié de l'épithélium intestinal.
Œuvre dérivée de Wong et al. [3]

L'intestin grêle est composé de 3 parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Son rôle principal est l'absorption des acides aminés, des lipides et des glucides. Afin d'amplifier ses capacités d'absorption, l'intestin grêle est structuré en villosités intestinales, elles-mêmes composées de différents types cellulaires : entérocytes, cellules caliciformes dites « en gobelet » productrices de mucus, cellules endocrines, cellules souches et cellules de Paneth, productrices de lysozymes.

Le côlon a quant à lui un rôle dans l'absorption d'eau et d'ions, d'acides gras et de vitamines synthétisés par les bactéries et un rôle dans la formation des matières fécales. Il n'a pas une structure d'amplification de l'absorption comme l'intestin grêle (absence de villi). Les cellules épithéliales du côlon, appelées colonocytes, ont pour principale source d'énergie le butyrate. On n'y trouve pas de cellules de Paneth, mais beaucoup de cellules caliciformes productrices de mucus.

Chaque type cellulaire ayant des caractéristiques particulières et un rôle qui lui est propre, les organoïdes produits doivent posséder les mêmes caractéristiques que l'organe d'origine. C'est pourquoi la caractérisation des organoïdes est une étape importante pour contrôler la différenciation des cellules.

Pour cela, la plateforme @BRIDGE apporte son expertise technique pour le contrôle de la nature de ces échantillons, d'une part par la caractérisation moléculaire de ces nouveaux échantillons, et d'autre part, par la caractérisation morphologique en histologie et immunofluorescence.

L'objectif de cet article est de présenter en détail la méthodologie appliquée dans le cadre d'un projet collaboratif avec une équipe de recherche de l'unité GABI visant à vérifier que les protocoles utilisés « en routine » sur la plateforme pouvaient être utilisés ou adaptés à ces petits échantillons particuliers.

MATERIELS ET METHODES

1- Production des organoïdes

Les organoïdes ont été produits à partir de 3 sections d'intestin grêle : duodénum, jéjunum et iléon, ainsi qu'à partir de côlon de porcs de race Melanoma-Bearing Libechov Minipig (MeLiM) hébergés à proximité du laboratoire à Jouy-en-Josas.

Les conditions d'obtention et de culture des organoïdes ont été mises au point par l'équipe GeMS, d'après le protocole de van der Hee *et al.* [4]. Brièvement, pour chaque section intestinale, les biopsies d'intestin ont été identifiées, isolées et nettoyées au Phosphate Buffer Saline 1X (PBS 1X). Après dissociation du tissu pour obtenir les cellules souches pluripotentes, celles-ci ont été mises en culture dans du Matrigel pour l'obtention de structures 3D, et mises en présence de facteurs favorisant leur prolifération puis leur différenciation.

A l'issue de cette étape de culture par l'équipe de recherche, les échantillons ont été pris en charge par la plateforme @BRIDGE.

2- Préparation des échantillons pour leur analyse moléculaire

Les organoïdes cultivés en plaque 24 puits ont été isolés du Matrigel par pipettage en présence de PBS 1X froid, puis centrifugés afin d'obtenir un culot cellulaire. Le culot a été repris dans du Trizol puis l'extraction a été effectuée grâce au kit PicoPure d'Arcturus. La qualité et la quantité des ARN ont été ensuite vérifiées au nanodrop puis au Bioanalyzer (Agilent Biotechnologies).

Afin d'optimiser les conditions de culture, la différenciation cellulaire des organoïdes a été étudiée à travers l'expression de certains gènes de différenciation. Les ARN des organoïdes ont été extraits à différents temps de culture : 3 jours (J3), 5 jours (J5) et 7 jours (J7) puis ces marqueurs de différenciation ont été analysés par PCR quantitative sur la plateforme. Les marqueurs choisis sont les suivants : *PCNA* (prolifération), *LGR5* (cellules souches), *MUC2* (cellules caliciformes), *VILLINE 1* (entérocytes), *LYZOZYME* (cellules de Paneth), *CHROMOGRANINE A* (cellules entéro-endocrines).

3- Préparation des échantillons pour les analyses histologiques

Les organoïdes cultivés en gouttes de Matrigel ont été rincés avec 1 mL de PBS 1X puis fixés 1h30 avec 900 µL de paraformaldéhyde 4% (PFA 4%) sur de la glace. Après fixation, les organoïdes ont été délicatement décollés du fond de la plaque à l'aide d'une pipette P1000 avec un cône à la pointe coupée. Ils ont ensuite été mis dans un tube de 2mL puis centrifugés 1 min à 2000 x g pour les culotter au fond du tube. Le surnageant a été éliminé et le culot a été repris avec 100 µL d'agarose 2% avec des mouvements de va-et-vient délicats à l'aide d'une pipette P200 à l'embout de cône coupé. La solution d'agarose a été conservée au bain marie à une température le gardant liquide (environ 70°C). Les tubes ont ensuite été placés dans la glace pour figer l'agarose, puis conservés au minimum 24h en éthanol 70% avec ajout d'éosine Y en poudre pour colorer les organoïdes et ainsi les rendre plus visibles dans la paraffine au moment de la coupe.

Les organoïdes pris en bloc d'agarose ont été mis en cassette puis déshydratés et enrobés en paraffine selon le protocole classique utilisé sur la plateforme @BRIDGE (Ethanol 80°, 2h ; Ethanol 95°, 2h ; Ethanol 100, 2h ; Xylène 2 x 2h, Paraffine 3 x 2h).

Des biopsies des 4 sections d'intestin (duodénum, jéjunum, iléon, côlon) ont été fixées en PFA 4% pendant 48h, puis selon le protocole ci-dessus inclus en paraffine

pour les analyses histologiques. Parfois fixés en liquide de Carnoy pendant 3 semaines, les échantillons ont suivi le protocole suivant pour inclusion en paraffine : Méthanol, 2 x 30 min ; Ethanol 100, 2 x 20 min ; Xylène 2 x 15min ; Paraffine, 3 x 2h. Le liquide de Carnoy est composé de méthanol (60%), chloroforme (30%) et d'acide acétique (10%). Le mucus est riche en eau. Ce fixateur ne contenant pas d'eau va permettre une meilleure conservation de la couche de mucus. Tous les échantillons ont ensuite été coupés au microtome à une épaisseur de 5µm.

4- Analyses histologiques

3.1 Colorations

Tous les échantillons d'organes et d'organoïdes ont été colorés en Hématoxyline-Eosine-Safranine (HES) et en Bleu Alcian + PAS (acide périodique Schiff) (BA + PAS). La coloration Hématoxyline-Eosine-Safranine permet d'étudier la morphologie des organoïdes produits. La coloration Bleu Alcian + PAS permet de mettre en évidence les cellules caliciformes productrices de mucus. Puis les lames colorées ont été numérisées avec le scanner de lames Panoramic Scan 150, 3D Histech.

3.2 Immunofluorescence

La différenciation cellulaire des organoïdes a été également vérifiée par immunofluorescence. Le marquage par les anticorps a été mis au point sur les biopsies des portions d'iléon de porc.

Des anticorps spécifiques de différents types cellulaires ont été utilisés (**Tableau I**). Les immunofluorescences ont été effectuées sur automate BOND RXm (Leica), avec le BOND Research kit Leica (DS9455) selon le protocole suivant: les coupes ont été déparaffinées et réhydratées suivant le protocole classique du BOND RXm. Une étape de démasquage antigénique a ensuite été faite pendant 20 minutes à pH 6 (tampon Leica ER1, référence AR9961) ou à pH 9 (tampon Leica ER2, référence AR9640) selon l'anticorps primaire (voir **Tableau I**). Les coupes ont été incubées 10 min avec une solution de blocage (2% Bovine Serum Albumine, 5% Normal Goat Serum) puis incubées 1h avec l'anticorps primaire dilué au 1/500^{ème} (**Tableau I**) et enfin une dernière incubation de 30 min avec une solution d'anticorps secondaire dilué au 1/2000 et du 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) dilué au 1/500. Elles ont ensuite été montées avec le milieu de montage aqueux FluoroMount® et numérisées avec le scanner de lames Panoramic Scan 150, 3D Histech.

Types cellulaires	Anticorps Primaires	Référence Fournisseur	pH de Démasquage	Anticorps Secondaires
Entérocytes matures	anticorps polyclonal (lapin) anti- villine 1	NBP1-85335, Novus Biological	pH 6	anti rabbit IgG Alexa Fluor® 647
Cellules caliciformes	anticorps polyclonal (lapin) anti- MUC2	NBP1-31231, Novus Biological	pH 9	anti rabbit IgG Alexa Fluor® 647
Cellules entéro-endocrines	anticorps monoclonal (souris) anti- chromogranine A	NBP2-34240, Novus Biological	pH 9	anti mouse IgG Alexa Fluor® 660

Tableau I : Anticorps utilisés et conditions d'utilisation

RESULTATS

1- Observation des organoïdes en culture

Le suivi de la croissance des organoïdes a permis d'évaluer leur croissance pour chaque portion d'intestin étudiée. Les organoïdes sont apportés sur la plateforme aux stades J3, J5 et J7. On peut voir sur la **figure 2** qu'au stade J7, les organoïdes sont composés d'une monocouche épithéliale bordant une lumière centrale.

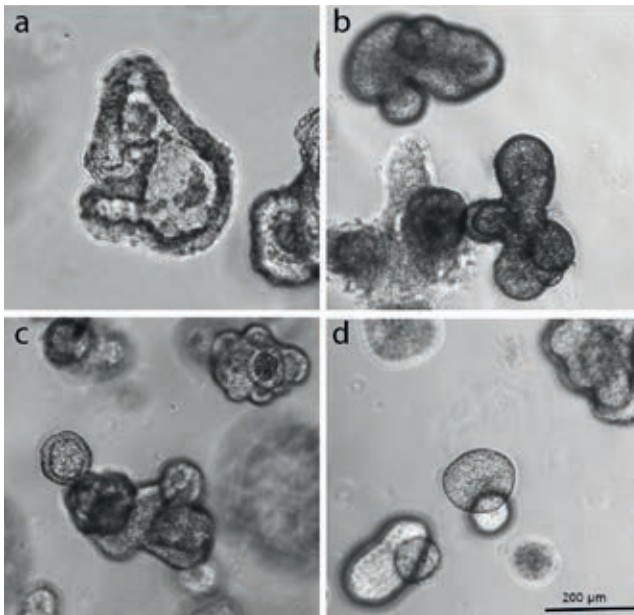


Figure 2 : Observation des organoïdes au microscope inversé après 7 jours de culture.
 A. duodénum
 B. jéjunum
 C. iléon
 D. côlon

2- Analyses moléculaires

L'extraction d'ARN à partir des organoïdes intestinaux de porc est faite à partir d'un puits d'une plaque 24 puits. La quantité d'organoïdes de départ est variable d'un puits à l'autre. La quantité d'ARN extraite est comprise entre 20 ng/ μ L et 100 ng/ μ L. Le contrôle au Bioanalyzer des ARN extraits montre que nous obtenons des ARN de bonne qualité : RNA Integrity Number (RIN) entre 8 et 9.

Parmi les paramètres étudiés en PCR quantitative, il y a le nombre de cellules dissociées nécessaires ainsi que la présence ou non du facteur de croissance Wnt pour le déclenchement de la différenciation cellulaire. Pour les organoïdes issus d'iléons, la **figure 3** montre qu'à partir de 3 jours de culture, l'expression de *MUC2* augmente lorsque l'on met 30000 cellules au départ. Le retrait du facteur de croissance Wnt après 3 jours de culture entraîne une forte diminution de l'expression du gène *LGR5* et une augmentation de l'expression du gène *MUC2* et donc une initiation de la différenciation cellulaire.

