



HAL
open science

Microscopie multiphotonique de protéines fibrillaires : application à l'étude de la fibrose hépatique

Thomas Guilbert

► **To cite this version:**

Thomas Guilbert. Microscopie multiphotonique de protéines fibrillaires : application à l'étude de la fibrose hépatique. Physique [physics]. Université de Rennes 1, 2010. Français. NNT : 2010REN1S191 . tel-04690737

HAL Id: tel-04690737

<https://hal.science/tel-04690737v1>

Submitted on 6 Sep 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

N° Ordre : 4236

THÈSE

présentée

DEVANT L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

Institut de Physique de Rennes UMR CNRS 6251

École doctorale Sciences De La Matière

UFR Structure et Propriétés de la Matière

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Rennes 1

Mention Physique

par

Thomas GUILBERT

MICROSCOPIE MULTIPHOTONIQUE
DE PROTÉINES FIBRILLAIRES :
APPLICATION À L'ÉTUDE DE LA FIBROSE HÉPATIQUE

soutenue le 15 Décembre 2010 devant la Commission d'Examen

Président **Georges BAFFET**, Directeur de Recherches, INSERM, UR1
Rapporteurs **Anne LISTRAT**, Chargée de Recherches, INRA, Clermont Ferrand-Theix
Olivier HAEBERLE, Professeur, Université de Haute-Alsace, Mulhouse
Examineurs **Aymeric LERAY**, Chargé de Recherches, IRI, Lille
Yann LE GRAND, Professeur, Co-Directeur de thèse, UBO, Brest
Christophe ODIN, Maître de Conférences HDR, Directeur de thèse, UR1
Invité **Bruno TURLIN**, MCU PH, DES d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, UR1

N° Ordre : 4236

THÈSE

présentée

DEVANT L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

Institut de Physique de Rennes UMR CNRS 6251

École doctorale Sciences De La Matière

UFR Structure et Propriétés de la Matière

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Rennes 1

Mention Physique

par

Thomas GUILBERT

MICROSCOPIE MULTIPHOTONIQUE
DE PROTÉINES FIBRILLAIRES :
APPLICATION À L'ÉTUDE DE LA FIBROSE HÉPATIQUE

soutenue le 15 Décembre 2010 devant la Commission d'Examen

Président **Georges BAFFET**, Directeur de Recherches, INSERM, UR1
Rapporteurs **Anne LISTRAT**, Chargée de Recherches, INRA, Clermont Ferrand-Theix
Olivier HAEBERLE, Professeur, Université de Haute-Alsace, Mulhouse
Examineurs **Aymeric LERAY**, Chargé de Recherches, IRI, Lille
Yann LE GRAND, Professeur, Co-Directeur de thèse, UBO, Brest
Christophe ODIN, Maître de Conférences HDR, Directeur de thèse, UR1
Invité **Bruno TURLIN**, MCU PH, DES d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, UR1

*"Sans transgression de la norme, il n'y a pas de progrès possible.
Mais avant de chercher à transgresser efficacement, on doit au moins
s'être familiarisé avec la règle, avec la norme dont on veut s'écarter."*

Frank ZAPPA

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été effectués au sein de l'équipe biophysique de l'Institut de Physique de Rennes, UMR 6251 Université de Rennes 1/CNRS, et financés par la région Bretagne que je remercie vivement. Cet institut est dirigé par Anne Renault, à qui j'adresse mes sincères remerciements pour son soutien et ses conseils prodigués tout au long de ces trois années.

Je tiens à remercier Christophe Odin et Yann Le Grand, mes encadrants, respectivement directeur et co-directeur de thèse, pour la confiance qu'ils m'ont témoignée et la grande autonomie, pas toujours évidente à gérer, qu'ils m'ont accordée. Christophe, la relation que nous avons instauré dans cette dernière année, mêlant travail, rigueur et confiance, m'a vraiment beaucoup apporté. Je remercie particulièrement les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer ce travail : mes rapporteurs, Anne Listrat et Olivier Haeberlé, qui ont eu la charge d'évaluer ce manuscrit ; Georges Baffet, qui a présidé ce jury avec bonne humeur ; Aymeric Leray, examinateur dont j'ai eu le privilège d'être le premier "accusé" ; Bruno Turlin, enfin, qui m'a fait l'amitié d'accepter d'assister à ma soutenance en tant que membre invité.

Une thèse est bien souvent le fruit de nombreuses coopérations. J'adresse donc ma gratitude aux équipes avec lesquelles nous avons mis en place différentes collaborations.

Pour la partie Scoring SHG du collagène, j'aimerais remercier les biologistes de l'IFR 140 Génétique Fonctionnelle, Agronomie et Santé, en particulier Georges Baffet, Luc Gailhouste et Frédéric Ezan, ainsi que l'équipe du Service des Maladies du Foie du CHU de Pontchaillou, Dominique Guyader, Bruno Turlin et Yoann Désille. A Angers, je remercie Paul Calès et Julien Chaigneau, avec qui j'ai pu avoir de nombreuses discussions à propos de nos techniques respectives.

Pour la partie portant sur le muscle squelettique, je remercie vivement l'équipe Croissance et Métabolismes du Muscle de l'Unité de Recherches sur les Herbivores de l'INRA Clermont Ferrand-Theix, en particulier Anne Listrat, Daniel Béchet, Bruno Meunier, Annabelle Dubost, avec une pensée toute particulière pour Jacques Lepetit.

J'adresse un remerciement particulièrement chaleureux à tous les membres de l'IPR, du moins

ceux qui ont fait de ces trois années un temps d'intégration, de partage et d'échange scientifique et culturel. Un énorme merci à Valérie F., sans qui ces trois années passées à l'IPR auraient été bancales et grises. Patrick C. et Yvonig R., pour la décontraction d'une forme d'intelligence certaine, Alain M. pour les cafés/clopes et le Raman.

Aux compagnons de route de soutien ayant soutenu : Daphné, ma sœur d'armes, merci, une expérience comme celle-ci se doit d'être partagée, fort heureusement, ce fût avec toi. Vacques, Rémi et Johan, merci du fond du cœur messieurs, quelle source d'enrichissement vous faites ! Mathieu, Mickaël, Christophe, Sophie et Sylvain, merci à vous, et bravo !

Aux compagnons de route à soutenir : Marie (Gloria!), David (Suzanne!), Jo, Sarah, les deux Thomas, ainsi que Marie-Emmanuelle. Ne lâchez rien !

Aux compagnons de route d'expérience, pour les cafés ou autres rencontres, toujours pleines de promesses : Nolwenn, merci pour ta gentillesse et ta franchise. Je te préviens, ce n'est pas fini, je vais continuer à t'embêter ! Maud G. (ma grande sœur), Alain G., Guillaume R., Brice A., Arnaud S.J., Benjamin D. (particulièrement pour le babyfoot, discipline indispensable à la réalisation d'un tel travail!), Bertrand T., Laurent C., Franck A., Pascal P., Bruno B., Halina A.M., Etienne H...

Ce manuscrit de thèse représente une tranche de vie. De manière plus personnelle donc, je tiens tout particulièrement à remercier ma Famille, celle du sang et celle du cœur. Mon père tout d'abord, pour l'éducation globale que tu m'as inculquée au cours des années et qui a fait de moi qui je suis. Tu y étais à cette soutenance, je te l'assure. Mon frère Vincent ensuite, pour tout ce que nous avons partagé ensemble, à Cancale ou ailleurs, mais particulièrement à Brest, où ton soutien a donné aux choses de la vie un goût fort savoureux. Je n'oublie pas ici de rendre hommage aux autres membres de ma famille, spécialement à ma mère pour son courage de tous les jours, à Jacqueline et ses fils, ainsi qu'à Typhenn, ma belle belle-sœur.

La part du cœur revient aux amis, ceux qui font de la vie un spectacle de tous les jours : Colin, Jérèm, Cèdre & Anso et toute la troupe du Boudum', Conik, Cartouche, Jeff, MAudrey, Servane, Laurent, Clément, Rémy, Franck, PiloO, Biboune, Anne & Flo, les Sheer-K... Une telle liste ne pouvant-être exhaustive, je remercie finalement tous les amis qui m'ont accompagné de près ou de loin, au cours de ces trois années...

J'adresse ici une pensée toute particulière pour celle qui durant ces trois années, a réussi à gérer mes humeurs et à me permettre de toujours avancer, dans une direction commune. Merci à toi Brenda.

Enfin, de manière foutraque : les musiciens inspirants : Alain Bashung, Frank Zappa, Steve Reich, Warp Records, Radiohead, Syd Matters, Pink Floyd, Ava Luna, et de manière générale toutes celles et ceux qui font appel à l'imaginaire, à l'absurdité, au surréalisme. La fine équipe du Diapason, Sandrine, Laurence, Guillaume et Karine, La Panique au Mangin Palace, Sylvanimus, le Bateau Ivre et son équipage.

Aux proches disparus. David Boccou, Alexander Mazin, F.G., Kleg...

Aux nouveaux venus. Jeanne mon adorable nièce, Rowann, les Sheerket-tes...

A celles et ceux à venir...

Table des matières

Introduction	1
I La microscopie biphotonique : principes et applications	5
1 La microscopie multiphotonique appliquée à la biologie	7
1.1 Principe et intérêts du microscope multiphoton	8
1.1.1 La microscopie de fluorescence monophotonique	8
1.1.2 La microscopie confocale de fluorescence à balayage	8
1.2 La microscopie multiphotonique	14
1.2.1 Principe et intérêts de la microscopie multiphoton	14
1.2.2 Génération de seconde harmonique	18
1.2.3 Dispositif expérimental	22
1.3 Profondeur d'imagerie en microscopie multiphoton : simulations numériques . . .	30
1.3.1 Efficacités de collection comparées des voies descannée et non descannée .	30
1.3.2 Distribution spatiale de l'efficacité de collection de la fluorescence	34
2 Microscopie multiphotonique du collagène et de la myosine	39
2.1 Les collagènes	40
2.1.1 Les différents types de collagènes	40
2.1.2 Rôle biologique du collagène	41
2.1.3 Structure du collagène fibrillaire	41
2.2 La myosine	43
2.3 Microsc. multiphotonique : collagène et myosine	47
2.3.1 Spécificité du signal SHG	47
2.3.2 Complémentarité des contrastes SHG/TPEF	49

2.3.3	Applications	52
2.4	Reconstruction de champs d'orientation de protéines fibrillaires par microscopie de seconde harmonique	55
2.4.1	Présentation de la méthode OF-SHM	56
2.4.2	Implémentation et automatisation de la méthode OF-SHM	61
2.4.3	Automatisation de la méthode	62
2.4.4	Application de la méthode OF-SHM au collagène et à la myosine	66
3	Imagerie multiphotonique du muscle squelettique	73
3.1	Structure et composition du tissu conjonctif	75
3.1.1	Structure tridimensionnelle	75
3.1.2	Composition moléculaire	76
3.2	Les fibres musculaires	78
3.2.1	Typage	78
3.2.2	Structure et composition	79
3.3	Le muscle squelettique en microscopie multiphotonique	80
3.3.1	Imagerie du tissu conjonctif	80
3.3.2	Imagerie de myofibres en coupe longitudinale	81
3.3.3	Mesure de longueurs de sarcomères	84
3.3.4	Imagerie de cellules musculaires en coupe transverse	90
II	Application de la microscopie biphotonique à l'étude du collagène impliqué dans la fibrose hépatique chez l'Homme	93
4	Scoring du collagène impliqué dans la fibrose hépatique par microscopie SHG	101
4.1	Score de collagène fibrillaire par microscopie SHG	102
4.1.1	Présentation de la méthode de Score SHG	103
4.1.2	Conditions d'imagerie	107
4.1.3	Validation de la méthode de Scores SHG	109
5	Application de la méthode de score SHG à l'évaluation de la fibrose hépatique chez l'Homme	119
5.1	Scores SHG sur biopsies en coupes histologiques : application	120
5.1.1	Protocole expérimental	120
5.1.2	Etablissement du score SHG	128
5.1.3	Résultats et discussion	130
5.2	La microscopie SHG comme outil de diagnostic biomédical?	135
5.2.1	Comparaison de scores SHG de coupes issues de la même biopsie	136
5.2.2	Lecture d'images SHG pour l'établissement d'un score F-Métavir	137
5.2.3	Comparaison du score SHG avec l'histomorphométrie	143
5.2.4	Comparaison du scores SHG avec les autres tests	147

