

Un microscope holographique 4D

# D'une technologie de recherche à un instrument de mesure

par Alfons Calders

La spin off OVIZIO, fondée en 2009, est issue du groupe des Facultés des Sciences appliquées, service de Chimie Physique de l'ULB. Parmi les fondateurs, on trouve le management, le fonds d'investissement Theodorus II et la SRIB (Société régionale d'investissement de Bruxelles). Cette entreprise commercialise la technologie brevetée du professeur Frank Dubois portant sur la microscopie par holographie numérique.

Dès sa création, la spin off a passé commande chez WOW Technology de Naninne pour convertir le prototype scientifique en un équipement de laboratoire industriel destiné à l'industrie des sciences de la vie (pharmacie, biotechnologie). Cet équipement est aujourd'hui réalisé et plusieurs exemplaires ont déjà été vendus.

L'entreprise signe là sa seconde belle performance de l'année. Elle est en effet l'une des premières entreprises de la Région de Bruxelles-Capitale à voir un projet subsidié dans le cadre du 6<sup>ème</sup> appel à projets du Plan Marshall.

Industrie Technique & Management est allé découvrir cette nouvelle technologie et a rencontré Serge Jooris, CTO chez Ovizio Imaging Systems ainsi que Pascal Debrue et Alexandre Debatty, tous deux responsables projets chez WOW Technology.

## LA MICROSCOPIE 3D

Lorsqu'on réalise un examen avec un microscope 2D classique, seule une partie de l'échantillon est nette : celle qui se trouve dans le plan focal de l'objectif du microscope alors que le reste est flou en dehors de la profondeur de champ de l'objectif. Aussi, un échantillon transparent ou translucide est invisible. La microscopie holographique apporte une solution à ces deux limitations : elle permet de voir des objets transparents et offre une profondeur de champ étendue allant jusqu'à cent fois au delà de celle d'un microscope classique.

Il s'agit de créer une image 3D avec un rayon laser que l'on envoie sur une puce de caméra CCD. Le rayon laser (un faisceau lumineux d'une longueur d'onde unique et où tous les photons sont en phase) est divisé en deux directions via un *beam-splitter* (un miroir semi-opaque). Une partie

du faisceau est envoyé (par des miroirs) sur la puce CCD, l'autre partie passant d'abord par un échantillon transparent (une culture cellulaire par exemple) avant d'être envoyée vers la puce CCD. Également via des miroirs, mais de manière telle que les deux directions gardent une longueur identique.

Le faisceau lumineux qui passe par l'échantillon subit un retard. Ce retard va différer selon l'emplacement du faisceau dans l'échantillon. Cela va dépendre de la présence ou non d'une cellule – de son indice de réfraction et de son épaisseur – à cet endroit-là. Le capteur CCD consiste en un nombre élevé de récepteurs lumineux. Chaque récepteur réceptionne la composition du faisceau lumineux direct et celle du faisceau ralenti. Les glissementsphasés de tous les récepteurs sont traduits en une image 3D via un logiciel. En d'autres termes, les glissementsphasés mesurés, qui sont les retards mesurés par le récepteur, sont convertis en épaisseurs locales. On obtient alors une image 3D des cellules présentes dans l'échantillon : leurs formes, et tant leurs profils que leur hauteur.



La spin off OVIZIO commercialise aujourd'hui la technologie brevetée du professeur Frank Dubois, portant sur la microscopie par holographie numérique.

## ANALYSE DE CELLULES

Dans le cas du microscope 4D d'OVIZIO l'échantillon est, par exemple, un tube étroit dans lequel passe des cellules. La mesure est continue. On obtient alors une image 3D de particules (avec une résolution de 200 nm, le pouvoir séparateur d'un microscope lumineux) tel un film sur la durée. Voilà pourquoi on parle de microscope 4D.

Cela permet d'étudier un bio-échantillon (une culture de cellules par exemple) et de voir s'il y a des cellules présentes, si elles

sont mortes ou vivantes et de quelle taille. À partir d'une culture de cellules dans un réacteur (la base de la thérapie génique, notamment), on peut voir si la culture se développe de manière satisfaisante. Pour calculer mathématiquement les bonnes mesures des cellules, il faut connaître l'indice de réfraction de la solution et des cellules. Néanmoins, l'image 3D montre des cellules en proportionnalité entre elles, ce qui permet de voir par exemple si on a des cellules vivantes qui se développent bien.

### UNE TECHNOLOGIE OBSOLETE DANS UN EMBALLAGE MODERNE ?

Cette technique de mesure, qu'on peut comparer à la cytométrie en flux, n'est pas nouvelle. Elle a été inventée par Denis Gabor en 1947 et des appareils de mesure pour laboratoires étaient disponibles sur le marché. Néanmoins, ceux-ci ne donnaient pas entière satisfaction.

Le problème était double. D'une part, il n'y avait pas jadis la technologie d'aujourd'hui. Il y avait le coût d'une puce CCD et surtout, la puissance informatique: jusqu'à ces dernières années, il fallait compter, pour un échantillon, quatre heures de calcul, voire plus, pour obtenir une image 3D. Aujourd'hui, avec les puces CCD actuelles (financièrement abordables et beaucoup plus puissantes) et la puissance de calcul de la technologie informatique *state-of-the-art* (les FPGA, processeurs multicore,...), on peut quasiment faire de la microscopie 4D en temps réel.