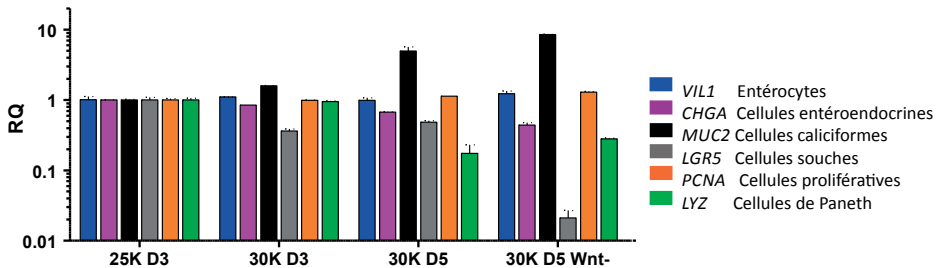


Figure 3 : Analyse par qPCR de gènes représentatifs de l'état cellules-souches (*LGR5*) ou prolifératif (*PCNA*) et des gènes de différenciations cellulaires (*VIL1*, *CHGA*, *MUC2* et *LYZ*)

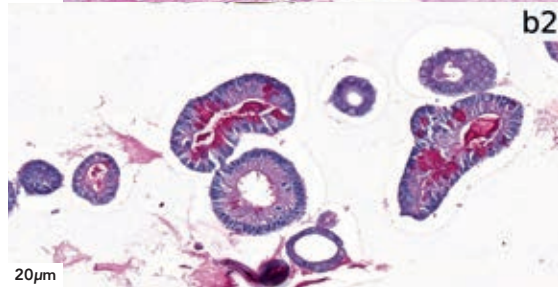
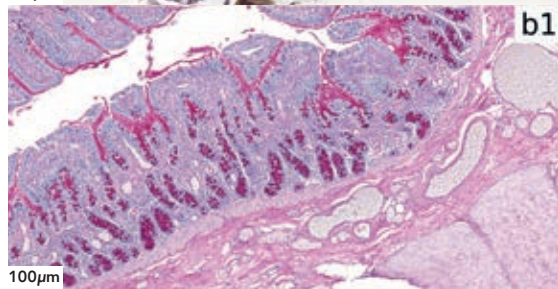
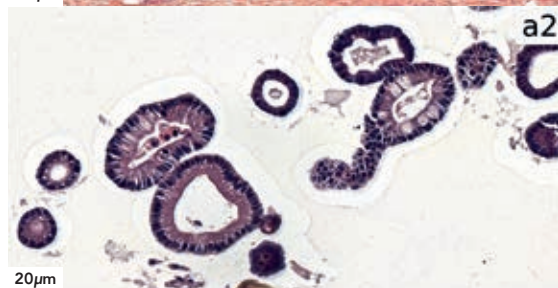
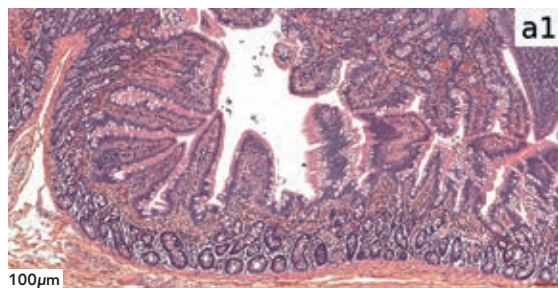
Les analyses par qPCR des différents marqueurs de prolifération ont permis d'optimiser les conditions de cultures des organoïdes.

3- Analyses histologiques - colorations

La coloration morphologique Hématoxyline-Eosine-Safranine de la coupe d'iléon de porc montre que les cellules composant les villosités intestinales sont en majorité longues, étroites et polarisées (**Fig. 4a1**). Entre les entérocytes, on trouve

des cellules caliciformes produisant le mucus intestinal (**Fig. 4b1**). La coloration HES des coupes d'organoïdes montre également qu'on retrouve cette structure épithéliale composée de cellules polarisées longues et étroites (**Fig. 4a2**).

La coloration Bleu Alcian + PAS des coupes d'organoïdes permet d'identifier clairement la présence de cellules caliciformes, productrices de mucus (**Fig. 4b2**).



Les mêmes résultats ont été obtenus sur les portions de duodénum, jéjunum et côlon.

Figure 4 : Coupes d'iléon de porc (a1, b1) et d'organoïdes (a2, b2) colorées en HES (a1, a2) et au Bleu Alcian + PAS (b1, b2)

4- Analyses histologiques – Immunofluorescence

On peut voir sur la **figure 5 a1**, que les villosités intestinales sont composées d'entérocytes matures, cellules marquées par l'anticorps anti-villine1. Parmi ces entérocytes matures, on détecte la présence de cellules entéro-endocrines qui sont mises en évidence par l'anticorps anti-chromogranine A (**Figure 5 c1**) et des cellules caliciformes mises en évidence par l'anticorps anti-MUC2 (**Figure 5 b1**). Ces anticorps permettent d'identifier ces mêmes cellules différenciées dans les organoïdes d'iléons (**Fig. 5a2, b2, c2**).

Les mêmes résultats ont été obtenus sur les portions de duodénum, jéjunum et côlon.

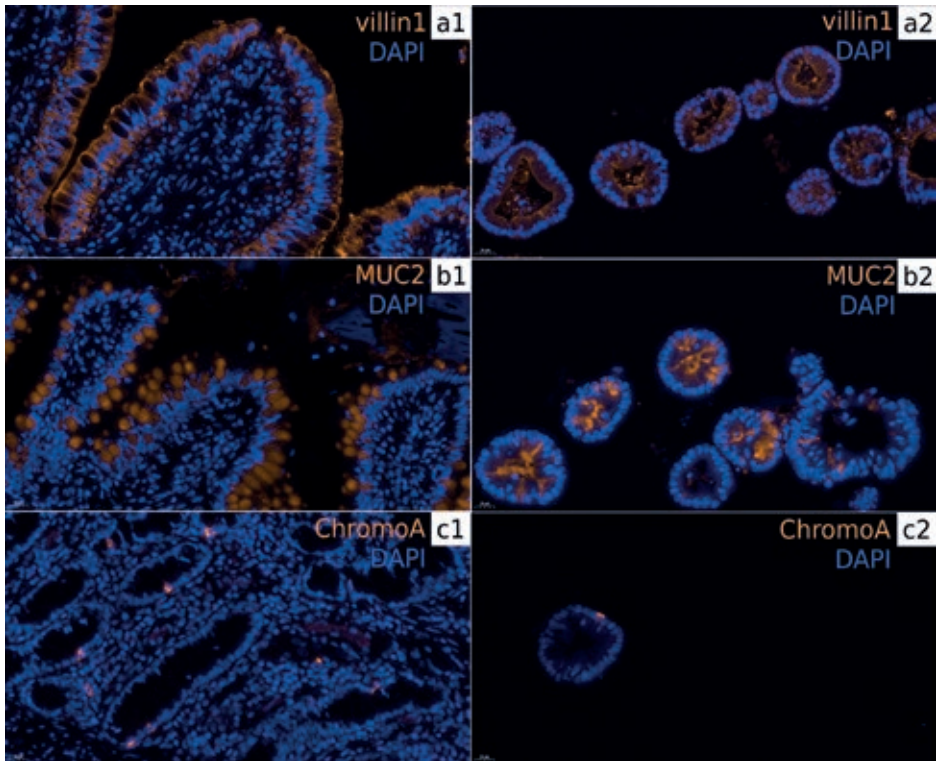


Figure 5 : Immunofluorescence sur coupes d'iléon de porc et d'organoïdes d'iléon.
Barre d'échelle : 20µm

CONCLUSION

Les premiers tests en biologie moléculaire ont permis d'obtenir des échantillons en quantité suffisante et de bonne qualité grâce au savoir-faire de la plateforme @BRIDGe dans l'analyse d'échantillons de taille réduite. Cela a permis à l'équipe GeMS de déterminer les conditions optimales de culture en étudiant l'expression de certains gènes marqueurs de prolifération, de différenciation ou de cellules souches pluripotentes.

Les résultats obtenus en histologie ont montré que les protocoles « de routine » utilisés sur la plateforme @BRIDGe pour les tissus animaux pouvaient être appliqués sur d'autres types d'échantillons moins conventionnels tels que les organoïdes.

Ces premiers tests de faisabilité sur la plateforme ont permis à l'équipe GeMS de développer leur activité de production d'organoïdes à des fins de recherche en augmentant le nombre d'échantillons analysés. Dans un premier temps, ils ont pu optimiser les conditions de cultures en 3D, puis en 2D sur membranes Transwell. L'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons apportés sur la plateforme leur a permis de mettre en évidence des différences entre les organoïdes issus des différentes portions d'intestin, à l'image des différences conservées dans les tissus d'origine avec notamment des organoïdes de côlons plus gros et des organoïdes de duodénum moins circulaires ou l'observation de plus de cellules calciformes dans le côlon et les organoïdes de côlon [2].

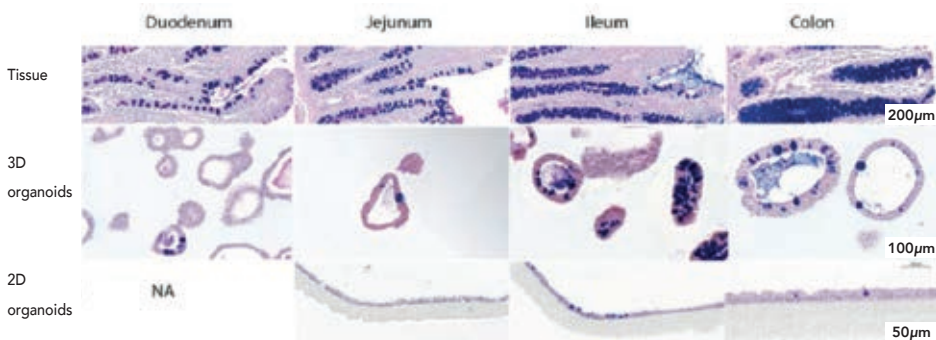


Figure 6 : Coloration Bleu Alcian + PAS des tissus, organoïdes 3D et 2D issus de duodénum, jéjunum, iléon et côlon, courtoisie de Blanc et *al.* Phenotypic Characterization of Organoids Derived from Pig Intestine Segments [2].

Dans un second temps, ils ont pu approfondir la caractérisation moléculaire des organoïdes en comparant le transcriptome des tissus d'origine et des organoïdes correspondant par analyses RNAseq. Ces résultats sont en cours d'analyse.

La complémentarité des services de la plateforme @BRIDGe a ainsi permis à l'équipe de recherche GeMS de développer un nouvel outil expérimental. Ceci ouvre de réelles perspectives d'utilisation des organoïdes comme modèle d'étude des tissus quand les problématiques de recherche le permettent.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BEAUMONT, M. et al., Intestinal organoids in farm animals, *Vet. Res.*, vol. 52, no 1, p. **33**, 2021, doi: 10.1186/s13567-021-00909-x.
2. BLANC, F. et al., Phenotypic Characterization of Organoids Derived from Pig Intestine Segments, 12th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Rotterdam, The Netherlands, 2022. https://www.wageningenacademic.com/doi/abs/10.3920/978-90-8686-940-4_505
3. WONG, A. C. N., VANHOVE, A. S. AND WATNICK, P. I. The interplay between intestinal bacteria and host metabolism in health and disease: lessons from *Drosophila melanogaster*, *Dis. Model. Mech.*, vol. **9**, no 3, p. 271-281, 2016, doi: 10.1242/dmm.023408.
4. VAN DER HEE, B. LOONEN, L. M. P. TAVERNE, N. TAVERNE-THIELE, J. J. SMIDT, H. AND WELLS, J. M. Optimized procedures for generating an enhanced, near physiological 2D culture system from porcine intestinal organoids, *Stem Cell Res.*, vol. **28**, p. 165-171, 2018, doi: 10.1016/j.j.scr.2018.02.013.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le département de Génétique Animale d'INRAE pour le financement de ce projet.