5.2.5	Perspective pour l'imagerie SHG haute résolution	151
	Conclusion	155
A	Simulation Monte Carlo	169
B	Spectroscopie Raman	175
C	Traitement d'image	177

Introduction

L'innovation et le développement de technologies se basant sur des principes optiques, que ce soit pour les télécoms, les systèmes de détection, ou encore l'imagerie, a toujours été un moteur pour la recherche. Dans le domaine biomédical, la microscopie optique a permis la découverte de la cellule, des bactéries, des spermatozoïdes... et y joue encore aujourd'hui un rôle central, notamment grâce à l'apparition de la microscopie de fluorescence, basée sur l'absorption et la réémission de photons. Cependant, la microscopie de fluorescence à un photon appliquée à la biologie reste limitée à des profondeurs d'imagerie de quelques dizaines de micromètres, ces milieux présentant des propriétés de diffusion telles qu'il est difficile de discriminer le signal de fluorescence utile issu du foyer de l'objectif, l'excitation à un photon n'étant pas localisée. La forte diffusion ainsi que la phototoxicité des photons du spectre visibles nécessaires à l'excitation des marqueurs fluorescents deviennent rapidement des limites. La microscopie de fluorescence excitée à deux photons (TPEF), basée sur une interaction non linéaire entre la lumière et le milieu biologique, pallie en grande partie ces problèmes tout en permettant une résolution tridimensionnelle micrométrique en profondeur dans un milieu diffusant. Pourtant, la microscopie multiphotonique ne se limite pas à la TPEF, mais donne également accès à d'autres processus non linéaires tels que la génération de seconde harmonique (SHG) ou l'émission Raman anti-Stokes stimulée. Il est alors possible de visualiser la structure d'un tissu biologique en utilisant ces sources de contrastes endogènes, permettant une imagerie très peu phototoxique, l'excitation se produisant dans l'infrarouge et étant intrinsèquement localisée au foyer de l'objectif du microscope.

Ainsi, au cours des deux dernières décennies, la microscopie multiphotonique s'est imposée comme étant un outil de recherche majeur. Les champs d'investigation couverts par cette technique de microscopie sont très nombreux, dans les domaines de la biologie, de la médecine et bien sûr en physique. Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe biophysique de l'Institut de Physique de Rennes sous la direction de Yann LE GRAND et Christophe ODIN, sur un microscope

multiphotonique développé par Yann LE GRAND, Denis ROUÈDE et Aymeric LERAY au cours de sa thèse, à partir d'un microscope confocal. Ce manuscrit se décompose en deux grandes parties.

La première partie se divise en trois chapitres, le premier étant une présentation des concepts fondamentaux de la technique de microscopie multiphotonique, avec une description des deux contrastes TPEF et SHG. Le second chapitre présente les deux protéines fibrillaires que nous avons étudiées principalement, le collagène et la myosine. Une revue des différentes applications de la microscopie multiphotonique concernant ces protéines est donnée. La spécificité de la réponse de seconde harmonique à l'excitation d'un milieu biologique, ainsi que la dépendance de ce signal en polarisation font qu'il est possible d'envisager la mise en œuvre d'une méthode de reconstruction de champ d'orientation. Une telle méthode a été développée au laboratoire, nous en présentons ici les principes fondamentaux ainsi que quelques applications aux protéines fibrillaires. Enfin, le troisième chapitre comporte une étude préliminaire du muscle squelettique par microscopie multiphotonique. Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe Croissance et Métabolisme du Muscle (C2M) de l'unité de recherche sur les herbivores de l'INRA de Clermont Ferrand/Theix.

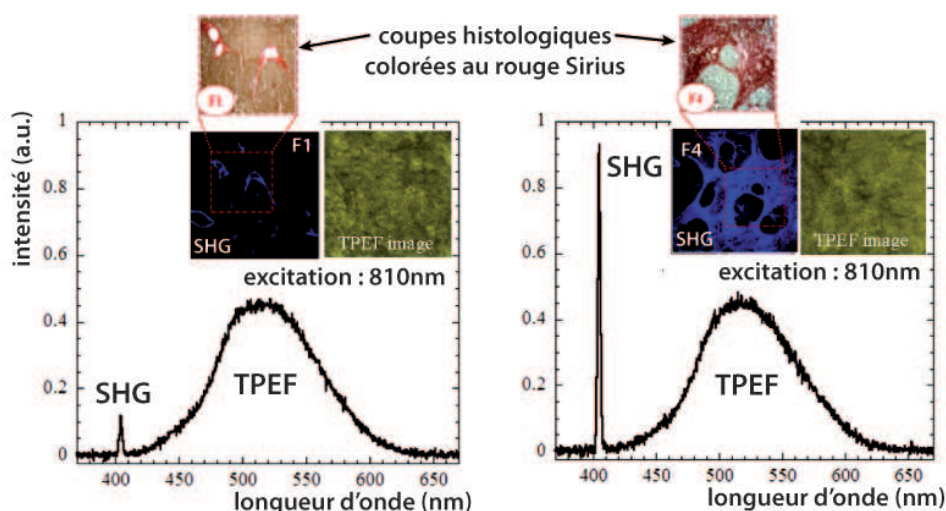


FIGURE 1 : Spectres d'émission du tissu hépatique excité à deux photons à 810nm. Dans le cas d'un foie sain, il y a peu de SHG généré, tandis que pour un foie fortement fibrosé, le signal SHG est intense. Les images SHG et TPEF sont données, ainsi que la même zone en coupe histologique marquée au rouge Sirius.

La seconde partie de cette thèse est consacrée à l'étude du collagène fibrillaire dans le tissu hépatique par microscopie SHG. La proximité de biologistes spécialisés dans la génétique fonctionnelle et la santé, et de médecins du CHU de Pontchaillou de Rennes spécialisés en hépatologie, nous a naturellement orientés vers la problématique de la fibrose du foie, sujet qui avait été démarré par Luc GAILHOUSTE au cours de sa thèse. La fibrose met en jeu une prolifération de matrice extra-cellulaire (tissus cicatriciel) excessive dans le tissu hépatique pouvant mener à la cirrhose. Dans ce contexte, l'aspect spécifique du contraste de seconde harmonique dans les milieux biologiques (en particulier pour les collagènes fibrillaires), ainsi que la complémentarité

intrinsèque du contraste de fluorescence excitée à deux photons en font un outil de choix.

La figure 1 présente ainsi les réponses spectrales de tissus hépatiques peu et fortement fibrosés, excités de manière non linéaire à $810nm$. Il apparaît clairement que dans le cas d'un tissu peu fibrosé, il y a très peu de signal de seconde harmonique généré, tandis que pour un tissu fortement fibrosé, ce signal devient très intense et ce, à génération de fluorescence égale. Il apparaît donc possible de "quantifier" ce signal SHG dans le but de mettre au point une méthode permettant d'évaluer le stade de fibrose d'un patient à partir d'une coupe histologique et ce, sans marquage. Cette étude fait l'objet de la seconde partie de ce manuscrit de thèse, où nous présentons dans le chapitre 4 la méthode que nous avons développée. Nous nous sommes basés sur un modèle de quantification de l'intensité SHG générée par le collagène, modèle qui a été validé par nos expériences. L'application de cette méthode de score SHG à l'étude de biopsie hépatique a d'ores et déjà fait l'objet d'une publication [Gailhouste, 2010]. Nous présentons dans le dernier chapitre une étude comparative entre le score SHG et un panel d'autres méthodes conventionnelles, démontrant ainsi la validité et la pertinence de cette technique d'imagerie pour des applications biomédicales.

Première partie

La microscopie biphotonique : principes et applications

La microscopie multiphotonique appliquée à la biologie

La microscopie multiphotonique est une alternative à la microscopie confocale de fluorescence à balayage tout en étant directement issue de celle-ci. Les deux techniques associent en effet un bâti de microscope de fluorescence (droit ou inversé) à un module de balayage qui comprend deux miroirs galvanométriques conjugués optiquement à la pupille d'entrée de l'objectif. Depuis le début des années 90, la microscopie multiphotonique s'est avérée être un outil de choix pour répondre à différentes problématiques liées à la biologie. Cette microscopie non linéaire, basée initialement sur la fluorescence excitée à deux photons (TPEF) [Denk, 1990], s'est peu à peu généralisée à d'autres contrastes non linéaires comme la génération de seconde harmonique (SHG) [Zipfel, 2003b], la fluorescence excitée à trois photons (3PEF) [Hell, 1996], la génération de troisième harmonique (THG) [Barad, 1997]; [Squier, 1998] ou encore la diffusion Raman anti-Stokes stimulée (CARS) [Duncan, 1982].

Nous commençons par rappeler les fondements de la microscopie de fluorescence à balayage laser. Nous présentons ensuite les deux contrastes d'imagerie utilisés au cours de cette thèse, à savoir la TPEF, phénomène incohérent basé sur l'absorption simultanée de deux photons suivie de l'émission d'un photon de fluorescence, puis la SHG, phénomène cohérent basé sur la diffusion non linéaire de la lumière. Enfin, nous présentons quelques résultats de simulation numérique concernant la profondeur d'imagerie en microscopie TPEF en milieu diffusant.

1.1 Principe et intérêts du microscope multiphoton

L'avènement de la microscopie multiphotonique au début des années 1990 a eu un impact considérable en science de la vie [Denk, 1990]; [Denk & Svoboda, 1997]. Le concept même de la microscopie multiphotonique doit énormément à l'intuition de Maria GÖPPER-MAYER qui prédit en 1931 la possibilité d'absorption simultanée de plusieurs photons par un atome ou une molécule [Göppert-Meyer, 1931]. Ainsi, une molécule fluorescente excitable à un photon d'énergie $h\nu$ et de longueur d'onde λ est susceptible d'être excitée par deux photons d'énergie moitié $h\nu/2$, donc de longueur d'onde double 2λ , ou encore par trois photons d'énergie $h\nu/3$, etc... Néanmoins, la probabilité que de tels événements se produisent décroît très vite avec l'ordre du processus (2, 3...).

Comme nous l'avons rappelé dans l'introduction de ce chapitre, la microscopie multiphotonique est une technique directement issue de la microscopie confocale de fluorescence. Nous présenterons donc les principes de base de cette technique, ses caractéristiques et ses limitations afin de mieux comprendre l'intérêt de la microscopie multiphotonique.

1.1.1 La microscopie de fluorescence monophotonique

La microscopie en champ large

La microscopie de fluorescence en champ large est un outil très couramment utilisé par les biologistes depuis sa mise au point au début du $XX^{\text{ème}}$ siècle en raison de ses possibilités de visualisation *in vivo* de structures biologiques indiscernables en microscopie optique conventionnelle. En champ large, pour qu'une image soit nette, il faut que l'objet soit dans le plan focal du système optique. Lorsque le milieu d'intérêt est épais, qu'il présente un relief important, ou bien lorsqu'il est incliné par rapport à l'objectif, seule une partie de l'objet est nette dans l'image. La profondeur de champ est alors relativement faible. En outre, plus le grossissement de l'objectif est élevé, plus cette profondeur diminue. En règle générale, pour des objets épais, la microscopie de fluorescence en champ large pose problème. L'image du plan focal - nette si le milieu diffuse peu - est noyée dans la fluorescence émise par les plans voisins, qui par définition sont flous. On voit par là que cette technique est limitée à des échantillons fins (épaisseur inférieure à la profondeur de champ du système imageur) et peu diffusants.