D'autre part, le concept original présentait un problème fondamental. On utilisait à l'époque un faisceau laser lumineux pur. Le puissant rayon laser qui traversait l'échantillon ne passait pas totalement par les cellules. Une partie était réfléchi sur les parois des cellules, ce qui faisait naître une lumière diffuse qui interférait avec les récepteurs lumineux aux alentours. Avec un rayon laser plus

pur, on obtient une interférence lumineuse sur la puce CCD, ce qui crée une image globale bruitée. Le travail de recherche du professeur Dubois et de ses collaborateurs a consisté à adapter la lumière laser de manière à diminuer les interférences et à augmenter grandement la qualité de l'image. La technologie permettant d'obtenir ce résultat est entièrement brevetée et les droits de licence exclusifs ont été octroyés à la spin off OVIZIO lors de sa fondation.

### D'UN PROTOTYPE SCIENTIFIQUE À UNE MESURE INDUSTRIELLE

L'équipe du professeur Frank Dubois disposait d'un appareil de

prise belge, a été sélectionnée. Comme les références en développement de prototype étaient assez semblables, le choix s'est porté sur le partenaire le plus proche géographiquement. Avec l'aide de Pascal Debrue, responsable de projet au département Construction de prototypes de WOW Technology, un cahier des charges a été rédigé avec toutes les fonctions de l'équipement de mesure et les spécifications auxquelles chaque composant doit satisfaire. Ces spécifications sont à la base du succès de la construction du prototype et ont nécessité plusieurs mois de préparation. Elles concernaient notamment la construction d'un so-

résultats ont été utilisés pour construire une première série de trois appareils de mesure industriels. Ils étaient disponibles en septembre 2010.

Après des essais approfondis, ceux-ci ont été mis à la disposition du projet de recherche BioLine, lequel a été approuvé fin 2010 au sein du pôle BioWin du Plan Marshall et auxquelles plusieurs entreprises collaborent en consortium: WOW Technology (comme coordinateur), Ovizio Imaging Systems, GSKbio. Trois centres de recherche sont associés: l'ULB (*Microgravity Research Centre et Center for Microscopy and Molecular Imaging*) et les FUNDP (*Biochemistry and Cellular Biology*). L'objectif de ce projet étalé sur trois ans (d'un budget de 2,2 millions d'euros) est, d'une part, de continuer à optimiser l'équipement de mesure pour l'analyse de cultures cellulaires dans des boîtes de cultures (comptage des nombres, recherche en morphologie cellulaire...). D'autre part, dans une seconde phase, on souhaite transformer l'appareil en un équipement de mesure qui puisse suivre la production en ligne de cultures cellulaires et les moniteurs en temps réel. (cfr. <http://www.biowin.org/biowin/fr/7716-bioline.html>).

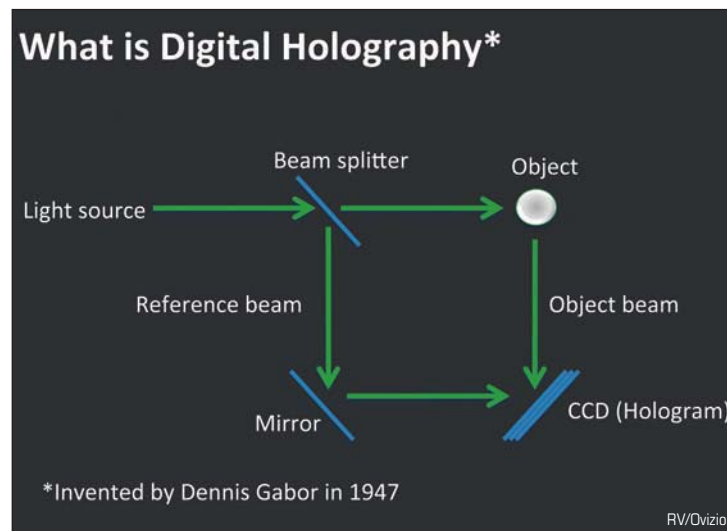


Schéma représentant le principe de l'holographie numérique.

mesure scientifique qui avait été construit pour démontrer la fiabilité des travaux de recherche. Une sorte de prototype fonctionnel. Bien sûr, ce genre de dispositif ne peut pas être commercialisé. Aussi, le premier travail de la spin off a consisté à rechercher un partenaire ayant assez d'expertise pour convertir le prototype scientifique en un équipement de mesure solide et réaliste.

Après avoir passé le marché en revue avec l'aide des membres du groupe d'investisseurs, trois entreprises ont été sélectionnées: WOW Technology, seule entre-

prise système optique (les composants optiques représentent le cœur de métier d'OVIZIO qui a donc choisi et livré les composants), le réglage automatique du microscope et une commande pour réaliser les réglages au sein de la tolérance nm, rendre l'ensemble résistant aux vibrations et aux variations de température, le choix et l'assemblage des pièces, le contrôleur de l'équipement de mesure et l'ordinateur pour les calculs et la visualisation...

En 2010, les spécifications définitives étaient prêtes. Sur leur base, un premier prototype a été réalisé. Après de longs tests, les

### LA COMMERCIALISATION PEUT COMMENCER

Cet appareil suscite de l'intérêt de la part de plusieurs organismes de recherche et d'entreprises biotech, pour la recherche de cultures cellulaires. L'étape suivante, demandée à WOW Technology, est l'optimisation du microscope 4D pour pouvoir le produire en série de manière à créer de la marge, nécessaire à faire face à la concurrence. OVIZIO continue à développer l'optique et le logiciel pour proposer ces appareils dans des domaines de recherche et industriels spécifiques. ■

[www.industrie.be](http://www.industrie.be)