HISTOLOGIE RAMAN STIMULEE : QUAND L'OPTIQUE NON LINEAIRE PERMET D'OBTENIR SANS MARQUAGE ET QUASI INSTANTANEMENT UNE IMAGE HISTOLOGIQUE VIRTUELLE

SARRI Barbara^{1,2}, APPAY Romain^{3,4}, POIZAT Flora⁵ et RIGNEAULT Hervé^{1,2}

barbara.sarri@lightcore.tech, herve.rigneault@fresnel.fr

1. Aix-Marseille université, CNRS, Centrale Marseille,
Institut Fresnel, Marseille, France

2. Lightcore Technologies, Marseille, France

3. APHM, CHU Timone, Service d'Anatomie Pathologique
et de Neuropathologie, Marseille, France

4. Aix-Marseille Université, CNRS, INP, Inst. Neurophysiopathol,
Marseille, France.

5. Institut Paoli Calmettes, Département d'endoscopie
et de gastroentérologie, Marseille, France

ABSTRACT

In this article we propose to revisit the emergence of an innovative imaging technique: Stimulated Raman Histology (SRH). First, we will recall the principle of Raman spectroscopy and the limits of this technology before introducing the basics of nonlinear optics. We will then present the intrinsic advantages relating to nonlinear imaging techniques, in particular those derived from coherent Raman, which make it possible to obtain multimodal images providing information on the morphology of tissues and their chemical composition. We will explain how it is then possible to obtain virtual histological images without any labeling using stimulated Raman scattering (SRS) and second harmonic generation (SHG) microscopy images. We will trace the technological developments that have allowed this field to evolve rapidly and we will describe the elements necessary for the implementation of such imaging techniques; non-invasive and without any marker. We will relate the first studies in the field applied to tumors of the central nervous system and then in the gastric field. We will follow a step-by-step approach to demonstrate the potential of this innovative imaging technique which has the potential to become a tool of choice in the endoscopy, surgery and histopathology departments of hospitals.

KEY WORDS

Non-linear optics, Coherent Raman Imaging, Stimulated Raman Scattering, Second Harmonic Generation, Virtual Histology, Stimulated Raman Histology, Pathology workflow

RESUME

Dans cet article nous proposons de revisiter l'émergence d'une technique d'imagerie innovante : l'histologie Raman stimulée (SRH). Dans un premier temps nous rappellerons le principe de la spectroscopie Raman et les limites de cette technologie avant d'introduire les bases de l'optique non-linéaire. Nous présenterons alors les avantages intrinsèques relatifs aux techniques d'imagerie non-linéaires, notamment celles issues du Raman cohérent, qui permettent d'obtenir des images multimodales renseignant sur la morphologie des tissus et leur composition chimique. Nous expliquerons comment il est alors possible d'obtenir, sans aucun marquage, des images histologiques virtuelles en utilisant des images de microscopie par diffusion Raman stimulée (SRS) et de génération de la seconde harmonique (SHG). Nous retracerons les évolutions technologiques qui ont permis à ce domaine d'évoluer rapidement et nous décrirons les éléments nécessaires à l'implémentation de telles techniques d'imagerie, non invasives et sans marquage. Nous relaterons les premières études du domaine d'abord appliquées aux tumeurs du système nerveux centrale puis dans le domaine gastrique. Nous suivrons une démarche pas à pas pour démontrer le potentiel de cette technique d'imagerie novatrice qui présente des qualités nécessaires pour devenir un outil de choix dans les services hospitaliers notamment de chirurgie et d'histopathologie.

MOTS CLES

Optique Non linéaire, Imagerie Raman Cohérent, Diffusion Raman Cohérent, Génération de Seconde Harmonique, Histologie Virtuelle, Examen anatomopathologique

INTRODUCTION

L'examen anatomopathologique ou histopathologique consiste à analyser au microscope des prélèvements tissulaires d'organes afin d'établir un diagnostic. Cet examen peut être réalisé au cours d'une opération chirurgicale, il s'agit de l'examen extemporané dont les résultats permettent d'adapter immédiatement le geste chirurgical au cours de l'intervention. Dans cet article nous revisitons l'émergence d'une technique d'imagerie innovante : l'histologie Raman stimulée (SRH). Après avoir rappelé le principe de la spectroscopie Raman, nous présenterons les avantages intrinsèques relatifs aux techniques d'imagerie non-linéaires, notamment celles issues du Raman cohérent, qui permettent d'obtenir des images multimodales renseignant sur la morphologie des tissus et ainsi que sur leur composition chimique. En combinant des images de microscopie par diffusion Raman stimulée (SRS) et de génération de la seconde harmonique (SHG) il est possible de créer, sans aucun marquage, des images histologiques virtuelles : c'est l'histologie Raman Stimulée. Nous présenterons les premières études du domaine appliquées aux tumeurs du système nerveux central et du système digestif.

Spectroscopie Raman

C'est en 1928 que Sir C. V. Raman découvrit l'effet qui portera son nom : il démontra que lorsqu'on éclaire un échantillon avec une source de lumière monochromatique, une petite portion de la lumière – environ un photon sur un million - est diffractée inélastiquement : il y a alors échange d'énergie entre la lumière incidente et l'échantillon. Il mit en évidence que la quantité d'énergie échangée (prise ou donnée à la lumière incidente par l'échantillon) induisait un décalage en longueur d'onde qui était caractéristique des liaisons chimiques covalentes présentes dans l'échantillon.

Lorsque l'on s'intéresse au phénomène de diffusion Raman spontanée, il faut réfléchir en termes de polarisabilité : la polarisabilité d'une molécule est sa capacité - ou plutôt celle de son nuage électronique - à se déformer lorsqu'elle est soumise à un champ électromagnétique.

Pour appréhender ce phénomène on peut visualiser les molécules comme un système de masses et de ressorts : les atomes étant représentés par des masses et les liaisons covalentes par des ressorts. On peut alors démontrer que le comportement vibrationnel d'une molécule se décrit grâce au modèle de l'oscillateur harmonique.

La distance entre les atomes étant sujette à des oscillations $r(t)$ lorsqu'un champ électromagnétique de pulsation ω_0 est appliqué avec $r(t) = r \cos(\Omega_R t)$ où r représente l'amplitude des oscillations et Ω_R la pulsation de vibration moléculaire de la liaison chimique. Cette pulsation de vibration moléculaire Ω_R dépend de la masse des atomes ainsi que de la force de la liaison covalente. Chaque mode de vibration d'une liaison covalente aura une pulsation de vibration unique qu'on appelle sa signature vibrationnelle.

Lorsque la molécule est illuminée par une onde électromagnétique de pulsation ω_0 , la très grande majorité des photons va être diffusée élastiquement : c'est la diffusion Rayleigh, il n'y a pas d'échange d'énergie et $\omega_{\text{Rayleigh}} = \omega_0$. On distingue ensuite deux rayonnements distincts en fonction du sens du transfert d'énergie entre la molécule d'intérêt et la lumière incidente. Si la molécule est dans un état fondamental (cas le plus probable) il va y avoir absorption d'énergie par la molécule. Il y aura perte d'énergie du photon diffusé par rapport au photon incident et la lumière émise sera décalée vers le rouge : c'est le rayonnement Stokes de pulsation $\omega_{\text{Stokes}} = \omega_0 - \Omega_R$. Si la molécule est dans un état vibratoire excité, il va y avoir émission d'énergie lors de la désexcitation et il y aura un gain d'énergie du photon diffusé par rapport au photon incident : la lumière émise sera décalée vers le bleu : c'est le rayonnement anti-Stokes de pulsation $\omega_{\text{Anti-Stokes}} = \omega_0 + \Omega_R$. (voir diagrammes de Jablonski **Figure 1a**). Le lecteur pourra se référer à [1] pour de plus amples informations et voir une démonstration complète de ce processus.

En pratique il est possible de sonder la matière grâce à la spectroscopie Raman. L'utilisateur aura alors accès à la "carte d'identité chimique" de l'échantillon sondé : on parle de spectroscopie vibrationnelle. On s'intéresse alors à l'intensité des raies en fonction du nombre d'onde σ défini comme suit et mesuré en cm^{-1} :

$$\sigma = 1/\lambda_{\text{incidente}} - 1/\lambda_{\text{diffusée}}$$

Il existe des tables répertoriant les raies Raman dans une multitude de domaines. La **figure 2a** présente un exemple typique de spectre Raman d'échantillons biologiques : on y distingue trois grandes régions spectrales :

La région des CH entre 2700 et 3200 cm^{-1} avec un large pic présent autour de $2820\text{-}2980 \text{ cm}^{-1}$

La région silence entre 1800 et 2700 cm^{-1} où le vivant ne signe pas. Cette région peut notamment être utilisée pour détecter des espèces deutérées auxquelles on a substitué des atomes de carbones par des atomes de deutérium pour les rendre plus lourds (voir spectre rouge d'une espèce lipidique deutérée en **Figure 2a**).

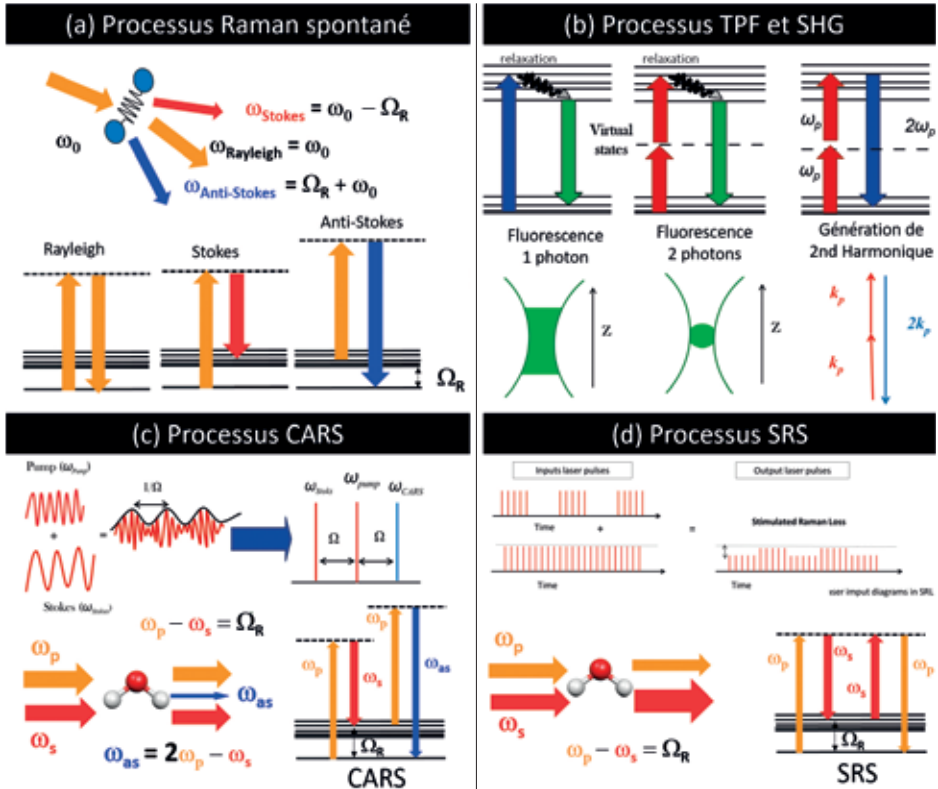


Figure 1: Récapitulatif des différents processus en jeu entre la diffusion Raman spontanée et les processus basés sur l'optique non-linéaire. Les diagrammes de Jablonski sont notamment présentés pour chaque processus. (a) Processus de diffusion Raman spontanée : les atomes peuvent être modélisés par des masses reliées par des ressorts. Diagrammes de Jablonski de la diffusion Rayleigh (diffusion élastique), de la diffusion Stokes (la molécule s'excite en absorbant de l'énergie du faisceau incident), de la diffusion Anti-Stokes (la molécule se désexcite en donnant de l'énergie au faisceau incident) ; (b) Diagramme de Jablonski de la fluorescence à 1 photon, 2 photons et de la génération de seconde harmonique. Inhérent à l'optique non-linéaire le sectionnement axial est nettement meilleur en fluorescence à deux photons. En SHG, 2 photons strictement identiques sont combinés en un photon de même phase mais de fréquence doublée. (c) En CARS deux faisceaux incidents Pompe et Stokes interagissent avec l'échantillon : lorsque la différence de leur pulsation, $\omega_p - \omega_s$ est égale à une fréquence de vibration moléculaire Ω_R , les atomes entrent en résonance et une forte réponse est observable à $\omega_{AS} = 2\omega_p - \omega_s$. (d) En SRS, un des deux faisceaux incidents est modulé et l'on observe le transfert de modulation d'un faisceau à l'autre lorsque $\omega_p - \omega_s = \Omega_R$.