1.1.2 La microscopie confocale de fluorescence à balayage

Pour pallier cette limitation, on doit renoncer à ce mode d'imagerie parallèle, et adopter un mode d'imagerie séquentielle qui consiste à balayer successivement chaque point du plan focal de l'objectif, et à collecter la fluorescence à travers un diaphragme (*pinhole* en anglais) placé devant le détecteur, dans un plan conjugué optiquement du plan focal de l'objectif (plan confocal). Ce balayage est généralement réalisé par deux miroirs galvanométriques (scanner) qui sont conjugués optiquement de la pupille d'entrée de l'objectif. De plus, contrairement à la microscopie en champ large, la microscopie à balayage requiert une source de lumière collimatée (faisceau parallèle à

l'entrée de l'objectif), ce qui explique en partie l'utilisation du laser pour cette application. Le laser permet en outre de disposer d'une source intense et naturellement monochromatique, ce qui améliore la sélectivité spectrale de l'excitation et donc la réjection de l'excitatrice au profit de la fluorescence détectée.

En microscopie confocale, seuls les photons provenant du point focal de l'objectif passent par le diaphragme et participent à la formation de l'image. Le diaphragme confocal permet ainsi d'éliminer la fluorescence générée par les autres plans : c'est ce phénomène qui produit un sectionnement optique dans un milieu fluorescent en profondeur.

L'avènement de la microscopie confocale de fluorescence a permis d'améliorer considérablement la résolution axiale et la profondeur d'imagerie dans les milieux biologiques. Cette méthode d'imagerie a également permis d'augmenter fortement le rapport signal sur bruit dans l'image reconstruite, c'est-à-dire le ratio entre le signal utile généré et le signal généré non porteur d'information. Ainsi, la microscopie confocale permet de visualiser très finement des échantillons biologiques dans les trois dimensions de l'espace, jusqu'à des profondeurs de quelques dizaines de micromètres. Le principe confocal décrit par Minsky dans les années 60 est devenu une technique très répandue, utilisée en routine au sein de la majorité des laboratoires de recherche en biologie, en médecine ainsi qu'en physique [Minsky, 1988]. C'est dans les années 80 que les premiers microscopes confocaux commerciaux ont fait leur apparition. A l'heure actuelle, il est possible d'acquérir un microscope confocal complet (source laser, module confocal, bâti du microscope, détecteurs, logiciel de reconstruction d'images) chez différents constructeurs (Leica, Nikon, Olympus, Zeiss...) pour environ 300K€.

Principe général

Les différents microscopes optiques à balayage fonctionnent sur le même principe général.

Pour un microscope confocal, la source lumineuse d'excitation monophotonique est un laser continu. Différentes sources lasers sont actuellement disponibles sur le marché, de longueur d'onde fixe ou accordable selon ce qu'on veut observer (autofluorescence, marqueurs...), émettant généralement dans le visible, et de différentes familles (He-Ne, Argon Ionisé, diodes, lasers solides doublés en fréquence, à semi-conducteurs...).

Pour imager dans le plan focal de l'objectif, il est nécessaire d'utiliser un système de balayage permettant de déplacer le point focal suivant les directions X et Y de ce plan. Le balayage du champ par le laser se fait à l'aide de deux miroirs orthogonaux. Il s'agit de miroirs galvanométriques très rapides (entre 200Hz et 2 KHz selon les modèles) effectuant le balayage en X , suivi d'un miroir permettant le balayage plus lent en Y .

Les détecteurs utilisés sont généralement des tubes photomultiplicateurs (PMT) et parfois des photodiodes à avalanche (APD) fonctionnant en mode comptage de photons. Ces capteurs très sensibles sont rendus nécessaires par le très faible signal émis. L'intensité lumineuse est intégrée temporellement sur la durée d'un point image, ou pixel (dwell-time). Ce signal électrique est ensuite numérisé pour constituer une matrice de points images. En codant ce signal sur 8, 12 ou 16-bit on obtient une image respectivement en $2^8 = 256$, $2^{12} = 4096$ et $2^{16} = 65536$

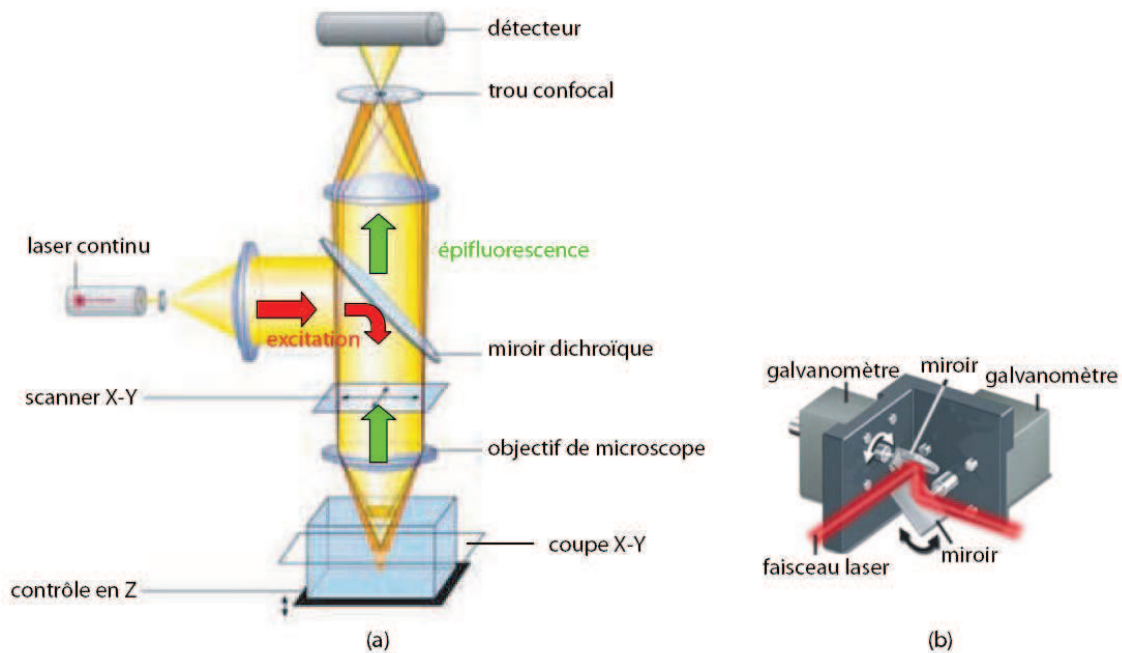


FIGURE 1.1 : (a) : Principe de la microscopie confocale à épifluorescence. Cette technique permet de collecter la fluorescence provenant du point focal (extrait du site : <http://www.zeiss.fr/C12568E80022E0FD/>). (b) : Pour avoir une image, il est nécessaire d'utiliser un système de balayage permettant de déplacer le point focal dans le plan focal de l'objectif (figure traduite du site : <http://www.olympusconfocal.com/theory/confocalscanningsystems.html>)

niveaux de gris. Les images obtenues ont un champ variant de (64×64) à (4096×4096) pixels. D'une manière générale, le nombre de pixels de l'image doit être adapté à la résolution optique fournie par l'objectif utilisé. Néanmoins, plus la résolution de l'image est élevée, plus le temps d'acquisition est long, ce qui devient clairement une limite pour l'acquisition de phénomènes biologiques rapides sur du matériel vivant. Enfin, le fichier généré est plus volumineux, et dans le cas de multiples acquisitions, le stockage des images peut alors poser problème. La profondeur d'imagerie peut être modifiée en déplaçant le plan focal de l'objectif dans l'échantillon. Il est ainsi possible d'imager dans les trois dimensions spatiales et de réaliser des reconstructions 3D à partir d'images 2D.

La fluorescence La fluorescence est le processus d'émission d'un photon par une molécule qui suit l'absorption par cette même molécule d'un ou plusieurs photons. Lorsqu'un atome ou une molécule absorbe un photon, il accède à un état électronique excité. Lors de la désexcitation, une partie de l'atome (ou de la molécule) subit une relaxation vibrationnelle, c'est-à-dire qu'il perd un peu d'énergie sous forme de vibration (phonon) ou de chaleur. Il retourne ensuite à son état électronique initial en émettant un photon d'énergie correspondant à la différence d'énergie entre l'état excité (relaxé) et l'état initial. Le photon de fluorescence émis est alors de longueur d'onde supérieure à la longueur d'onde d'excitation. On pourra alors distinguer une différence

d'énergie ou de longueur d'onde entre le maximum du spectre d'absorption et celui du spectre de luminescence (fluorescence ou phosphorescence) de la même transition électronique. Cette différence est appelée le déplacement de Stokes et illustrée figure 1.2.

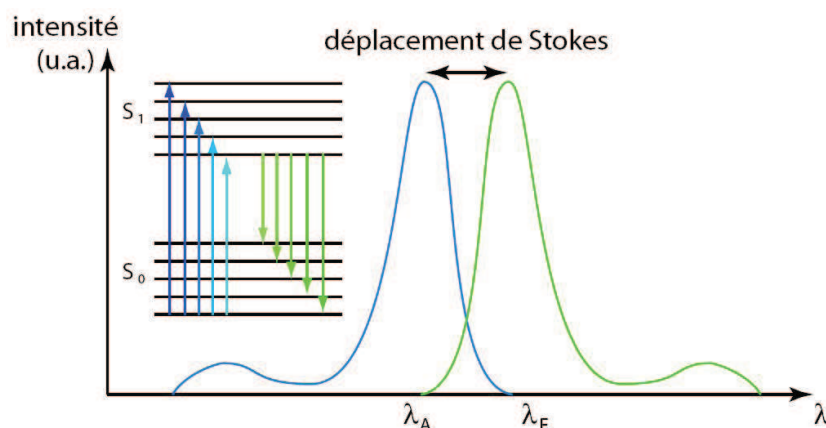


FIGURE 1.2 : spectre d'absorption (à gauche) et spectre d'émission de fluorescence (à droite) d'une molécule. Différentes transitions entre le niveau fondamental S_0 et le premier niveau excité S_1 ont également été représentées.

En biologie, on distingue deux types d'objets en fluorescence : les premiers émettent directement de la lumière fluorescente sous excitation ; on parle de fluorescence primaire ou autofluorescence. Les seconds doivent être combinés (on parle alors de *marquage*) avec une substance exogène qui elle est fluorescente ; on parle alors de fluorescence secondaire. En microscopie de fluorescence, on peut donc visualiser directement des milieux fluorescents primaires, tandis que pour les milieux non fluorescents, il est nécessaire de les marquer par des substances appelées fluorophores, comme par exemple le DAPI qui marque l'ADN et fluoresce dans le bleu. Certains marqueurs génétiques comme la protéine fluorescente verte, (en anglais *Green Fluorescent Protein* ou GFP) sont aussi très utilisés en biologie. Dans ce cas, le fluorophore est une protéine produite directement par la cellule génétiquement modifiée. La fluorescence peut alors être visualisée directement dans les cellules vivantes, en évitant tout effet de toxicité chimique du marqueur.

Diaphragme confocal La microscopie confocale à épifluorescence consiste à collecter par le même objectif qui produit l'excitation, l'émission de fluorescence d'un échantillon excité par un laser continu émettant dans le visible. Dans ce cas, l'émission de fluorescence a lieu dans tout le diaphragme d'excitation de l'objectif du microscope.