La région des empreintes ("fingerprint" en anglais) aux plus bas nombres d'ondes entre 400 et 1800 cm^{-1} dans laquelle on retrouve une multitude de fines raies.

Il est ici important de noter que c'est le mode de vibration d'une liaison covalente qui a une fréquence de vibration propre (et donc une raie caractéristique sur les spectres Raman) et non la liaison covalente elle-même. Un groupement d'atomes CH_3 ou CH_2 pourra avoir plusieurs fréquences de vibration selon le mode de vibration (par exemple mode symétrique, antisymétrique, liaison carbone-carbone *cis* ou *trans* qui auront des fréquences de vibration différentes) et l'environnement atomique (seconds voisins). On remarquera également qu'il est équivalent de parler de fréquence de vibration et de pulsation, la fréquence ν étant reliée à la pulsation ω par $\omega = 2\pi\nu$. Une des forces de la spectroscopie Raman est sa facilité d'utilisation : l'échantillon ne nécessite en général pas de préparation spécifique. Cette technique est également non-destructive et ne nécessite pas de marquage. Cependant le processus Raman souffre de son inefficacité. On quantifie généralement l'efficacité d'un processus par sa section efficace. Celle-ci est définie comme la probabilité qu'a la lumière d'interagir avec des atomes dans l'espace les entourant. La section efficace du Raman spontané n'est que de 10^{-33}cm^2 ! Ceci implique de faibles signaux et de longs temps d'intégration. Il faut typiquement compter quelques minutes pour obtenir un spectre lisible. Dans la pratique, imager par Raman spontané un plan de 250x250 pixels (cartographie Raman) va demander plusieurs heures. Si la spectroscopie Raman reste largement utilisée dans les laboratoires et dans l'industrie, on lui préfère parfois depuis quelques années des techniques de diffusion Raman cohérentes pour faire de l'imagerie. Ces techniques sont développées dans la section suivante.

Optique non linéaire, excitation multiphotonique et génération d'harmoniques

On parle d'optique non-linéaire lorsque la polarisation (i.e. la réponse d'un milieu suite à l'application d'un ou des champs électriques) est régie par l'équation suivante :

$$\mathbf{P} = \epsilon_0 (\chi\mathbf{E} + \chi^2 \mathbf{E}\mathbf{E} + \chi^3 \mathbf{E}\mathbf{E}\mathbf{E} + \dots),$$

où ϵ_0 est la perméabilité du vide et χ^n le tenseur de susceptibilité d'ordre n .

Dans la plupart des cas le premier terme est largement prépondérant par rapport aux autres et l'on considère que la polarisation est proportionnelle au champ

appliqué : c'est l'optique linéaire. Cependant dans certaines conditions, les autres termes doivent être pris en compte et nous permettent de voir des effets/réponses non-linéaires dans certains matériaux : c'est le cas lorsque les champs électriques appliqués ne sont plus négligeables devant le champ électrique atomique auquel est soumis l'électron dans un atome (champ inter-atomique). En pratique pour atteindre de tels niveaux de champs qui doivent être supérieurs à $E_{\text{atome}} = 10^{11} \text{ V.m}^{-1}$, il faut des faisceaux de très forte intensité et ce n'est qu'avec l'arrivée des lasers pulsés dans les années 1960 que l'optique non-linéaire a véritablement pris son essor. Les techniques d'imagerie basées sur l'optique non-linéaire ont quant à elles vu le jour dans les années 1980.

Il existe plusieurs familles de processus non-linéaires : on distingue l'excitation multiphotonique, la génération d'harmoniques et le mélange d'ondes. Cependant toutes les techniques d'imagerie basées sur ces processus bénéficient des avantages inhérents à l'optique non-linéaire décrits plus bas.

On parle d'excitation multiphotonique lorsque plusieurs photons sont impliqués dans le processus d'excitation d'une molécule ou d'un fluorophore. Comparé à la fluorescence à un photon où un seul photon est absorbé, deux photons (trois photons dans le cas de la fluorescence à 3 photons) de plus basses énergies, seront absorbés quasi-instantanément en passant par des états d'énergie dits virtuels lors de la fluorescence à 2 photons (voir **Figure 1b**). La molécule sera excitée au même niveau et génèrera de la fluorescence dans toutes les directions de l'espace à la même fréquence qu'avec de la fluorescence un photon.

Comme les autres techniques d'imagerie basées sur l'optique non linéaire décrites plus bas, la fluorescence à deux photons présente plusieurs avantages comparativement à la microscopie traditionnelle à un photon :

- En premier lieu, les longueurs d'ondes généralement utilisées se situent dans le proche infrarouge : cela permet une plus grande pénétration dans les tissus biologiques. Les radiations de l'infrarouge sont moins diffusées dans les tissus que les radiations du visible.
- De plus, la résolution axiale de la microscopie est nettement améliorée comparée à la microscopie à un photon et similaire à celle de la microscopie confocale. Si l'on balaye un faisceau focalisé sur l'échantillon on pourra alors obtenir des cartographies 3D de cet échantillon. Ceci est dû à la nature non-linéaire du processus d'absorption à 2 photons : celui-ci ne se produit qu'au point de focalisation du faisceau incident, là où l'intensité est maximale, cela permet un sectionnement optique suivant l'axe z orienté dans la profondeur de

l'échantillon. Comme en microscopie confocale on peut alors acquérir des coupes (sections) d'un échantillon de type biopsie et en effectuer des reconstructions tridimensionnelles.

- Enfin, l'échantillon est mieux protégé contre les risques de photo-blanchiment et de photo-endommagement parce que les milieux absorbent généralement moins dans l'infrarouge.

Certains échantillons biologiques présentent un signal d'autofluorescence, ce qui rend la fluorescence à deux photons assez attrayante. Aucun fluorophore ou autre marqueur exogène n'a besoin d'être ajouté, le signal d'autofluorescence provenant de composants moléculaires endogènes au système. On peut citer l'élastine dans la peau, les flavines ou les enzymes NADPH. Cette auto-fluorescence permet alors d'avoir accès à la morphologie en 3D de l'échantillon sans marquage.

La génération d'harmoniques est légèrement différente. Dans le cas de la génération de seconde harmonique (SHG), deux photons (trois pour la génération de troisième harmonique THG) strictement identiques (*i.e.* de même phase et de même pulsation) sont combinés en un photon de même phase mais dont la pulsation sera doublée. Par exemple si l'on éclaire un échantillon avec un laser à 900nm le signal SHG sera émis à exactement 450nm et celui de THG à exactement 300nm. Une des conditions *sine qua non* pour pouvoir détecter un signal SHG est la non-centrosymétrie de l'échantillon au niveau moléculaire. Le collagène étant un des seuls composants non-centrosymétriques du vivant, le SHG est une technique de choix pour le discriminer des autres composants dans les échantillons biologiques.

Si les techniques d'imagerie TPF et SHG permettent de cartographier en 3D et sans marquage les échantillons biologiques, elles ne présentent pas de sélectivité chimique contrairement à la microscopie Raman stimulée décrite ci-après.

Diffusion Raman Cohérente et sélectivité chimique : imagerie vibrationnelle

A contrario de l'émission spontanée, lors de l'émission stimulée, un photon incident force un photon à se désexciter à travers l'interaction avec un échantillon en émettant un photon rigoureusement identique à lui-même (*i.e.* de même phase et de même fréquence) : on parle de processus cohérent.

Le processus CARS (pour Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) ou diffusion Raman cohérente anti-Stokes en français, est un mélange non-linéaire à 4 ondes.

En optique non-linéaire on parle de mélange à n ondes lorsque n photons (photons émis inclus) sont impliqués dans le processus. En CARS, trois champs électromagnétiques incidents : Pompe, Stokes et Probe, interagissent avec un échantillon, pour engendrer un quatrième champ : le champ Anti-Stokes. En pratique les champs Pompe et Probe sont identiques et deux champs électromagnétiques incidents E_{Pompe} et E_{Stokes} seulement seront nécessaires à l'implémentation du processus CARS.

Le principe est le suivant (voir diagramme de Jablonski **Figure 1c**) : les champs E_{Pompe} de pulsation ω_p et E_{Stokes} de pulsation ω_s peuvent se combiner si leur intensité est assez forte (phénomène d'optique non-linéaire). Lorsque la différence de pulsation entre le champ Pompe et le champ Stokes, $\Omega = \omega_p - \omega_s$, coïncide avec une fréquence moléculaire vibrationnelle Raman Ω_R présente dans l'échantillon, le processus devient résonant et toutes les liaisons covalentes de fréquence de vibration $\Omega = \Omega_R$ vont osciller en phase (i.e. de manière cohérente) pour générer un fort signal Anti-Stokes décalé vers le bleu, c'est le signal CARS. Cette forte réponse collective sera détectable à la pulsation Anti-Stokes $\omega_{as} = 2\omega_p - \omega_s$. En pratique ce signal sera 10^6 plus fort que le signal Raman spontané rendant l'imagerie (vibrationnelle) possible.

Si la microscopie CARS fut la première technologie d'imagerie vibrationnelle appliquée aux cellules, notamment pour la détection de gouttes lipidiques [2], cette technologie souffre de la présence d'un fond non-résonant qui bruite le signal et distord ses spectres. Aussi depuis sa mise en œuvre en microscopie en 2008 [3], on lui préfère le processus de diffusion Raman Stimulée (SRS) qui donne une réponse strictement égale au signal Raman spontané (sans distorsion spectrale). Nous décrivons ce processus ci-après. Pour de plus amples informations sur les principes physiques sous-jacents et une revue des diverses applications du CARS le lecteur pourra se référer à [1] et [4, 5] respectivement.

En diffusion Raman stimulée (SRS pour Stimulated Raman Scattering en anglais) le principe est légèrement différent et l'implémentation technologique plus contraignante. Comme en CARS, on applique toujours deux champs Pompe et Stokes, E_{Pompe} et E_{Stokes} , qui vont interagir avec un échantillon par différence de fréquence. Lorsque la différence de pulsation entre le champ Pompe et le champ Stokes ($\Omega = \omega_p - \omega_s$) coïncide avec une fréquence moléculaire vibrationnelle Raman Ω_R présente dans l'échantillon (i.e. quand $\Omega = \Omega_R$), on observe un changement d'intensité dans les faisceaux Pompe et Stokes. Le faisceau Pompe est atténué et le faisceau Stokes est amplifié. Néanmoins cette atténuation ou amplification est faible (de l'ordre de $\Delta I = 10^{-3}$ à 10^{-6}) et on utilise une technique de modulation pour les détecter. Il s'agit de moduler en intensité un des faisceaux et de regarder

le transfert de modulation dans le faisceau non modulé avec un amplificateur à détection synchrone. Tout se passe alors comme si les liaisons covalentes de fréquence de vibration $\Omega = \Omega_R$, en oscillant en phase, engendraient un transfert de modulation du faisceau modulé vers faisceau non-modulé. Ici, on ne s'intéresse donc pas à un nouveau rayonnement produit, comme le rayonnement Anti-Stokes en CARS, mais à une variation d'intensité d'un des deux faisceaux incidents (**Figure 2b**).

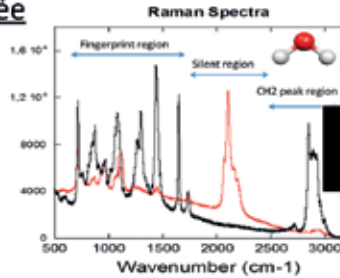
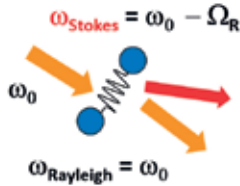
Cette petite variation d'intensité ΔI constitue le signal SRS. Tout comme pour le signal CARS, le signal SRS sera 10^6 plus efficace que le signal Raman spontané ce qui rend l'acquisition d'images SRS à cadence vidéo possible. Suivant si la modulation est réalisée sur le faisceau Stokes ou Pompe on parle de SRG (Stimulated Raman Gain) ou SRL (Stimulated Ramang Loss) (voir diagrammes de Jablonski **Figure 1d**). Dans les deux cas SRG et SRL sondent les liaisons chimiques et leur spectre est identique au signal Raman spontané. D'autre part les signaux SRG ou SRL sont linéaires avec la concentration des échantillons, ce qui en fait un outil de choix en imagerie chimique. Pour de plus amples informations sur les principes physiques sous-jacents au SRS le lecteur peut se référer à [1]. Enfin, en faisant varier la fréquence (ou la longueur d'onde) d'un des deux faisceaux incidents, il est possible de changer $\omega_p - \omega_s$ et donc la liaison moléculaire Ω_R sondée. Il est ainsi possible d'acquérir des spectres SRS. On acquière une image pour chaque Ω_R . On parle alors d'image hyperspectrale.

De la diffusion Raman Stimulée à l'histologie Raman Stimulée

Ce n'est que très récemment que le terme d'histologie Raman Stimulée est apparu (2017) (SRH pour Stimulated Raman Histology en anglais) [7]. On parle d'histologie Raman Stimulée lorsque l'on produit à partir de signaux d'optiques non linéaires, notamment des signaux SRS, des images chimiques qui par traitement numérique ressemblent aux colorations standards d'histopathologie : la coloration hématoxyline et éosine (HE) ou la coloration hématoxyline, éosine, safran (HES).

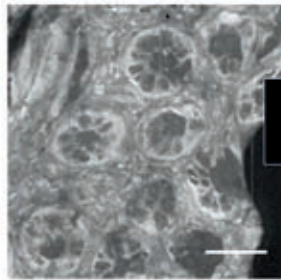
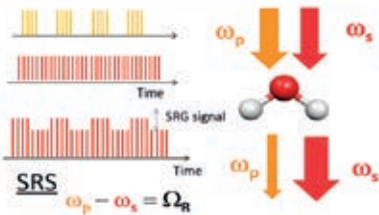
Pour construire des images SRH, on s'intéresse en particulier à deux raies Raman, aux nombres d'ondes suivants : $\Omega_1 = 2845\text{cm}^{-1}$ et $\Omega_2 = 2930\text{cm}^{-1}$. La première raie, correspond à la signature vibrationnelle de la liaison chimique CH_2 que l'on retrouve en abondance dans les lipides tandis que la seconde raie est la signature de la liaison chimique du CH_3 très présente dans les protéines et dans l'ADN. Ces

Diffusion Raman spontanée



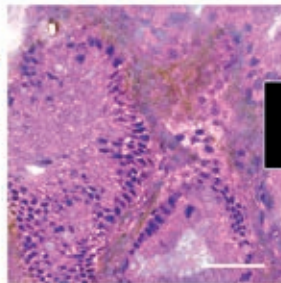
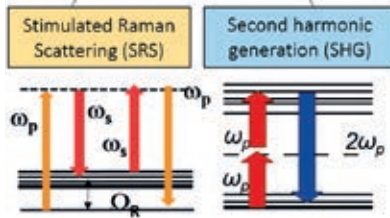
(a) Spectroscopie vibrationnelle

Diffusion Raman stimulée



(b) Imagerie vibrationnelle

Histologie Raman Stimulée



(c) Histologie virtuelle

Figure 2 : Du Raman spontané à l'histologie virtuelle. (a) La diffusion Raman spontanée est un phénomène de diffusion inélastique, on peut obtenir une information spectrale sur la nature des liaisons chimiques présentes dans l'échantillon : on parle de spectroscopie vibrationnelle. (b) Dans la diffusion Raman stimulée, on détecte le transfert de modulation d'un faisceau appelé Pompe sur un faisceau appelé Stokes. Ce phénomène est 10^6 fois plus efficace que le Raman spontané et permet de faire de l'imagerie vibrationnelle sans marquage. (c) Lorsque l'on combine les signatures de diffusion Raman Stimulée (SRS) de deux liaisons judicieusement choisies (CH_2 et CH_3) à de la génération de seconde harmonique (SHG) on peut générer en temps réel des images de qualité histologique : on parle d'histologie virtuelle. Barre d'échelle : $100\mu\text{m}$.

éléments étant souvent concentrés spatialement dans les cellules et dans les tissus, les images brutes chimiques SRS CH_2 et SRS CH_3 renseignent alors sur la morphologie et l'architecture générale de l'échantillon en même temps que sur leur composition chimique (voir **Figure 2b** et **Figure 3**). Remarquablement, il a été montré que la différence entre les signaux SRS CH_3 et SRS CH_2 , SRS ($\text{CH}_3 - \text{CH}_2$), permettait de mettre en exergue la distribution des noyaux cellulaires [6, 7, 8] (**Figure 3b**). Lorsqu'elle est acquise en parallèle, la génération de seconde harmonique révèle quant à elle la distribution et l'agencement des fibres de collagène, un autre élément caractéristique de la structure d'une tumeur et dont l'analyse est indispensable en anatomopathologie (**Figures 2 et 3**). Les trois signaux, SRS CH_2 , SRS ($\text{CH}_3 - \text{CH}_2$) et SHG acquis sans marquage, sont les trois images constitutives nécessaires à la construction des images d'histologie virtuelle HES. Le principe de la coloration SRH est illustré en **figure 3b** : il s'agit d'imiter de manière fictive la coloration HE/HES de manière à obtenir des images interprétables par des anatomopathologistes. Des tables de couleurs (LUT pour look up table en anglais) sont virtuellement assignées aux images morpho-chimiques d'intérêts :

- L'image SRS CH_2 renseignant sur la distribution des corps cellulaires et les structures riches en lipide se verra attribuée une table de couleur dans les teintes roses pour imiter la coloration cytoplasmique obtenue avec l'éosine.
- L'image SRS ($\text{CH}_3 - \text{CH}_2$) informant sur la distribution des noyaux se verra assignée une table de couleur dans les tons de violet pour imiter la coloration nucléaire obtenue avec l'hématoxyline.
- Enfin lorsque le SHG est également acquis, l'image SHG sera teinte en tons orangés pour reproduire la coloration du collagène par le safran.

Ces 3 images colorées sont finalement combinées pour un rendu final proche de celui observé à partir d'une coloration standard HE/HES d'une section tissulaire ; image pouvant alors être interprétée par un anatomopathologiste. Nous décrivons dans la section suivante comment implémenter un tel système capable d'acquérir des images SRH et les avancées technologiques récentes dans le domaine.

METHODE

Mise en œuvre expérimentale du SRH : Eléments indispensables à l'implémentation de la microscopie Raman Stimulée

La mise en œuvre d'une expérience de microscopie Raman cohérente ou de microscopie Raman stimulée nécessite d'avoir accès à deux sources d'excitation pulsées en régime picosecondes (10^{-12} s) ou femtosecondes (10^{-15} s). Ces sources, les champs Pompe et Stokes, E_{Pompe} et E_{Stokes} , de pulsation respective ω_p et ω_s , doivent délivrer des trains d'impulsions à un taux de répétition rigoureusement identique. Ceci pour que les impulsions arrivent strictement au même moment pour interagir avec l'échantillon : on parle de recouvrement temporel. Les faisceaux doivent également être focalisés au même endroit sur l'échantillon (recouvrement spatial). Ce recouvrement spatio-temporel est indispensable pour que le mélange à 4 ondes puisse se produire et activer le processus SRS. Comme décrit précédemment, lorsque $\omega_p - \omega_s = \Omega_R$, les processus CARS et SRS sont résonants avec le mode vibratoire moléculaire. *A contrario*, lorsque $\Omega_R \neq \omega_p - \omega_s$ les signaux sont faibles (cas du CARS) ou quasi nuls (cas du SRS) : la force de ces processus réside dans leur sélectivité chimique. Si l'expérimentateur désire mener des études spectroscopiques, ou sonder différents modes vibrationnels au sein d'un échantillon, il est nécessaire de pouvoir modifier la longueur d'onde d'une au moins des deux sources d'excitation (*i.e.* faire varier $\omega_p - \omega_s$). Pour ce faire, il est assez courant d'avoir recours à des oscillateurs paramétriques optiques (OPO). Un OPO est un dispositif qui possède un cristal non -linéaire dont les propriétés dépendent de la température et qui a la capacité de générer des nouvelles fréquences lorsqu'il est pompé par un faisceau laser. En modifiant la température du cristal, l'expérimentateur pourra contrôler la longueur d'ondes des faisceaux de sortie. En pratique lorsqu'un OPO est pompé par un laser vert à 515nm, le faisceau en sortie d'OPO peut être accordé entre 740nm et 980nm, ce qui permet d'accéder à toute la région spectrale 400-4000 cm^{-1} ce qui couvre l'ensemble de la gamme généralement scrutée en Raman spontané. Pour des études spectrales, on préfère généralement utiliser des impulsions picosecondes qui donnent une meilleure résolution spectrale (de l'ordre de quelques cm^{-1}) comparé aux impulsions femtosecondes.

Plusieurs montages sont possibles pour acquérir des images SRH. La **figure 3a** présente un des modèles courants. Ce montage permet d'acquérir le signal SHG et en parallèle d'adresser simultanément les deux liaisons CH_2 et CH_3 . Un laser de pompe, typiquement un laser ytterbium fibré (Yb), délivre des pulses picosecondes

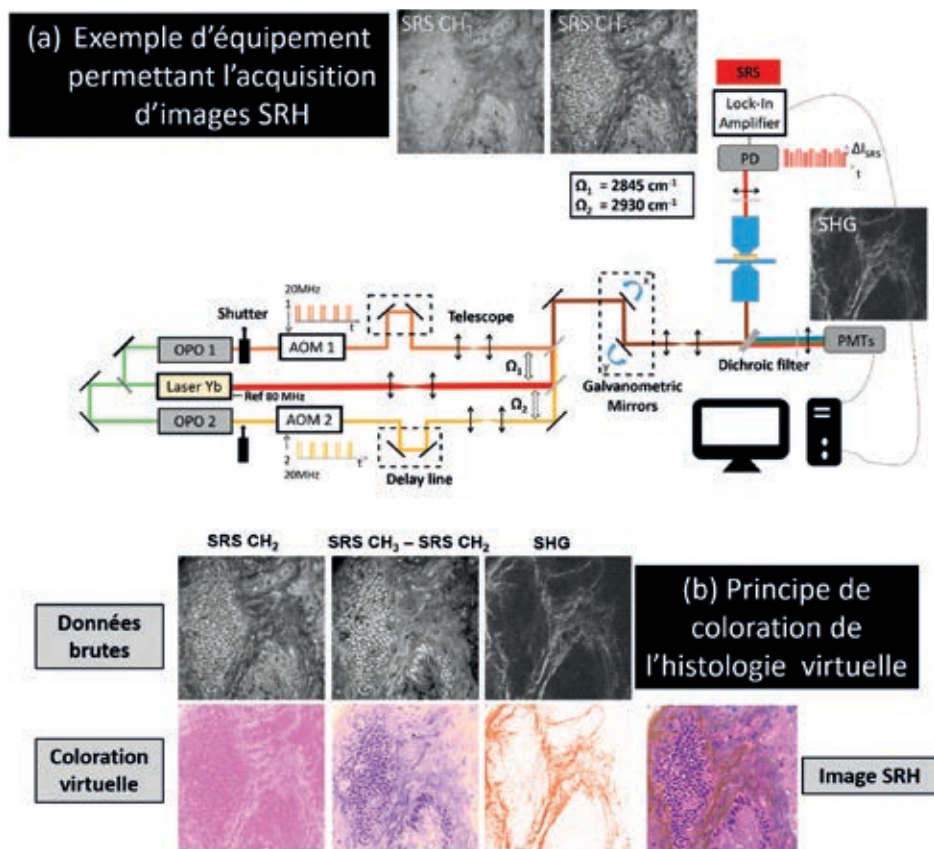


Figure 3 : (a) Exemple de montage utilisé pour l'acquisition d'images SRH : AMO : acousto-optique modulateur, OPO : oscillateur paramétrique optique, delay line : ligne à retard, PD : photodiode, PMT : tube photomultiplicateur. Les lignes sortant des OPO sont modulées en fréquence grâce aux AOM. Les lignes à délais assurent le recouvrement temporel. L'unité de miroirs galvanométriques permet de scanner pixel par pixel l'échantillon. Le signal de seconde harmonique (SHG) est détecté en réflexion (épi détection) par le PMT tandis que les signaux Raman (SRS) sont détectés en transmission sur la photodiode. La détection synchrone (lock-in amplifier) permet d'extraire par démodulation ces signatures Raman. (b) Principe de coloration de l'histologie virtuelle : trois images acquises grâce à des contrastes d'optique non-linéaire sont nécessaires : la distribution du signal SRS CH₂, l'image soustraite entre la distribution de signal SRS CH₃ et la distribution de signal SRS CH₂ et l'image SHG. L'image SRS CH₂ donne la distribution des corps cellulaires riches en lipides tandis que l'image 'soustraite' donne la distribution des noyaux ainsi que des protéines. L'image SHG révèle quant à elle l'agencement des fibres de collagène. Des tables de couleurs sont attribuées à ces trois images pour imiter la coloration HES et obtenir l'image SRH d'histologie virtuelle.