La fluorescence est collectée par l'objectif imageur qui travaille à l'infini (l'image du point focal est rejetée à l'infini), puis séparée de l'excitation par un miroir dichroïque. Cette fluorescence passe ensuite à travers les scanners afin d'être débalayée (descannée), puis est focalisée sur le diaphragme confocal. Ce dernier rejette la lumière produite axialement hors du point

focal ainsi que la lumière diffractée en dehors de la tâche centrale dans le plan focal [Brakenhoff, 1979] ; [Wilson, 1984]. Avec cette méthode, et en théorie, les résolutions axiale et latérale sont améliorées d'un facteur 1,4 et la sélectivité spatiale est 2,7 fois meilleure qu'en champ large.

La suppression physique des contributions hors plan focal à la formation de l'image produit un effet de sectionnement optique. Pour mieux comprendre comment intervient ce sectionnement optique, on peut observer sur la figure 1.3 les différents éléments qui schématisent un microscope confocal à épifluorescence. Le miroir dichroïque sépare l'onde excitatrice de la fluorescence.

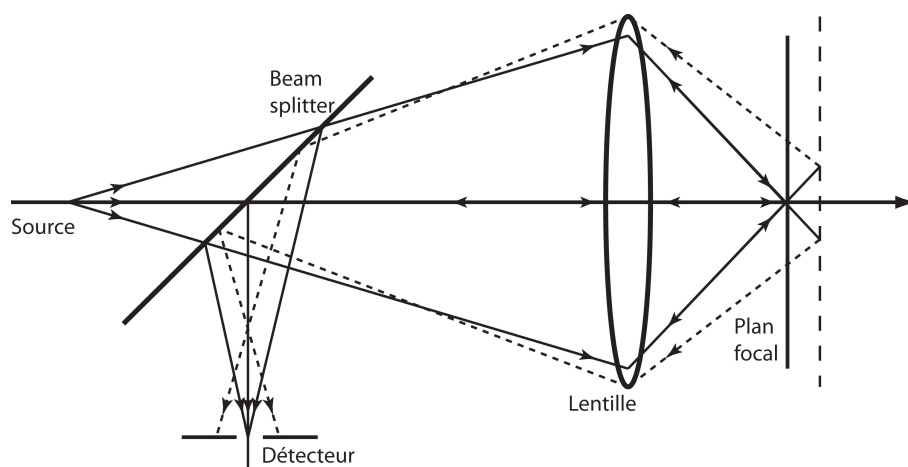


FIGURE 1.3 : *Origine du sectionnement optique intrinsèque au système optique confocal. (figure tirée de [Diaspro, 2002])*

Les traits pleins montrent le chemin optique quand un objet est situé au point focal de la lentille. La contribution hors plan focal, représentée par la ligne verticale pointillée, montre que la lumière arrivant vers le diaphragme confocal est défocalisée, seule la partie centrale est détectée et contribue à la formation de l'image. Ce système optique élimine les contributions d'excitation hors du point focal, au profit de la fluorescence utile issue du volume focal. Néanmoins, les photons de fluorescence provenant du point focal ont une probabilité quasi-nulle de passer à travers le trou confocal lorsque le milieu est fortement diffusant, ce qui limite la profondeur d'imagerie dans ce cas.

Résolution du microscope confocal La résolution d'un système imageur est définie comme étant la plus petite distance séparant deux objets discernables. Pour définir cette résolution et comparer les performances de différents microscopes optiques, il est commode d'utiliser la notion de PSF (*Point Spread Function*) qui correspond à l'image d'une source ponctuelle à l'infini fournie par ce système optique. Cette PSF peut ainsi être interprétée comme la réponse impulsionnelle du microscope. Dans le cas d'un objectif travaillant à l'infini, la PSF en intensité correspond à la distribution de l'intensité au voisinage du foyer lorsque l'objectif est éclairé en onde plane. Pour définir la résolution du système, il faut utiliser un critère de résolution. Plusieurs

critères existent. Les plus fréquents sont le critère de Rayleigh, qui correspond à la distance entre le maximum d'intensité et le premier minimum de la PSF, et la largeur de la PSF à mi-hauteur.

En utilisant le critère de Rayleigh, la résolution latérale et axiale d'un microscope confocal est approchée par les expressions suivantes [Jonkman, 2002] :

$$r_{x,y}^{conf} = \frac{0.4\lambda_{em}n}{NA}$$

$$r_z^{conf} = \frac{1.4\lambda_{em}n}{NA^2}$$

Pour un objectif à eau ($n = 1.33$), d'ouverture numérique $NA = 1.2$ et à la longueur d'onde d'émission de $515nm$, les résolutions du microscope confocal sont typiquement : $r_{x,y}^{conf} = 190nm$ et $r_z^{conf} = 666nm$. Ainsi, le microscope confocal permet de réaliser des images en trois dimensions avec une résolution sub-micrométrique. Néanmoins, il présente de nombreux inconvénients.

Limitation de la microscopie confocale

Bien que ce type de microscope représente une avancée technologique décisive pour l'imagerie de fluorescence en profondeur dans les milieux biologiques notamment, elle présente également quelques limitations :

- Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission étant très proches, il est parfois difficile de les séparer spectralement, notamment lorsque le décalage de Stokes est faible.
- Seuls les photons balistiques (non diffusés) atteignant le volume focal à l'excitation laser et en provenance du foyer de fluorescence (collectés à travers le diaphragme confocal) participent au signal. L'intensité de fluorescence collectée diminue ainsi exponentiellement avec la profondeur d'imagerie z_0 comme $\exp(-(\mu_s^{exc} + \mu_s^{coll})z_0)$, où μ_s^{exc} et μ_s^{coll} sont les coefficients de diffusion (inverse du libre parcours moyen des photons) du milieu dans lequel on image, aux longueurs d'ondes d'excitation et de collection. Compte-tenu des valeurs relativement fortes des coefficients de diffusion dans le domaine du visible ($\mu_s \approx 100cm^{-1}$, l'absorption est négligeable par rapport à la diffusion dans la plupart des tissus biologiques aux longueurs d'ondes visibles et proche IR : $\mu_a \ll \mu_s$), la profondeur d'imagerie de la microscopie confocale est limitée à environ $50\mu m$ dans les milieux biologiques.
- La dégradation des cellules vivantes est si rapide aux longueurs d'onde d'excitation proches du bleu, qu'il est nécessaire d'employer de faibles intensités pour exciter les fluorophores à un photon. De plus, les différents photo-dommages associés à l'absorption de l'excitatrice ont lieu dans tout le volume de l'échantillon traversé par le faisceau (diabolo), y compris en dehors du volume focal de l'objectif (la PSF).

La microscopie de fluorescence par excitation multiphotonique permet de pallier en grande partie ces problèmes.

1.2 La microscopie multiphotonique

1.2.1 Principe et intérêts de la microscopie multiphoton

Nous présentons maintenant les principes de base et les avantages de la microscopie multiphotonique, sous sa forme la plus connue, la fluorescence excitée à deux photons (TPEF), puis la génération de seconde harmonique (SHG) qui est, nous le verrons dans la suite, un contraste complémentaire et disponible simultanément avec la TPEF.

Fluorescence excitée par absorption à deux photons

Cette technique est basée sur l'excitation de fluorescence à plusieurs photons absorbés quasi-simultanément (entre 10^{-18} et 10^{-16} secondes), créant ainsi une excitation dont l'énergie totale est égale à la somme des énergies des photons. Ainsi, une molécule fluorescente excitable par un photon d'énergie $h\nu$ et de longueur d'onde λ est susceptible d'être excitée par deux photons d'énergie moitié $h\nu/2$ donc de longueur d'onde double 2λ . Par exemple, une excitation monophotonique dans le domaine ultra-violet ou la partie bleue du spectre visible, peut être remplacée par une excitation biphotonique dans le domaine du rouge ou proche infra-rouge. La fluorescence est alors générée à une longueur d'onde plus courte que celle du rayonnement d'excitation (ici dans le vert). Ce phénomène a donné naissance à la technique de fluorescence induite par excitation à deux photons (TPEF : *Two-Photon Excitation Fluorescence*) et est illustré figure 1.4.

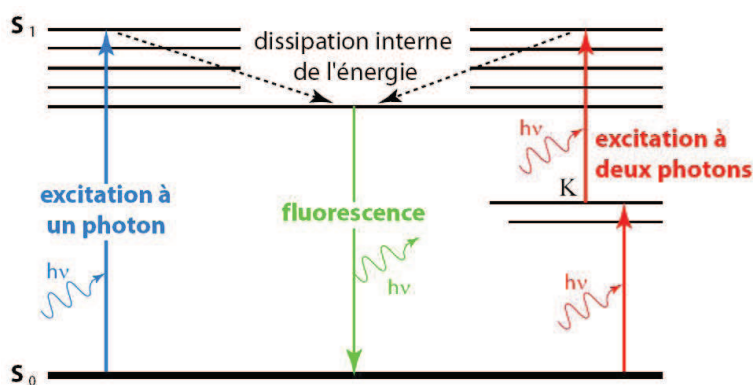


FIGURE 1.4 : Diagramme de Jablonski simplifié illustrant les processus d'absorption à un et deux photons permettant l'émission de fluorescence. S_1 correspond à l'état excité. K est un état virtuel permis pendant un temps très court, il ne correspond pas à un niveau d'énergie autorisé.

La fluorescence est dite *non linéaire* car son intensité dépend non linéairement de l'intensité d'excitation. En particulier dans le cas de l'excitation à deux photons, l'intensité de fluorescence dépend quadratiquement de l'intensité d'excitation.

La section efficace d'absorption à deux photons σ_{2p} est beaucoup plus faible que celle à un photon. Néanmoins, l'intensité de la fluorescence générée dépend du carré de la puissance instantanée d'excitation, ce qui explique l'intérêt d'utiliser des sources laser à impulsions de forte

puissance instantanée et de faible puissance moyenne \bar{P} , de manière à optimiser l'efficacité d'excitation tout en préservant les échantillons biologiques des photo-dommages. En effet, l'intensité de fluorescence moyenne est donnée par :

$$I_F \approx \frac{\bar{P}^2}{f\tau} \sigma_{2p},$$

où τ est la durée des impulsions et f leur cadence de répétition. Par exemple, avec une source laser femtoseconde produisant typiquement des impulsions de durée $\tau = 100\text{fs}$ à la cadence de 100MHz (10^8Hz), on obtient un produit $f\tau = 10^{-5}$. Ainsi, l'efficacité d'excitation à deux photons d'un fluorophore donné sera 10^5 fois plus grande si on utilise ce type de laser, plutôt qu'un laser continu pour lequel $f\tau = 1$.

Pour mieux illustrer ce propos et la rareté de l'événement "absorption simultanée de deux photons", voici ce que rapportent [Denk & Svoboda, 1997] : à la lumière du jour, une molécule possédant une bonne section efficace d'absorption à un (ou deux) photon(s) absorbe un photon via une interaction monophotonique environ une fois par seconde, et absorbe au travers une interaction biphotonique simultanée deux photons toutes les 10 millions d'années. Ainsi, la faible probabilité du processus d'absorption à deux photons doit être compensée par l'emploi d'une source lumineuse à impulsions ultra-courtes, dont la cadence est adaptée aux temps de relaxations caractéristiques de la fluorescence (de l'ordre de la nanoseconde). Ceci explique pourquoi ce n'est qu'en 1961, après le développement d'oscillateurs laser impulsionnels [Wise, 1999]; [Gratton, 1995], que [Kaiser & Garrett, 1961] ont obtenu l'excitation de fluorescence à deux photons dans le composé $\text{CaF}_2 : \text{Eu}^{2+}$, et que [Singh & Bradley, 1964] ont estimé la section efficace d'absorption à trois photons [Diaspro, 2002].

La faible profondeur de champ (fort sectionnement axial) est une conséquence de la non linéarité en intensité de l'absorption à plusieurs photons, la fluorescence étant essentiellement produite dans un volume de l'ordre du femtolitre (10^{-15}L ou $1\mu\text{m}^3$) centrée sur le point focal de l'objectif, et limitée par la diffraction. Avec cette technique, l'excitation est donc extrêmement localisée et il n'est plus nécessaire de sélectionner la fluorescence produite au point focal de l'objectif à l'aide d'un diaphragme confocal. La fluorescence peut être collectée en champ large, ce qui permet non seulement de détecter les photons balistiques, mais aussi une grande partie des photons diffusés par le milieu. On peut aussi montrer [Beaurepaire, 2002] que dans la limite diffusive, cas où tous les photons sont diffusés un grand nombre de fois avant d'être collectés (un nombre de fois tel que les photons ont perdu la mémoire de leur condition d'émission, lieu et direction), l'intensité collectée en microscopie biphotonique, diminue seulement comme $[\exp(-2\mu_s^{exc} z_0)] / z_0^2$ (avec μ_s^{exc} : coefficient de diffusion pour la longueur d'onde d'excitation proche IR) alors qu'en microscopie confocale (à travers un diaphragme), elle diminue comme $[\exp(-\mu_s^{exc} z_0) \cdot \exp(-\mu_s^{coll} z_0)]$ avec la profondeur d'imagerie (avec μ_s^{exc} : coefficient de diffusion pour la longueur d'onde d'excitation visible ou proche UV). Notons que le coefficient de diffusion à considérer dans l'infrarouge est beaucoup plus faible que dans le visible. Cette caractéristique

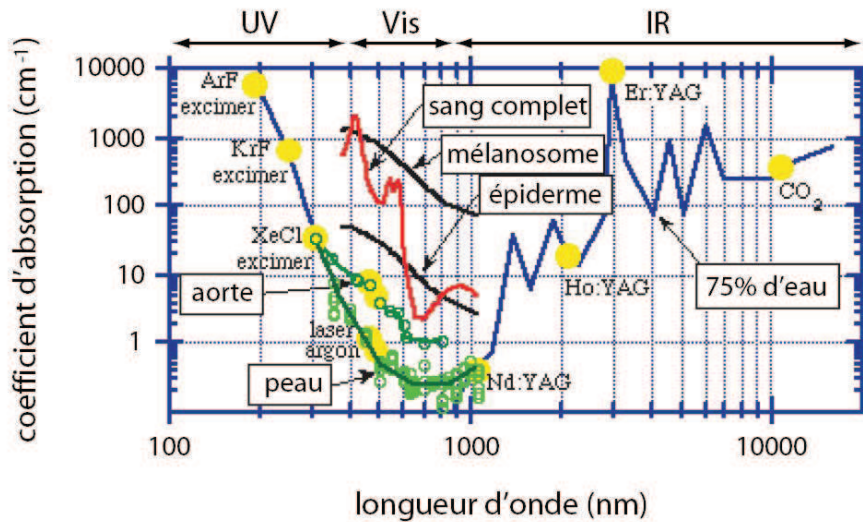


FIGURE 1.5 : Spectres d'absorption de différents tissus biologiques. Les principales raies laser sont représentées. Les tissus étant composés en moyenne de 75% d'eau, le spectre d'absorption de l'eau a été multiplié par ce même facteur (figure traduite, extrait du site : <http://omlc.ogi.edu/classroom/ece532/class3/muaspectra.html>).

n'est pas le seul avantage de la microscopie biphotonique.

Intérêts de l'excitation biphotonique

Bien que très proche du microscope confocal en termes de principe de fonctionnement et de résolution, la microscopie multiphotonique apporte au moins trois améliorations majeures :

1. **Excitation localisée intrinsèquement** ; comme nous l'avons vu précédemment, l'utilisation d'un trou confocal n'est plus nécessaire ce qui permet la collection de la fluorescence en champ large, améliorant ainsi son efficacité dans le cas des milieux diffusants, l'efficacité de collection diminuant comme $1/z_0^2$ et non plus comme $\exp(-\mu_s^{coll} z_0)$ en confocal.
2. **Longueurs d'onde d'excitation et d'émission bien séparées** ; l'excitation réalisée dans l'infrarouge et l'émission dans le visible sont aisément séparables spectralement, ce qui améliore considérablement la réjection de l'excitatrice.
3. **Profondeur de pénétration en milieu diffusant** ; la diffusion de la lumière par les tissus biologiques est le processus principal limitant la profondeur d'imagerie en microscopie. Les tissus biologiques sont en effet peu absorbants dans la partie rouge et proche infrarouge du spectre. L'absorption est fonction du couple longueur d'onde - chromophore, comme le montre la figure 1.5. La plupart des molécules organiques ont une forte absorption dans l'ultraviolet. Aussi, les profondeurs de pénétration dans l'U.V. sont extrêmement faibles (quelques microns). Dans le visible (bleu, vert, jaune) l'absorption s'effectue principalement au niveau de l'hémoglobine et de la mélanine. Le rouge et le proche infrarouge (0.6 à $1.2\mu\text{m}$) sont peu absorbés et pénètrent profondément dans les tissus, cette pénétration étant limitée par la diffusion optique en microscopie, où les photons balistiques sont

essentiels.

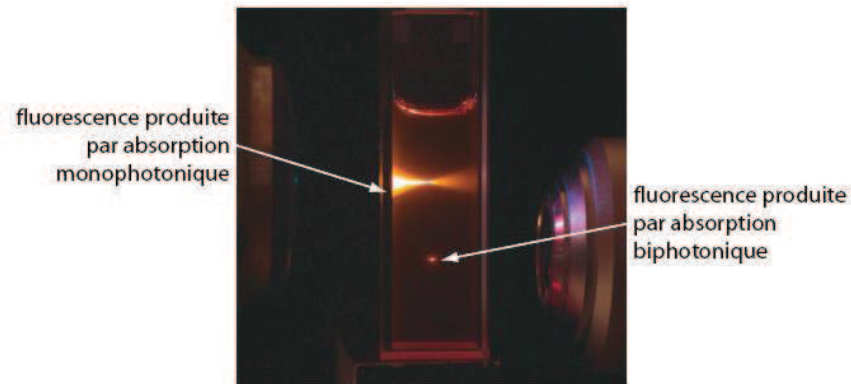


FIGURE 1.6 : Illustration du confinement intrinsèque de la fluorescence produite par excitation biphotonique dans une expérience réalisée au laboratoire. La cuve contient une solution de fluorescéine de concentration. L'excitation linéaire est assurée par un laser continu visible ($\lambda = 488nm$) alors que l'excitation biphotonique est créée par un laser impulsif femtoseconde infrarouge ($\lambda = 1032nm$).

En microscopie multiphoton, l'excitation dans l'infrarouge tire bénéfice de la diminution significative du coefficient de diffusion avec la longueur d'onde d'excitation (régime de diffusion entre Mie et Rayleigh, $\mu_s \approx \frac{1}{\lambda^x}$, avec $1 < x < 4$ au profit d'une plus grande profondeur de pénétration des photons excitateurs. Ainsi, la possibilité d'imager des tissus biologiques intacts en profondeur, tout en gardant une résolution tridimensionnelle micrométrique est l'un des atouts majeurs de la microscopie multiphoton (exemple : $500\mu m$ dans le cerveau du rat, *in vivo* [Oheim, 2001]).

4. **Photoblanchiment et phototoxicité réduits ;** le rayonnement infrarouge utilisé est beaucoup moins toxique pour les tissus qu'un rayonnement visible qui produit des états excités de certaines molécules qui deviennent alors réactives chimiquement, et conduisent à la mort cellulaire. De plus, en microscopie TPEF, le confinement intrinsèque de l'excitation permet de restreindre les éventuels photo-dommages au volume focal de l'objectif car les photons infrarouges ne sont quasiment pas absorbés ailleurs.

Ainsi, la microscopie de fluorescence par excitation biphotonique est une technique particulièrement bien adaptée pour l'imagerie du vivant.

La possibilité de combiner différents contrastes, notamment la TPEF et la SHG est également l'un des atouts de la microscopie multiphoton. Plus récemment, la TPEF a été combinée à d'autres contrastes tels que la génération de troisième harmonique (THG) [Yelin, 2002] ; [Chu, 2003] ; [Sun, 2003] ; [Débarre, 2006] qui permet de révéler les hétérogénéités des propriétés optiques du milieu sondé (la THG est produite aux interfaces), ou encore la microscopie par diffusion Raman anti-Stokes stimulée (CARS - Coherent Anti-Stokes Raman Scattering), qui permet d'exciter

sélectivement les modes de vibrations de différents radicaux (NH_2 , $CH\dots$).

L'essentiel des travaux réalisés au cours de cette thèse a porté sur l'étude et l'analyse des signaux de seconde harmonique produits par le collagène et la myosine. J'ai également participé de façon ponctuelle à l'étude de l'efficacité de collection en microscopie biphotonique, en adaptant notamment un programme de simulation Monte Carlo sous Matlab.

1.2.2 Génération de seconde harmonique

Bien qu'étant moins répandu que la fluorescence par excitation biphotonique, ce processus d'optique non linéaire a pourtant été utilisé plusieurs années avant l'invention de la microscopie TPEF pour visualiser des tissus endogènes (tendon de queue de rat) [Roth, 1979].

Principe

La génération de seconde harmonique est un processus cohérent du deuxième ordre. Une source laser intense, généralement impulsionnelle, de fréquence ω , excite un milieu qui diffuse l'excitatrice en son harmonique à 2ω , sans phénomène d'absorption.

Au niveau moléculaire, la SHG est liée à la réponse non-centrosymétrique au champ électrique intense d'une onde laser, d'électrons polarisables entre un groupement donneur et un groupement accepteur d'électrons. Au niveau macroscopique, la construction cohérente du signal impose également l'absence de centrosymétrie dans l'arrangement moléculaire à l'échelle de la longueur d'onde λ . En l'absence de désordre dans cet arrangement, le signal SHG produit est proportionnel au carré de la concentration en molécules actives, ou harmonophores. En biologie, des signaux SHG intrinsèques ont ainsi été mis en évidence dès les années 80 dans le collagène fibrillaire [Freund, 1986] et plus récemment dans les myofilaments [Plotnikov, 2006a], les axonèmes et les microtubules [Zipfel, 2003b]; [Odin, 2009]. Il est important de préciser que le terme SHG implique un comportement collectif (pour un ensemble de molécules). La diffusion non linéaire d'un rayonnement par une molécule unique ou par une assemblée de molécules d'orientation quelconque (en solution), est appelée diffusion hyper-Rayleigh (HRS : *Hyper Rayleigh Scattering*).

Diffusion non linéaire d'une molécule unique

Nous commençons par décrire la diffusion radiative d'une molécule unique, vue au premier ordre comme un simple dipôle électrique. Dans le cas d'une molécule parfaitement symétrique soumise à une onde incidente de fréquence ω , l'approche classique montre qu'une force sinusoïdale de fréquence ω apparaît le long de l'axe de la molécule sur le nuage électronique de la molécule. Etant donné que la molécule est symétrique, l'oscillation du nuage électronique est également symétrique et le rayonnement diffusé sera à la fréquence ω de l'onde excitatrice. Cette émission est appelée diffusion Rayleigh [Born & Wolf, 1993]. Pour une molécule symétrique, il n'y a donc pas d'émission à la fréquence 2ω : cette diffusion est linéaire (il peut en revanche y avoir une

émission à 3ω , 5ω ..., réponse non linéaire symétrique de la molécule). La décomposition en série de Fourier d'un signal périodique et symétrique par rapport à l'origine ne contient en effet que des fréquences impaires.