à 1031 nm avec un taux de répétition élevé (80MHz). Ce laser est utilisé d'une part pour créer le champ Stokes E_{Stokes} et d'autre part pour pomper deux oscillateurs paramétriques optiques (OPO) après passage dans une unité de doublement de fréquence (515nm). Les longueurs d'ondes en sortie des deux OPOs (OPO1 et OPO2) constituent les champs Pompes $E_{\text{Pompe 1}}$ et $E_{\text{Pompe 2}}$ et sont fixées de manière à adresser simultanément les deux raies spectrales qui nous intéressent $\Omega_1 = 2845\text{cm}^{-1}$ et $\Omega_2 = 2930\text{cm}^{-1}$ (i.e. ici $\lambda_{\text{Pompe 1}} = 797.3\text{nm}$ et $\lambda_{\text{Pompe 2}} = 792.2\text{nm}$). Ces faisceaux Pompes passent ensuite à travers des modulateurs acousto-optiques (AOMs) qui assurent leur modulation. Des lignes à retard sont placées sur le chemin optique des faisceaux Pompes pour pouvoir ajuster, grâce à un couple de miroirs, la longueur de leurs trajets optiques et ainsi garantir le recouvrement temporel. Des systèmes de lentilles (télescopes) garantissent la collimation des faisceaux nécessaires au recouvrement spatial. Un miroir dichroïque combine les trois faisceaux avant l'entrée du microscope. Un couple de miroirs galvanométriques permet de balayer le point de focalisation dans les directions latérales x et y tandis que de fins déplacements axiaux (en z) de l'objectif s'effectuent grâce à un piézo-électrique. Ceci rend possible l'acquisition d'images tridimensionnelles avec une résolution en dessous du micromètre. Les faisceaux d'excitations sont focalisés sur l'échantillon par un objectif de grande ouverture numérique ($\text{NA} > 1$) tandis qu'un condenseur transmet le signal vers les détecteurs de SRS. Des filtres de forte densité optique permettent de sélectionner les longueurs d'ondes d'intérêt devant les différents détecteurs. Le signal de SHG est collecté en Epi (réflexion) grâce à un photomultiplicateur tandis que les signaux SRS sont collectés en transmissions grâce à une photodiode reliée à une détection synchrone (**Figure 3a**). Les puissances généralement utilisées sont de l'ordre de quelques dizaines de milliwatts sur l'échantillon.

Innovations récentes

Les montages décrits ci-dessus, avec notamment l'utilisation d'OPO sont très performants :

- Ils donnent accès à des centaines de mW sur l'échantillon
- Ils fournissent une grande flexibilité d'investigation spectrale idéale pour la recherche
- Ils génèrent des images de bonne qualité (peu bruitées)

Cependant leur prix, on parle ici de plusieurs centaines de milliers d'euros, et leur encombrement (plusieurs m^2) limitent leur utilisation routinière dans un environnement hospitalier.

La communauté scientifique ainsi que les industriels ont activement œuvré ces dernières années (parfois en collaboration), pour apporter des solutions technologiques susceptibles d'être compatibles avec les exigences du milieu médical. Ainsi, des solutions compactes commencent à voir le jour (voir **Figure 6d**). Certains développent un microscope deux couleurs Raman Cohérent et se sont orientés vers une miniaturisation des optiques en utilisant un système de filtrage optique astucieux [9] (BondXplorer, Lightcore Technologies). D'autres se sont tournés vers des solutions lasers fibrées [10] [11], moins onéreuses mais plus bruitées, qui permettent de délivrer des trains d'impulsion Pompe et Stokes synchronisés (Invenio Imaging, Refine laser system) [7]. Nous y reviendrons dans la partie discussion.

RESULTATS

Avènement du SRH : application aux tumeurs du système nerveux central

C'est en 2017 que le terme d'histologie Raman Stimulée a vu le jour, lors de la parution d'une vaste étude américaine [7]. Dans cette étude très complète, l'équipe s'est efforcée d'aborder plusieurs aspects : technologique, quantitatif et digital pour apporter la technologie SRS au cœur de l'hôpital, au plus près des patients où son potentiel pouvait être exploité. L'équipe présente un système SRS compact compatible avec le milieu hospitalier et placé près du bloc opératoire. Elle propose pour la première fois, une méthode de coloration pour imiter l'histologie standard et fournir des images d'histologie virtuelle à partir des images SRS. Elle présente une étude menée en aveugle sur un large échantillonnage (>100 échantillons) d'échantillons frais et propose une première version d'aide au diagnostic grâce à de l'intelligence artificielle (IA) à partir des données SRH.

L'équipe s'intéresse aux tumeurs du système nerveux central (SNC). En neurochirurgie, il est courant que le chirurgien ait recours à un examen histopathologique per-opératoire, afin de guider son geste au cours de l'intervention. Une biopsie est alors envoyée au service d'anatomopathologie qui procédera à un examen rapide, dit examen extemporané (coloration HE de lames d'étalement ou de sections de tissus cryogénisés). Le protocole expérimental est le suivant : des images SRH (virtuellement teintées) ou résultant de coloration HE standard sont envoyées à un panel de 3 anatomopathologistes, issus d'institutions différentes. Pour simuler les

situations réelles, un bref historique clinique du patient est également fourni. Les praticiens devaient comme ils le feraient dans leur routine anatomopathologique :

- Identifier la présence ou non de lésions
- Définir l'origine gliale ou non-gliale de ces lésions (dans le cas de lésions présentes)
- Préciser le statut, le grade ou le sous type histologique d'une pathologie.

Pour une trentaine de cas (lorsque les tailles des biopsies excisées le permettaient) des sections cryogéniques étaient pour moitié imagées par SRH et pour moitié imagées en HE extemporané en parallèle. Ils devaient alors également évaluer, en comparant les images SRH et HE issus du même patient, s'ils pouvaient retrouver le même niveau d'informations cytologiques sur les images SRH que sur l'examen clinique de diagnostic intra opératoire classique de HE. Les diagnostics anatomopathologiques posés à partir des images SRH puis ceux prédits par l'IA (à partir des images SRH) étaient ensuite confrontés aux diagnostics extemporanés HE classiques. L'étude utilise le coefficient de Kappa (coefficient qui mesure le degré de concordance entre deux évaluateurs, par rapport au hasard) pour mesurer l'efficacité du SRH. Ils rapportent une excellente concordance dans les diagnostics SRH et HE pour un large panel de type de tumeur du SNC étudiée (gliome de bas et haut grade, méningiome, lymphome, adénome hypophysaire, adénocarcinome...). Dans 98% des cas l'identification de la présence ou non de lésions put se faire grâce au SRH. Les tumeurs gliales ont pu être distinguées des tumeurs non-gliales avec 100% de réussite tandis que le diagnostic final fut prédit correctement à plus de 92% avec le SRH. Les auteurs expliquent ensuite d'où peuvent provenir les rares erreurs de diagnostic basées sur les images SRH, au cas par cas. Ils rapportent également des résultats très prometteurs de l'IA. Si les diagnostics des anatomopathologistes entre eux étaient généralement concordants, ce domaine reste dépendant du praticien. Implémentée correctement, une aide au diagnostic informatique robuste pourrait pallier à ce problème et diminuer les risques de mauvaise lecture de lame qui peuvent être parfois lourdes de conséquences pour le patient.

L'équipe met également en avant le bénéfice d'obtenir en quelques minutes des images histologiques virtuelles digitalisées. Dans un monde de plus en plus connecté, pouvoir interagir en direct avec un spécialiste à distance (à l'autre bout de la ville ou à des milliers de kilomètres) pourrait s'avérer très avantageux pour le chirurgien et pour le patient. Cette étude conséquente a dévoilé le potentiel du SRS pour le milieu hospitalier et ouvre la voie à une toute nouvelle discipline : l'histologie virtuelle. Pour de plus amples informations le lecteur pourra se référer à [7].

Le SRH appliqué au système gastrique

Par la suite, le SRH fut appliqué au système gastrique [8]. Dans une étude à plus petite échelle, les auteurs démontrent qu'il est possible de combiner des images de SRS avec des images de SHG pour imiter la coloration hématoxyline, éosine, safran (HES). Pour les pathologies du système gastrique l'étude de l'agencement des fibres de collagène est importante : elle permet de visualiser la trame et l'architecture d'une muqueuse. Le développement d'une prolifération tumorale est associé à une désorganisation architecturale : le stade de développement de la fibrose joue un rôle prépondérant dans l'évolution de la tumeur et participe au diagnostic final. Dans cette étude, des pièces issues de chirurgies sont divisées. Une petite partie est extraite pour imiter une biopsie et montée pour obtenir des coupes de tissu cryo-sectionnées. Cette cryosection est imagée en SRH tandis que le reste de la pièce suit la routine histopathologique normale. Ce protocole permet d'avoir accès aux images d'histologie virtuelle SRH et d'HES conventionnelle du même patient et ainsi de valider les diagnostics SRH obtenus. En accord avec les travaux de 2017 [7], la concordance rapportée entre SRH et HES est très bonne. Dans chacun des cas étudiés (colon sain, dysplasie de bas grade, adénocarcinome du colon, pancréas sain, adénocarcinome du pancréas) l'anatomopathologiste, en prenant en compte l'architecture générale du tissu et les informations cytologiques et nucléiques, a été en mesure de retrouver les éléments indispensables pour poser le bon diagnostic. Ainsi, l'aspect des glandes de Lieberkühn allongées et dénuées de vacuoles associé à la pseudo stratification des noyaux cellulaires ont permis d'identifier une dysplasie de bas grade (stade pré-cancéreux). L'identification d'un important stroma, caractérisé par la présence importante de fibres de collagène témoignait d'une désorganisation architecturale ; cette réaction stromale était développée autour de glandes dénuées de lumière, de tailles variables, orientant le diagnostic vers une tumeur infiltrante dans le cas de l'adénocarcinome (voir **Figure 4a**). La présence de cellules nécrotiques et de nucléoles sur l'image SRH renforçaient ce diagnostic.

L'évaluation de l'adénocarcinome du pancréas est assez démonstrative pour illustrer la similarité de recherche d'indices sur les deux images SRH et HE. Il est assez délicat de distinguer une inflammation du pancréas (pancréatite), d'une tumeur.