Considérons à présent une molécule asymétrique. Une telle molécule possède une partie donneuse (D) et une partie acceptrice (A) d'électrons à chaque extrémité qui favorise le déplacement électronique de D vers A. Soumise au champ sinusoïdal de l'onde électromagnétique intense, le déplacement électronique est toujours périodique mais est cette fois asymétrique et anharmonique. Ce déplacement électronique va rayonner à la fréquence 2ω . Ce rayonnement à la fréquence 2ω est appelé diffusion hyper-Rayleigh (HRS) et est à l'origine de la génération de seconde harmonique. Pour avoir de la génération de seconde harmonique, il faut donc un milieu non-centrosymétrique à la fois à l'échelle microscopique ou moléculaire, et à l'échelle macroscopique de l'arrangement moléculaire.

Dans tous les cas, l'intensité SHG est proportionnelle au carré de l'intensité laser excitatrice, ce qui se traduit pas une localisation intrinsèque de la SHG dans le volume focal de l'objectif, comme en TPEF. Dans le cas d'un arrangement non-centrosymétrique parfait, le signal généré est proportionnel au carré de la concentration en harmonophores.

SHG d'un ensemble de molécules non centrosymétriques

En présence de désordre dans l'orientation et la position des harmonophores, il convient d'être prudent dans l'interprétation du signal SHG en terme de concentration en harmonophores. Au niveau macroscopique, la SHG est en effet très sensible à l'organisation macromoléculaire du milieu.

Considérons deux molécules non centrosymétriques alignées parallèlement et situées l'une de l'autre à une distance plus petite que la longueur d'onde excitatrice (on néglige ici les interactions chimiques). Dans ce cas, les ondes à 2ω produites par l'interaction entre chacune des molécules et l'onde de pompe à ω sont en phase et interfèrent constructivement. En conséquence, l'amplitude du signal HRS à 2ω résultant sera doublée, et l'intensité sera quadruplée en comparaison de celle produite par une seule molécule.

Considérons maintenant le cas où les deux molécules sont orientées de manière antiparallèle. Les ondes à 2ω générées sont alors en opposition de phase et interfèrent destructivement, annulant la résultante harmonique à 2ω . La dépendance de la phase avec l'orientation moléculaire est une caractéristique de la diffusion harmonique de la lumière qui est cohérente, ce qui n'est pas le cas pour l'émission de fluorescence où la phase est aléatoire parce que le phénomène est incohérent.

En pratique, en microscopie SHG, on recueille le signal généré par une population de molécules dans le volume focal de l'objectif, volume qui est macroscopique en comparaison de l'échelle moléculaire. L'organisation de ces molécules au niveau macroscopique a une influence majeure

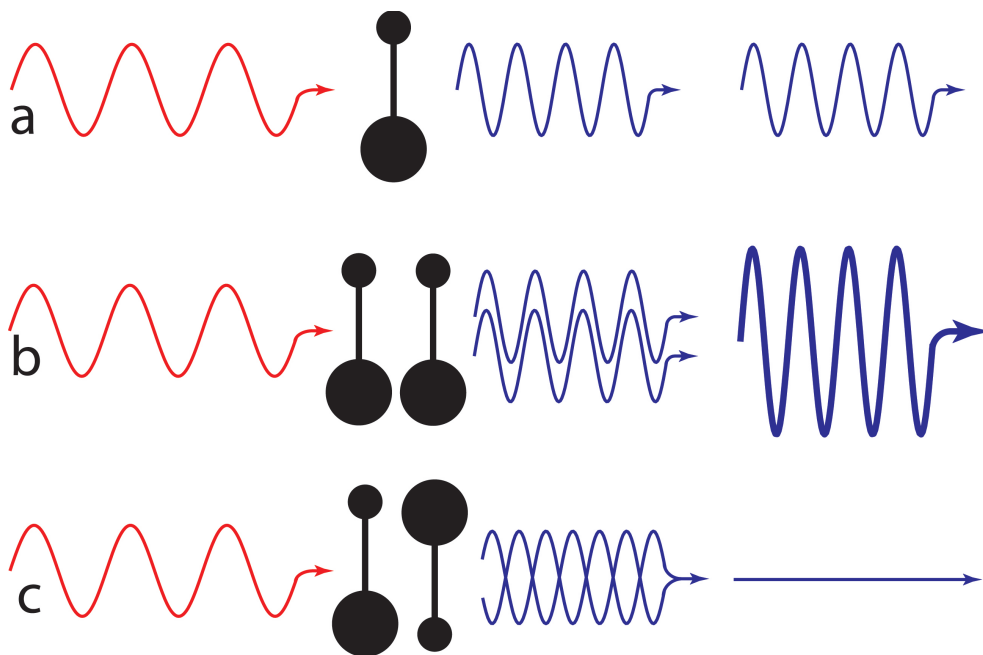


FIGURE 1.7 : (a) : L'excitation d'une molécule non centrosymétrique par une onde de fréquence ω produit un rayonnement diffusé à la fréquence 2ω (diffusion harmonique, en plus de la diffusion Rayleigh à la même fréquence). (b) et (c) : Diffusions harmoniques de deux molécules situées à une distance plus petite que la longueur d'onde : (b) interférences constructives des signaux à 2ω pour des orientations parallèles et (c) destructives pour des orientations antiparallèles, conduisant à un signal net nul.

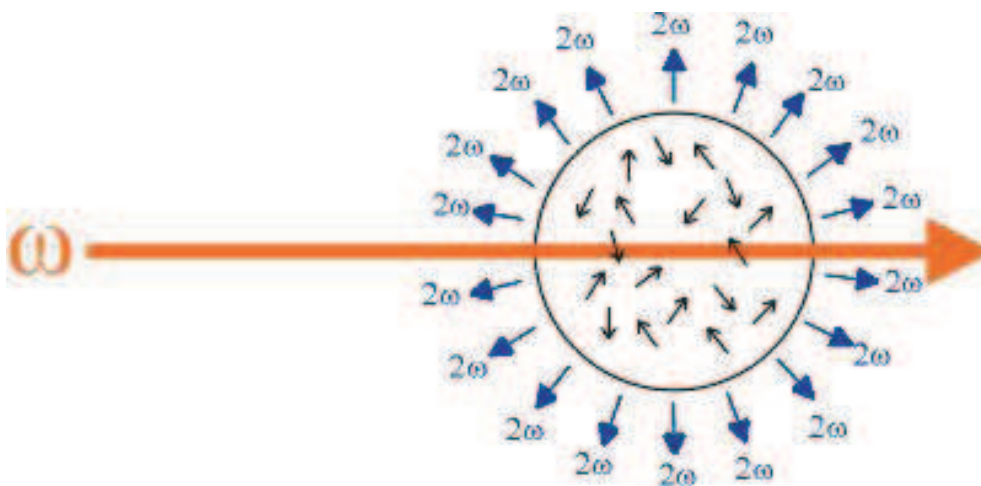


FIGURE 1.8 : Cas d'une population de N molécules. Lorsque les molécules sont orientées de façon aléatoire, la diffusion hyper-Rayleigh est incohérente. La puissance HRS totale est proportionnelle à N .

sur la génération de seconde harmonique. En effet, si on considère une population de N molécules en solution, orientées aléatoirement et excitées par un faisceau collimaté (cf. figure 1.8), la phase de leur signal HRS individuel est également aléatoire. Dans ce cas, le signal HRS produit est incohérent et la puissance totale générée est proportionnelle au nombre de molécules ($P_{HRS} \propto N$).

A présent, si ces molécules sont alignées dans le même sens, comme dans certaines phases de cristal liquide par exemple, la phase du signal HRS produit par chaque molécule est la même que celle de l'onde incidente. Le signal HRS est alors produit de façon cohérente et on parle dans ce cas de génération de seconde harmonique. La puissance SHG totale est alors proportionnelle au carré du nombre de molécules N : $P_{SHG} \propto N^2$.

Dans le cas idéal, lorsque l'excitation est réalisée en onde plane (faisceau non convergent), les molécules émettent en phase et toutes les ondes HRS interfèrent constructivement. En toute rigueur, ceci n'est vrai que pour un milieu dont l'épaisseur est inférieure à la longueur de cohérence du phénomène de doublage de fréquence [Bloembergen, 1962], mais cette limite n'est jamais atteinte en microscopie, où la SHG est localisée dans la PSF de l'objectif.

Par contre, en lumière convergente, la phase de l'onde subit un déphasage de π lors du changement de signe du rayon de courbure du front d'onde au passage du foyer géométrique. C'est le déphasage de Gouy caractérisé par le paramètre ξ [Born & Wolf, 1993]. Ces effets ont des conséquences importantes sur la distribution spatiale de l'émission SHG résultante. En effet, les conditions d'accord de phase forcent la SHG à se propager avec un angle $\theta_{pic} = \pm \arccos(\xi n_\omega / n_{2\omega})$ par rapport à la direction du faisceau incident, selon deux lobes symétriques bien définis, comme le montre la figure 1.9. n_ω et $n_{2\omega}$ correspondent aux indices des milieux d'incidence et de propagation de l'onde.

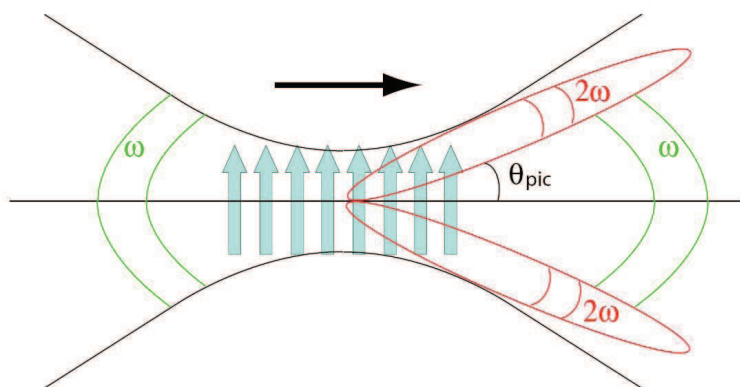


FIGURE 1.9 : Génération de seconde harmonique à partir d'un faisceau focalisé dans le cas où les molécules sont distribuées uniformément. Dans ce cas, la SHG se propage hors axe dans les deux lobes symétriques bien définis. Les fronts d'ondes sont indiqués. [Mertz, 2001]

L'aspect directionnel de l'émission SHG permet, en l'absence de diffusion du milieu, une plus grande efficacité de collection qu'en microscopie TPEF où le signal de fluorescence est émis de façon isotrope dans toutes les directions ($4\pi sr$). Notons également que s'il existe des inhomogénéités axiales dans la distribution des molécules, la SHG peut également se produire vers

l'arrière [Freund, 1986] ; [Mertz, 2001]. [Zipfel, 2003b] et ses collaborateurs ont illustré la variation théorique du rapport entre le signal SHG émis vers l'avant et celui émis vers l'arrière en fonction de l'orientation et de la taille du diffuseur. L'existence d'un tel signal émis intrinsèquement vers l'arrière peut s'avérer d'une grande importance pour la microscopie *in vivo* et surtout pour la micro-endoscopie où la collecte du signal en transmission est impossible.

Ainsi, en microscopie de seconde harmonique, le signal SHG est plus intense quand il est généré par des molécules orientées parallèlement. Ce signal est plus facile à collecter, car il est plus directionnel. Enfin, compte tenu de la dépendance quadratique du signal avec l'intensité d'excitation, la microscopie SHG offre un volume d'excitation confiné et par conséquent, une résolution micrométrique comparable à la microscopie TPEF. Il est donc possible de combiner très simplement les deux techniques sur un même microscope et de réaliser une double imagerie TPEF/SHG simultanée, du fait que les deux signaux sont aisément séparables spectralement. La SHG est produite à $\lambda_{exc}/2$, dans une bande spectrale étroite déterminée par celle du laser ($\approx 10nm$ pour des impulsions de $150fs$ limitées par transformée de Fourier), alors que la fluorescence est toujours décalée au-delà de $\lambda_{exc}/2$. De plus, la SHG étant généralement collectée en transmission, et la TPEF en rétrodiffusion, la séparation spatiale de ces deux contrastes facilite également leur combinaison.

Les images TPEF/SHG acquises au cours de ces travaux de thèse l'ont été sur un microscope à balayage et développé au sein de l'équipe biophysique de l'Institut de Physique de Rennes. Nous présentons maintenant les caractéristiques de ce microscope multiphoton.

1.2.3 Dispositif expérimental

Le microscope multiphoton

Le microscope multiphoton développé à l'Institut de Physique de Rennes sur une base de microscope confocal OLYMPUS IX71 inversé est schématisé figure 1.10.

Le laser : La source lumineuse est un laser titane-saphir femtoseconde (*Ti:Sa*) (Mira900-Verdi5, Coherent, Saclay, France). Son spectre d'émission donné figure 1.11, a typiquement $200nm$ de large (en fonction de la puissance de pompe) et présente un maximum autour de $800nm$.

Le fonctionnement en régime femtoseconde de ce laser est obtenu par un blocage de modes passifs basé sur l'effet Kerr à l'intérieur du milieu actif, et par l'apport d'un filtre spatial dans l'oscillateur (magic mode locking). L'oscillateur *Ti:Sa* est pompé optiquement par un laser *Nd:YVO₄* (cristaux d'Orthovanadate d'Yttrium dopés Néodyme) doublé en fréquence intracavité émettant une puissance de $5W$ dans la raie à $532nm$. Le pompage optique de l'oscillateur à $532nm$ a un rendement de l'ordre de 15% permettant d'obtenir une puissance d'environ $750mW$ à $800nm$ en régime femtoseconde. On remarque que, même si la puissance moyenne est relativement faible, la puissance instantanée est de l'ordre de $50kW$ et l'intensité focalisée sur $1\mu m^2$ de $5.10^{12}W cm^{-2}$.

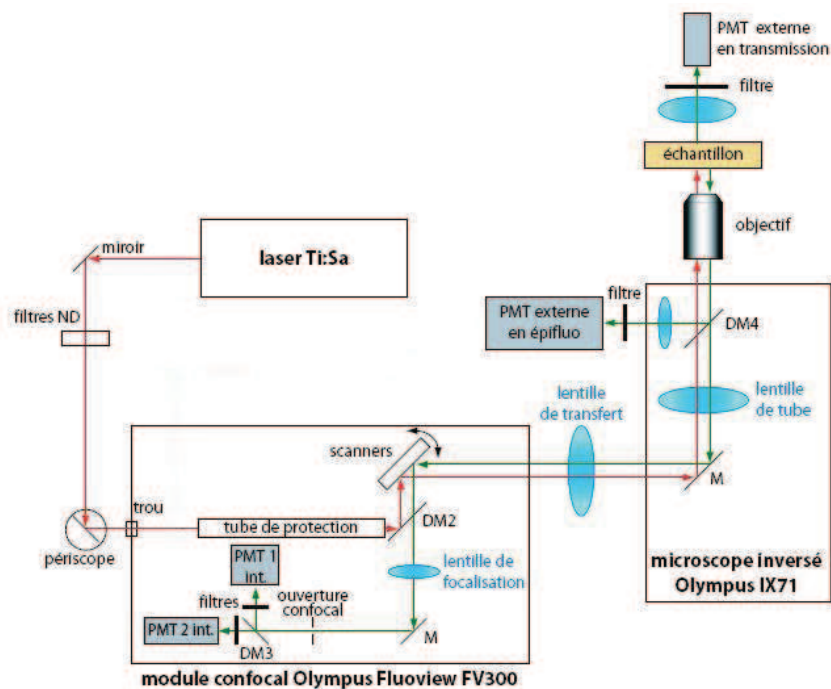


FIGURE 1.10 : Schéma du microscope confocal modifié

Le laser produit des impulsions d'une durée d'environ 200fs à une cadence de 76MHz (intervalle spectral libre de la cavité), accordables entre 680 et 980nm .

Concrètement, cela correspond à des séries de "paquets de photons" de $60\mu\text{m}$ de longueur, voyageant à la vitesse de la lumière et séparés les uns des autres de 4 mètres environ. Dans toutes nos expériences, le laser est accordé à la longueur d'onde de 810nm . En sortie, le faisceau laser est polarisé linéairement et horizontalement. Il est possible de récupérer une petite fraction de la puissance laser au travers d'une fuite résultant de la réflexion sur l'un des miroirs acheminant le faisceau vers le microscope, pour l'envoyer vers un spectromètre (USB2000, Ocean Optics Inc, Dunedin, FL, USA) et ainsi ajuster la longueur d'onde de travail et contrôler la largeur spectrale des impulsions qui témoignent du fonctionnement en régime femtoseconde. Un jeu de filtres à densité neutre proche infrarouge (ND 0.3; 0.6; 0.9; 1.5; 2) (Edmund Optics, York, UK) permet d'atténuer à volonté la puissance du laser. La densité du filtre doit être adaptée à l'objectif utilisé. La transmission globale du microscope à 810nm est de l'ordre de $T_{microsc} \approx 15\%$. A plus faible grossissement ($4\times$), on peut utiliser toute la puissance du laser sans endommager les échantillons (on a environ 100mW dans le volume focal de l'objectif). A plus fort grossissement, il est nécessaire d'atténuer le faisceau, par exemple avec un filtre ND 0.3 avec l'objectif $10\times$ ($T_{ND0.3} \approx 50\%$), jusqu'à ND 0.9 avec l'objectif $60\times$ ($T_{ND0.9} \approx 12\%$).

Balayage du faisceau : L'obtention d'une image complète nécessite le balayage du faisceau laser focalisé dans le plan focal de l'objectif. Ce balayage angulaire est réalisé par deux miroirs galvanométriques orthogonaux (balayage x et y) qui sont conjugués optiquement à la pupille

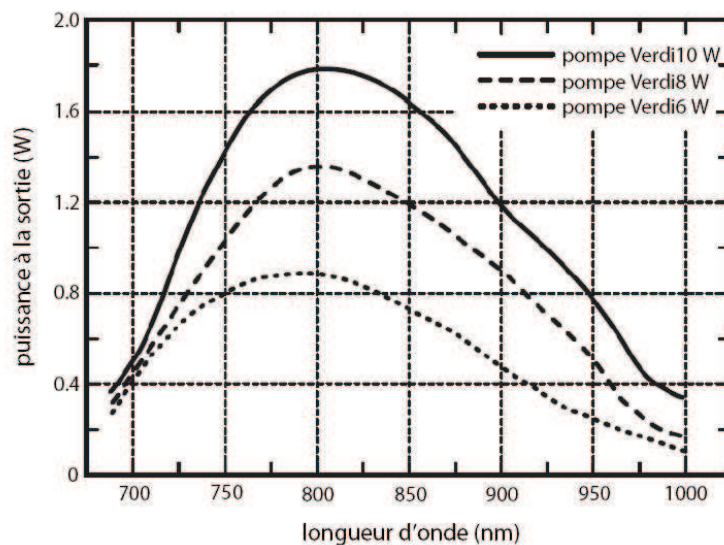


FIGURE 1.11 : Spectre d'émission du laser Ti : Sa en fonction de la longueur d'onde pour des puissances de pompes différentes (extrait du site : <http://www.coherent.com/downloads/MIRA900.pdf>).

d'entrée de l'objectif du microscope (6200H, Cambridge Technology (USA)). Ainsi, le faisceau laser pivote dans le plan de cette pupille, sans translation notable. Le faisceau est élargi au moyen d'un télescope permettant de modifier sa taille et sa divergence afin qu'il remplisse complètement la pupille arrière de l'objectif. Le télescope est constitué d'un premier groupe de lentilles positionnées à la suite du scanner (scan lens) dont le foyer image est confondu avec le foyer objet de la lentille de tube qui est placée dans le statif du microscope. Cette lentille de tube a une distance focale normalisée ($f_{tube} = 180mm$ chez Olympus). Le grossissement des objectifs est défini par le rapport entre la distance focale de cette lentille est celle des objectifs ($G = f_{tube}/f_{obj}$).

Avant d'atteindre l'objectif, le faisceau passe par un miroir dichroïque (675dxcru, Chroma Technology Corp., Rockingham, VT, USA) qui sert à séparer l'onde excitatrice de la fluorescence qui sera rétrodiffusée.

Pour les besoins de nos expériences, une lame demi-onde ($\lambda/2$) d'ordre 0 en quartz optimisée pour $830nm$ (F46-413, Edmund Optics, UK) ou achromatique dans la gamme $700 - 1000nm$ en quartz et MgF_2 (F46-561, Edmund Optics, UK) est placée sous l'objectif, en lieu et place de la roue porte-filtres utilisée pour la microscopie de fluorescence en champ large. L'orientation de cette lame est contrôlée à l'aide d'une platine de rotation (PR50CC, Newport) pour modifier précisément et automatiquement la polarisation du laser dans l'échantillon. Le choix de la lame et sa caractérisation sont discutés dans le chapitre suivant, section 2.4.2.

Les objectifs utilisés sont de marque Olympus (4X, $NA = 0.1$; 10X, $NA = 0.25$; 60X, $NA = 1.2$). L'ouverture numérique NA (Numerical Aperture) est la capacité d'un objectif de microscope à focaliser et/ou collecter des rayons sous des angles compris entre 0 et θ_{NA} avec

$NA = n \sin \theta_{NA}$. Le NA d'un objectif doit être aussi grand que possible et ce pour deux raisons qui sont liées aux propriétés fondamentales de diffraction de la lumière :

- alors que l'extension latérale de la PSF s'approxime comme NA^{-1} , l'extension axiale diminue comme NA^{-2} et donc le volume focal diminue comme $\frac{1}{NA^3}$.
- l'efficacité de collection η_{coll} de la fluorescence augmente typiquement comme NA^2 (en l'absence de diffusion : $\eta_{coll} = \frac{1}{2}(1 - \cos \theta_{NA}) \approx \frac{\theta_{NA}^2}{4} \approx \frac{NA^2}{4n^2}$).

Les objectifs à immersion d'huile offrent le meilleur NA (jusqu'à 1.4) mais ne sont pas adaptés à l'observation *in vivo* en profondeur. En effet, l'utilisation d'huile pour augmenter le NA d'un objectif engendre des aberrations sphériques importantes à forte profondeur dans les milieux biologiques car l'indice de réfraction de l'huile est très différent de celui des milieux observés. Il est donc préférable d'utiliser des objectifs à immersion d'eau (indice de l'eau proche de l'indice des milieux biologiques observés), offrant un NA pouvant atteindre 1,2, engendrant donc peu d'aberrations, permettant ainsi des observations à plusieurs centaines de μm de profondeur dans les milieux biologiques.

La profondeur d'imagerie est modifiée par translation verticale (axe z) de la crémaillère de la platine porte-objet. Sa motorisation est contrôlée par le logiciel du microscope, permettant de réaliser automatiquement des piles d'images (stacks) avec une résolution de $0.1\mu m$. Une platine de translation Märzhäuser (Wetzlar, Allemagne) permet de déplacer l'échantillon suivant les axes x et y (résolution $0.1\mu m$). Le signal généré au point focal est détecté en transmission à travers un condenseur adapté ($NA_{cond} \approx NA_{obj}$ pour la SHG), ou alors en épiscollection (TPEF) par l'objectif imageur.