Pour discriminer une tumeur, le praticien recherche des anomalies cyto-nucléaires tel un noyau plus volumineux, un rapport nucléocytoplasmique augmenté, un hyperchromatisme, un polymorphisme nucléaire ou une anisocaryose (variation de la taille des noyaux). Dans le cas de l'image SRH il put trouver au sein d'une même

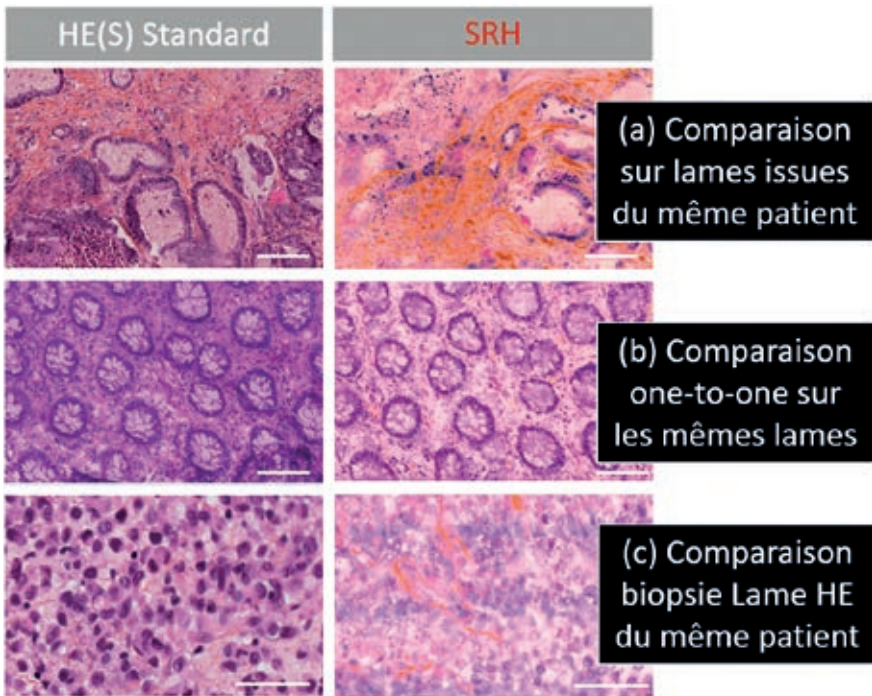


Figure 4 : Comparaison HES (colonne de gauche) /SRH (colonne de droite): (a) Comparaison lame à lame (lames différentes même patient), (b) comparaison SRH/HES sur les mêmes lames (comparaison dite "one-to-one"), (c) Comparaison SRH sur biopsie et HES sur lame issues du même patient. Images tirées et adaptées de [8], pour (a), et de [12] pour (b) et (c). Barre d'échelle : 100µm.

petite glande une cellule contenant un nucléole et une cellule hyperchromatique. Dans le cas de l'image HE standard, il s'agissait d'un nerf encapsulant deux glandes de petite taille. Cette recherche d'anomalies démontre l'intérêt de développer une technologie qui permettrait en direct d'explorer l'échantillon à la recherche de tels indices.

Comparaison "one-to-one" : une preuve de concept

Après la publication des premières études SRH, une problématique est apparue : dans quelle mesure les images d'histologie virtuelle sont équivalentes à l'histologie standard ? Voit-on réellement les mêmes informations sur une image SRH et sur une lame histologique HE classique ? Pour répondre à ces questions un nouveau

protocole fut élaboré [12] : dans cette étude, des cryo-sections sont imagées d'abord en SRH (sans marquage) puis colorées en HE rapide. Ce protocole permet d'avoir accès aux images histologiques virtuelles SRH et HE standard des mêmes tissus et de comparer les images aux mêmes endroits. On s'intéresse prioritairement à l'aspect des noyaux qui regorgent d'informations essentielles à un bon diagnostic : en effet leur concentration, leur contenu, taille et forme sont à analyser précautionneusement pour délivrer un diagnostic précis. Aussi, un premier cas étudié est une inflammation de muqueuse d'estomac, qui possède une distribution de noyaux de forme et taille variées, plus concentrée qu'une muqueuse d'estomac sain. Une LUT dans les tons roses ou oranges pouvait être appliquée à l'image de SHG (distribution de collagène) pour obtenir au choix, une image virtuelle HES ou HE. Le second cas permettant de calculer la correspondance SRH/HE exacte. La confrontation des résultats révéla pour chaque cas une correspondance quasi parfaite entre les images SRH et HE avec un coefficient de corrélation de 0.80. Pour les autres cas présentés, muqueuse de colon sain et adénocarcinome de colon, la zone imagée en SRH s'intègre parfaitement dans la lame HE, celle-ci étant délimitée et détectable grâce à la coloration safran des fibres de collagène.

A ce stade, il est légitime de se demander l'intérêt du SRH pour le domaine gastrique : si l'on comprend aisément l'intérêt de limiter la quantité de tissu prélevé pour les tumeurs du système nerveux central [13] (prélèvements stéréotaxiques et recherche de marge), ce problème est moins vrai dans le domaine gastrique. En revanche, la technique SRH trouve sa place dans le domaine chirurgical, lors de l'exploration per opératoire d'une chirurgie carcinologique. En effet, avant toute résection tumorale, le premier temps opératoire consiste en une exploration de la cavité péritonéale et du foie pour rechercher une localisation métastatique qui contre-indiquerait la chirurgie. Appliqué à des pathologies du système nerveux central, le "one-to-one" révéla aussi une bonne correspondance SRH/HE et de nouvelles études continuent d'être publiées dans le domaine de la neurologie [14]. Ces études sont encourageantes pour convaincre la communauté médicale de l'intérêt de la technologie SRH comme outil de diagnostic rapide.

Compatibilité du SRH avec les examens d'immunohistochimie et de profil génomique

L'étude précédente [12] pointe aussi les effets de déformations secondaires dues au processus de cryogénéisation et de coupes qui peuvent altérer le tissu et modifier l'aspect morphologique (voir l'aspect des vacuoles du colon sain déformées en

Figure 4b) entravant parfois le diagnostic. Cela souligne la nécessité de s'affranchir de cette étape chronophage de congélation et de coupe, altérant le tissu pour travailler sur tissu frais ou directement sur le patient (en parallèle des équipes travaillent activement au développement de microscopes intra opératoires [15] ou de sondes endoscopiques flexibles [16] qui permettraient de tels examens). Lors des études exposées précédemment, le tissu imagé en SRH était 'sacrifié' (écrasé entre lame et lamelle lors des études « smear » ou en cryo-section). On se demande ici si l'on ne pourrait pas réutiliser l'échantillon imagé en SRH en travaillant sur biopsies peu écrasées ? La microscopie SRH ne nécessitant aucune préparation particulière de l'échantillon, les contrastes SHG et SRS résultant uniquement de l'interaction des impulsions des champs incidents avec les tissus biologiques (sans marquage), les échantillons peuvent être montés entre lamelles de verre et démontés post imagerie SRH. Dans ce cas, dans quelles mesures peut-on réutiliser l'échantillon pour réaliser un examen anatomopathologique conventionnel ? Si aucune altération ne semble présente aux niveaux macro et microscopiques, se peut-il que l'échantillon soit altéré au niveau moléculaire dû à l'interaction lasers/échantillon ?

Dans une publication récente notre équipe s'est intéressée à ce problème [12]. Dans cet article une biopsie fraîche « épaisse » (5x5mm²) est imagée en SRH juste après excision et le diagnostic SRH confronté au diagnostic HE normal.

Dans les deux cas, le nombre de nucléoles présents, l'identification du ratio cytosol/noyau, ainsi que la grande diversité dans la taille et la forme des noyaux permirent de conclure à un adénocarcinome peu différencié (**Figure 4c**). Dans une autre étude [13], on propose de réutiliser les biopsies imagées en SRH pour mener des études d'immunohistochimie et de profil génomique post-imagerie SRH dans le cadre d'un examen de routine histopathologique conventionnel (échantillon témoin fixé qui n'avait pas subi d'imagerie SRH) menée en parallèle. La **figure 5** illustre les résultats obtenus. Les échantillons imagés en SRH, des biopsies fraîches de quelques mm³, étaient montés entre deux lamelles de verre séparés par un « spacer » de 500µm d'épaisseur, qui permet de limiter la déformation des échantillons et leur récupération post imagerie. Sur la **figure 5a**, on peut voir que l'imagerie SRH n'impacte pas l'aspect morphologique du tissu (HE), et n'altère pas non plus l'échantillon au niveau moléculaire. Dans les deux cas (avec et sans imagerie SRH), une prolifération diffuse de cellules gliales pléomorphes associée à la présence de noyaux atypiques permet de retenir le diagnostic de gliome de haut grade. La nature gliale de la tumeur put dans les deux cas être confirmée par les tests d'immunohistochimie (expression de la protéine acide fibrillaire gliale GFAP

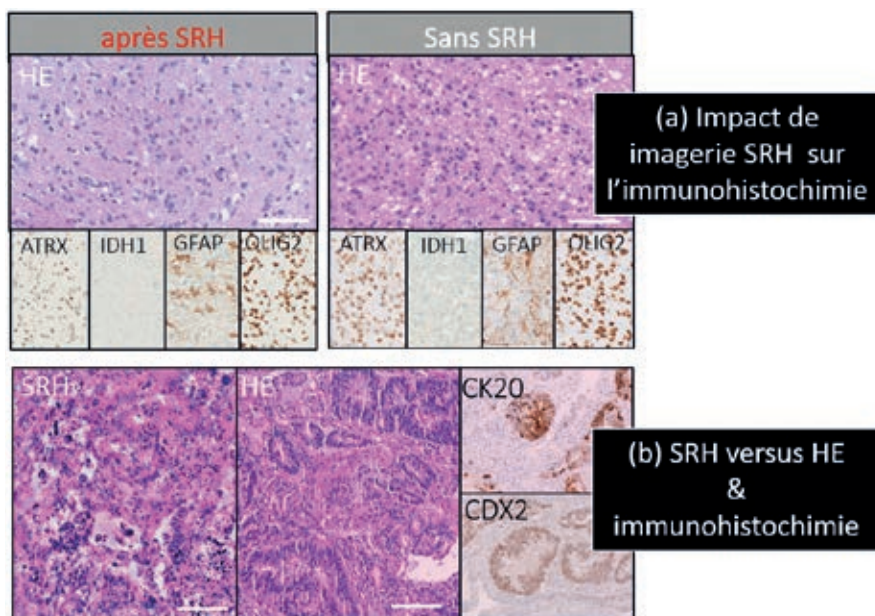


Figure 5 : SRH versus HE : impact de l'imagerie SRH sur l'échantillon. (a) Comparaison de lames HE et lames d'immunohistochimie après imagerie SRH (à gauche) avec un échantillon témoin issu du même patient, non imagé en SRH (à droite). (b) Images SRH et immunohistochimie d'un échantillon tumoral du CNS (adénocarcinome du colon) comparés à l'histologie HE et immunohistochimie d'un échantillon témoin issu du même patient. Image tirée et adaptée de [13] pour (a) et de [17] pour (b). Barre d'échelle : 100µm.

et du facteur de transcription oligodendrogliale OLIG2) tandis que la mutation IDH1 était absente dans les deux cas (absence d'immunomarquage avec l'anticorps ciblant la protéine mutante IDH1 R132H). Enfin dans les deux cas l'expression nucléaire de la protéine ATRX était conservée confirmant une absence d'altération du gène ATRX (alpha-thalassemia/mental retardation, X-linked). Le séquençage du génome révéla également des résultats similaires avec dans les deux cas (avec et sans imagerie SRH), une mutation du promoteur de TERT (NM_198253:2:c.1-146C>T) sans altération des autres séquences génomiques analysées. Ainsi l'imagerie SRH ne semble pas impacter l'échantillon ni au niveau moléculaire ni au niveau génomique (pas d'ajout de mutations). Ce premier résultat est une preuve de concept qui exige des études de plus grande envergure pour le confirmer. Une étude à plus large échelle sur différentes pathologies du système nerveux central vient d'être publiée et renforce ces conclusions [17].

DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans cet article nous avons posé les bases de la spectroscopie Raman spontanée, introduit des techniques d'optique non linéaires et présenté leurs avantages, pour en arriver à la présentation d'une technique novatrice basée sur la diffusion Raman Stimulée : l'Histologie Raman Stimulée (SRH). Rapide, sans marquage et ne nécessitant aucune préparation préalable, le SRH produit en quelques minutes des images histologiques de qualité colorées digitalement. Nous nous sommes appuyés sur des résultats publiés par différents groupes (dont le nôtre) pour démontrer le potentiel de l'imagerie SRH et montrer comment cette technologie pourrait apporter un changement méthodologique à l'hôpital en permettant de réaliser une image de qualité histologique en quelques minutes. Par ailleurs, la technique SRH tire partie des progrès récents en intelligence artificielle avec notamment une aide instantanée au diagnostic et des images numérisées. La correspondance quasi-parfaite entre l'imagerie SRH et l'histologie HES (hematoxylin eosin safran) sur les premiers échantillons d'abord imagés en SRH puis colorés en HES est une démonstration forte que le SRH pourrait *in fine* se substituer à l'examen HE lors des consultations intra-opératoires. Nous avons par ailleurs montré que l'imagerie SRH est non destructrice et peut s'appliquer directement sur des biopsies fraîchement excisées, ce qui permet de s'affranchir des artéfacts secondaires dûs à la congélation et à la coupe, susceptibles de modifier l'aspect morphologique des échantillons congelés. Nous avons également démontré que l'imagerie SRH n'altère pas l'échantillon ni au niveau microscopique, ni aux niveaux protéique et génomique. Ceci fait du SRH une technologie *a priori* compatible avec l'examen anatomopathologique complet (**Figure 6**). Des études à plus grande échelle sont néanmoins nécessaires pour valider ces résultats encourageants sur un plus grand nombre d'échantillons.

Avec l'apparition de solutions compactes développées ces dernières années (**Figure 6d**), les études SRH se font plus nombreuses. Avoir la possibilité de réaliser un suivi "histologique virtuel", en se déplaçant en direct sur un échantillon biologique sans le perturber, pourrait s'avérer très bénéfique pour le suivi de croissance cellulaire : on pense notamment ici au suivi de croissance d'organoïdes ou de sphéroïdes, sujet d'intérêt grandissant dans les hôpitaux, qui vise à implémenter une médecine plus personnalisée. Enfin l'imagerie SRH étant une imagerie chimique il serait passionnant d'aller explorer l'imagerie SRH dans la région spectrale des empreintes ("fingerprint" en dessous de 1800cm^{-1}) qui foisonne de raies Raman. Ceci est en particulier possible avec le système BondExplorer

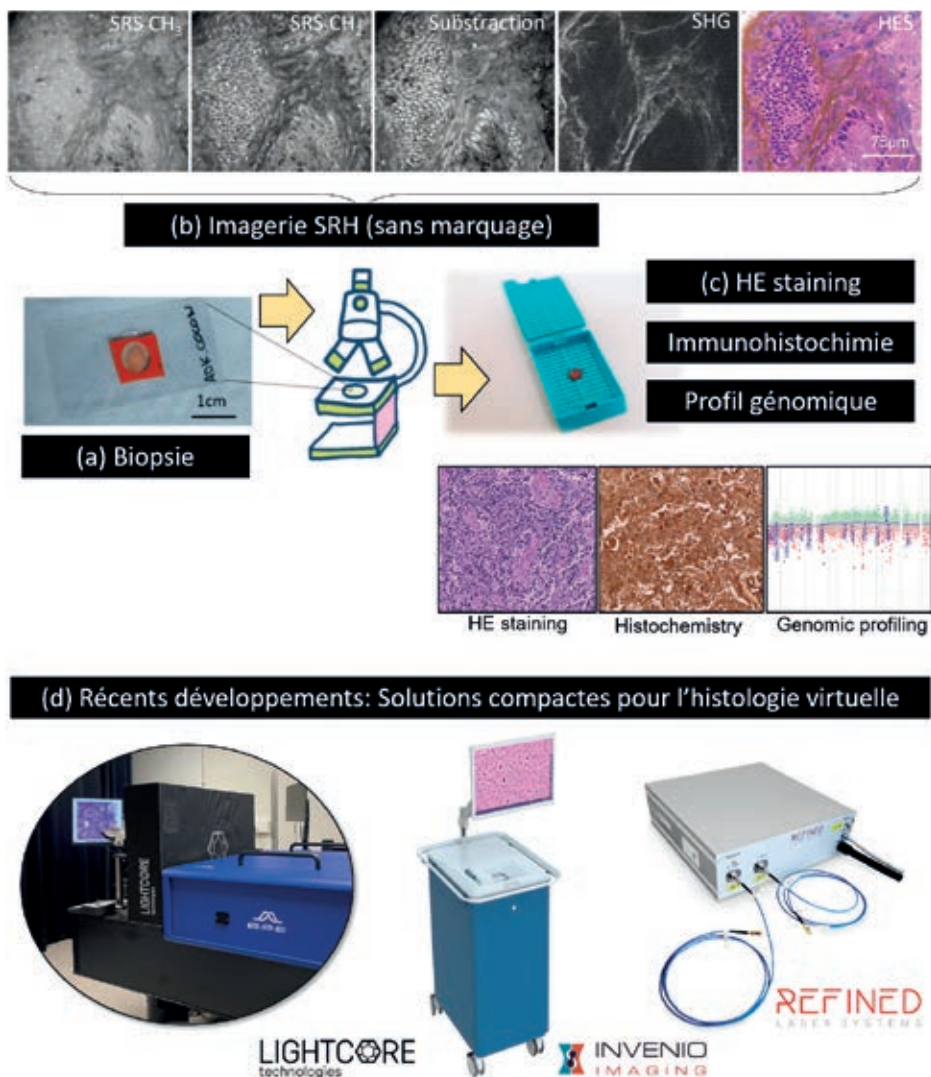


Figure 6 : (a) Un tissu frais (biopsie) issue de chirurgie est monté entre deux lamelles de verres et placée sur le microscope SRH. (b) Les contrastes d'optique non-linéaire permettent d'obtenir en temps réel une image histologique et de faire une investigation dans les trois directions de l'espace, (c) L'échantillon réintègre le 'flux' d'histopathologie et peut être réutilisé pour des tests complémentaires- tests d'immunohistochimie et de profil génomique. (d) Quelques exemples de solutions commerciales compactes développées ces dernières années pour l'histologie virtuelle. Image tirée et adaptée de [17] pour (c).

développé par la société Lightcore technologies. La **figure 6d** présente quelques solutions compactes commercialement disponibles permettant de telles études. On notera en particulier le système BondExplorer de Lightcore Technologies déjà cité et le dispositif portable de Invenio Imaging qui a déjà fait ses premières entrées à l'hôpital. Par ailleurs il y a fort à parier que de nouveaux lasers fibrés seront en mesure de s'intégrer dans la technologie SRH, les sociétés Invenio Imaging et Refined Laser Systems commercialisent déjà de tels systèmes. La technologie ne cessant de s'améliorer, ces exemples on l'espère ne sont que les précurseurs de ce que seront demain les outils utilisés à l'hôpital dans les domaines de la chirurgie et de l'oncologie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. RIGNEAUTL H & BERTO P. Tutorial : Coherent Raman light matter interaction processes, *APL Photonics*, 2018, **3**, 091101.
2. NAN X, YANG W Y & XIE X S. CARS microscopy lights up lipids in living cells., *Biophotonics Int.*, 2004, **11** (8), 44-47.
3. FREUDIGER C W, MIN W, SAAR B G, LU S, HOLTOM G R, HE C, TSAI J C, KANG J X & XIE X S. Label-Free Biomedical Imaging with High Sensitivity by Stimulated Raman Scattering Microscopy, *Science*, 2008, **322** (5909), 1857–1861.
4. EVANS C L & XIE X S. Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Chemical Imaging for Biology and Medicine, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 2008, **1** (1), 883–909.
5. WINTERTHALDER M J & ZUMBUSCH A. Beyond the borders - Biomedical applications of non-linear Raman microscopy, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2015, **89**, 135–144.
6. JI M, ORRINGER D A, FREUDIGER C W, RAMKISSOON S, LIU X, LAU D, GOLBY A J, NORTHON I, HAYASHI M, AGAR N Y R, YOUNG GS, SPINO C, SANTAGATA S, CAMELO-PIRAGUA S, LIGON K L, SAGHER O & XIE X S. Rapid, Label-Free Detection of Brain Tumors with Stimulated Raman Scattering Microscopy, *Sci. Transl. Med.*, 2013, **5** (201), pp. 201ra119-201ra119.
7. ORRINGER D A, PANDIAN B, NIKNAFS Y S, HOLLON T C, BOYLE J, LEWIS S, GARRARD M, HERVEY-JUMPER S L, GARTON H J L, MAHER C O, HETH J A, SAGHER O, WILKINSON D A, SNUDERL M, VENNETI S, RAMKISSOON S H, MC-FADDEN K A, FISHER-HUBBARD A, LIEBERMAN A P, JOHNSON T D, XIE X S, TRAUTMAN J K, FREUDIGER C W & CAMELO-PIRAGUA S. Rapid intraoperative histology of unprocessed surgical specimens via fibre-laser-based stimulated Raman scattering microscopy, *Nat. Biomed. Eng.*, 2017, **1** (27).

8. SARRI B, CANONGE R, AUDIER X, SIMON E, WOJAK J, CAILLOL F, CADOR C, MARGUET D, POIZAT F, GIOVANNINI M & RIGNEAULT H. Fast stimulated Raman and second harmonic generation imaging for intraoperative gastro-intestinal cancer detection, *Sci. Rep.*, 2019, **9** (7), 10052.
9. HEUKE S, RIMKE I, SARRI B, GASECKA P, APPAY R, LEGOFF L, VOLZ P, BÜTTNER E & RIGNEAULT H. Shot-noise limited tunable dual-vibrational frequency stimulated Raman scattering microscopy, *Biomed. Opt. Express*, 2021, **12** (12), 7780–7789.
10. FREUDIGER C W, YANG W, HOLTOM G R, PEYGHAMBARIAN N, XIE X S & KIEU K Q. Stimulated Raman scattering microscopy with a robust fibre laser source, *Nat. Photonics*, 2014, **8** (2), 153–159.
11. XU C & WISE F. Recent advances in fibre lasers for nonlinear microscopy, *Nat. Photonics*, 2013, **7**, 875–882.
12. SARRI B, POIZAT F, HEUKE S, WOJAK J, FRANCHI F, CAILLOL F, GIOVANNINI M & RIGNEAULT H. Stimulated Raman histology : one to one comparison with standard hematoxylin and eosin staining, *Biomed. Opt. Express*, 2019, **10** (10), 5378–5384.
13. SARRI B, APPAY R, HEUKE S, POIZAT F, FRANCHI F, BOISSONNEAU S, CAILLOL F, DUFOUR H, FIGARELLA-BRANGER D, GIOVANNINI M & RIGNEAULT H. Observation of the compatibility of stimulated Raman histology with pathology workflow and genome sequencing, *Transl. Biophotonics*, 2021, **3** (3), e202000020.
14. EINSTEIN E H, ABLYAZOVA F, ROSENGERG A, HARSHAN M, WAHL S, HAR-EL G, CONSTANTINO P D, ELLIS J A, BOOCKVAR J A, LANGER D J, D'AMICO R S. Stimulated Raman histology facilitates accurate diagnosis in neurosurgical patients: a one-to-one noninferiority study, *J. Neuro-Oncology*, 2022, **159** (2), 369–375.
15. KILLORY B D, NAKAJI P, GONZALES L F, PONCE F A, WAIT S D & SPETZLER R F. Prospective evaluation of surgical microscope-integrated intraoperative near-infrared indocyanine green angiography during cerebral arteriovenous malformation surgery, *Neurosurgery*, 2009, **65** (3), 456–62.
16. LOMBARDINI A, MYTSKANIUK V, SIVANKUTTY S, ANDRESON E R, CHEN X, WENGER J, FABERT M, JOLY N, LOURADOUR F, KUDLINSKI A & RIGNEAULT H. High-resolution multimodal flexible coherent Raman endoscope, *Light Sci. Appl.*, 2018, **7** (10).
17. APPAY R, SARRI B, HEUKE S, BOISSONNEAU S, LIU C, DOUGY E, DANIEL L, SCAVARDA D, DUFOUR H, FIGARELLA-BRANGER D & RIGNEAULT H. Live Stimulated Raman Histology for the Near-Instant Assessment of Central Nervous System Samples, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2023, **127** (16), 3624-3631.