Détection : Dans tous les cas, à la détection, ces signaux sont débarrassés de l'excitatrice grâce à un filtre infrarouge (BG39, SCHOTT). Il est important de connaître le nombre de photons émis dans le volume focal par l'excitatrice à $810nm$ pour savoir comment la filtrer efficacement. Un calcul rapide permet de rendre compte de l'importance du choix de ce filtre : nous avons vu que les impulsions femtosecondes cadencées à $76MHz$ génèrent une puissance moyenne $\bar{P} \approx 100mW$ au foyer de l'objectif $4\times$ par exemple. La loi de Planck permet de relier la fréquence d'un rayonnement ν (en Hertz) à l'énergie E du photon (en Joules), par la relation : $E = h\nu$, où h est la constante de Planck. Or, $\nu = c/\lambda$ (c étant la célérité de la lumière dans le vide) et le laser étant accordé à $810nm$, l'énergie d'un photon est donc égale à $E = 2.4 \cdot 10^{-19}J$, ou $\approx 1.5eV$. La puissance moyenne étant le produit du nombre de photons par l'énergie d'un photon (en Joules), par la cadence des impulsions, on en déduit que le nombre de photons excitateurs susceptibles d'être détectés est de l'ordre de $N \approx 10^{10}$. La transmission d'un filtre infrarouge type BG39 de $1mm$ d'épaisseur, à la longueur d'onde $810nm$, est $T_{BG39-1mm}^{810nm} = 1.3 \cdot 10^{-5}$. Cela signifie qu'avec un tel filtre, environ 10^5 photons seront détectés. Le filtrage adéquat pour s'affranchir de l'excitatrice se compose donc de deux filtres BG39 d' $1mm$ d'épaisseur, avec $[T_{BG39-1mm}^{810nm}]^2 = 1.7 \cdot 10^{-10}$, moins d'un photon excitateur sera détecté.

Si ce filtrage est nécessaire pour s'affranchir de l'excitatrice à $810nm$, il n'est pas suffisant

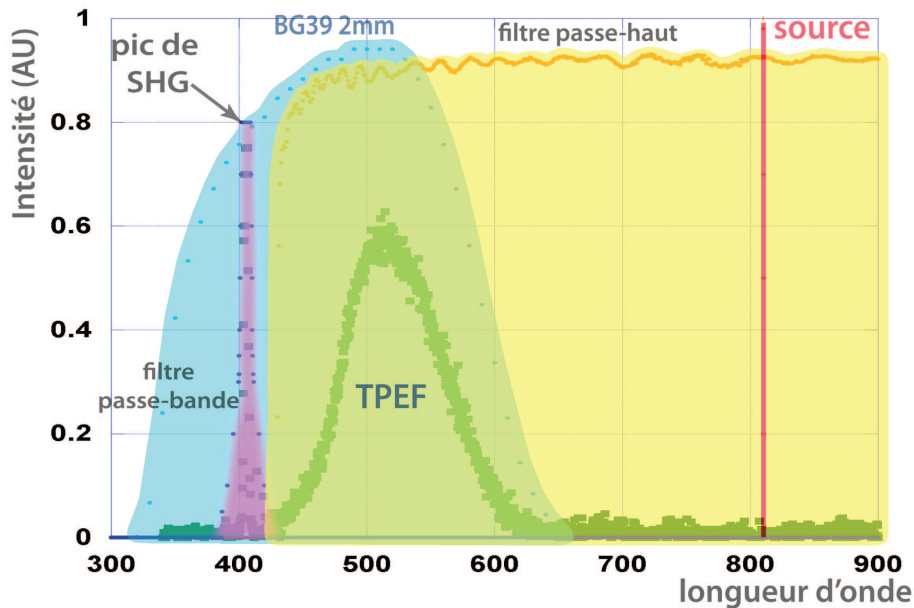


FIGURE 1.12 : Spectre d'émission TPEF et SHG de tissu biologique excité à 2 photons à 810nm . Sélection spectrale par filtrages pour une excitation à 810nm : la TPEF est sélectionnée par un filtre BG39 2mm + un filtre passe-haut HQ430lp; la SHG est sélectionnée par un filtre BG39 2mm + un filtre passe-bande NT65-678.

pour ne détecter que la TPEF en rétrodiffusion (présence de SHG rétrodiffusée), ou que la SHG en transmission, la fluorescence étant émise dans toutes les directions. Les combinaisons des deux jeux de filtres mis en place sur chacune des voies sont illustrées figure 1.12, où la superposition des spectres de TPEF, de SHG ainsi que des filtres utilisés montre qu'il est possible d'isoler efficacement les signaux TPEF et SHG :

- Jeu de filtres de la voie TPEF : l'autofluorescence de la matière biologique excitée à deux photons à 810nm est en générale émise entre 450 et 600nm (spectre de la TPEF figure 1.12). En plus d'un BG39 de 2mm d'épaisseur qui admet une transmission de 94% à 450nm et de 58% à 600nm pour un maximum de 97% autour de 500nm , est ajouté un filtre passe-haut qui coupe les longueurs d'onde en dessous de 430nm . La fluorescence peut donc être détectée sans risque d'être perturbée par la SHG. La fluorescence, produite essentiellement dans le volume focal, contient le signal utile qui nécessite d'être largement amplifié au moyen d'un *tube photomultiplicateur* (PM). La voie de collection de la fluorescence est dite "descannée", c'est-à-dire que le signal de fluorescence détecté repasse par les scanners qui balayent le faisceau laser dans le plan focal de l'objectif. Pour augmenter significativement le champ de vue de notre système, une voie de collection non descannée (non débalayée) a été développée [Le Grand, 2008]. Le principe de cette voie non descannée est de collecter la lumière par épifluorescence, sans repasser par les scanners, en plaçant le détecteur (PM) dans un plan conjugué de la pupille de l'objectif du microscope. Contrairement à la voie classique descannée, on détecte les photons diffusés qui ont été collectés par l'objectif du fait

que le champ de vue du dispositif est proche de celui de l'objectif lui-même. L'amélioration apportée en terme d'efficacité de collection de la fluorescence est significative. Ces travaux sont rapportés dans la dernière partie de ce chapitre.

- Jeu de filtres de la voie SHG : en plus d'un BG39 de $2mm$ d'épaisseur qui admet une transmission de 88% à $405nm$, est ajouté un filtre interférentiel centré sur $405nm$, avec une largeur à mi-hauteur de $10nm$ (Edmund Optics, York, UK). Ce jeu de filtres permet donc de ne sélectionner que le signal issu de la génération de seconde harmonique. Pour collecter la SHG, on utilise en transmission un PM (H7844, Hamamatsu Photonics, Massy, France) refroidi thermo-électriquement. La sortie de ce PMT délivre un courant proportionnel à l'intensité détectée sur ce tube. Ce signal passe à travers un convertisseur courant-tension avec un gain de $10^6 VA^{-1}$, identique à celui des PM internes du microscope. [Oudin, 2009] ont montré qu'il était possible de réaliser des expériences de polarimétrie SHG avec en moyenne seulement un photon détecté par pixel.

Résolution du microscope multiphoton

Nous avons vu la résolution d'un microscope confocal en introduisant la notion de PSF. En imagerie multiphoton, au lieu du critère de Rayleigh, on préférera la largeur à mi-hauteur (FWHM) du carré de la réponse impulsionnelle optique du microscope (PSF^2). Les équations pour calculer les largeurs ω à $1/e$ des profils d'intensités latéraux (xy) et axiaux (z) aux carrés (comme indiqués sur la figure 1.13) sont données par [Zipfel, 2003a] :

$$\omega_{xy} = \begin{cases} \frac{0.320 \lambda}{\sqrt{2} NA} & \text{pour } NA \leq 0.7; \\ \frac{0.325 \lambda}{\sqrt{2} NA^{0.91}} & \text{pour } NA > 0.7; \end{cases} \quad \omega_z = 0.532\lambda \left[\frac{\sqrt{2 \ln 2}}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \right] \quad (1.1)$$

où ω_{xy} est la résolution latérale, ω_z la résolution axiale, λ la longueur d'onde d'excitation, n l'indice de réfraction du milieu excité et NA est l'ouverture numérique de l'objectif.

Le volume d'excitation à deux photons est donné, en intégrant la PSF^2 , par

$$V_{xyz} = \pi^{3/2} \omega_{xy}^2 \omega_z \quad (1.2)$$

En pratique, nous estimons la résolution de notre système optique en déposant une fine couche de fluorophore en solution de *kiton red* (Exciton, Dayton, OH, USA), diluée à $10^{-4} mol/l$ dans de l'eau.

Compléments à la technique d'imagerie

Nous avons vu le procédé d'acquisition générale d'une image double TPEF/SHG de la même zone d'intérêt. Nous allons à présent décrire les différents outils logiciels que nous avons utilisés pour les traiter.

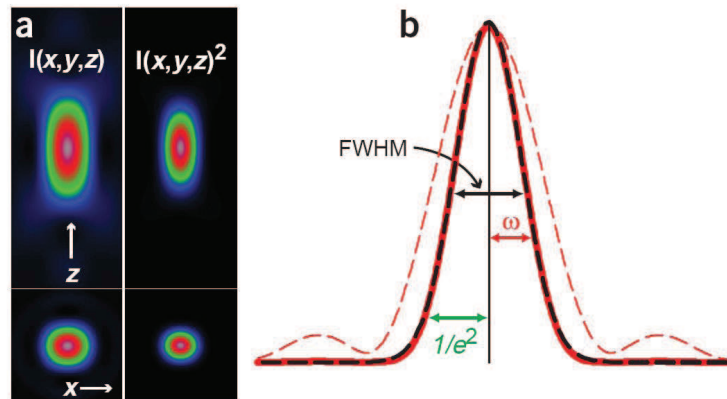


FIGURE 1.13 : Profils d'excitation à deux photons. (a) : Vues axiale et latérale des profils $IPSF$ et $IPSF^2$. Le carré de $IPSF$ permet de minimiser les effets de bord par rapport au centre. (b) : Profil axial $(0,0,z)$ de $IPSF$ (ligne rouge en pointillées) et $IPSF^2$ (ligne rouge pleine). La ligne noire en pointillées est un ajustement gaussien de la fonction. Figure tirée de [Zipfel, 2003a].

Les images échantillonnées sur 12-bit reconstruites par le logiciel d'acquisition Olympus Fluoview 4.3c sont sauvegardées sans compression au format *tiff*. Le nombre de bits accordé à l'échantillonnage du pixel détermine la précision numérique de la représentation. Un seul bit ne permet de représenter que des valeurs purement monochromes (noir ou blanc), tandis qu'un nombre plus élevé permet de coder un nombre plus important de niveaux de gris ou de couleurs distincts. La vitesse de balayage utilisée est la plus lente disponible, correspondant à un temps de résidence du laser sur l'échantillon par pixel d'environ $10\mu s$, soit un temps d'acquisition de 2,64s pour une image plein champ de 512×512 pixels. Il est possible d'échantillonner plus précisément, en 1024×1024 ou encore 2048×2048 pixels pour une image, ce qui peut devenir très coûteux en temps d'acquisition et en espace mémoire. Nous discuterons des compromis à faire en fonction de ce que l'on veut observer.

Les différents traitements d'image ont été réalisés à l'aide de scripts MATLAB (The MathWorks, Natick, MA) développés en routine par nos soins. Nous avons également utilisé le logiciel libre de droits ImageJ [W. Rasband, National Institute of Health, USA] permettant d'effectuer différentes opérations, comme construire un volume en trois dimensions à partir d'une pile d'images acquises à différentes profondeurs dans l'échantillon. Ce logiciel permet également d'écrire des macros (suite d'instructions comprises par le logiciel et qui permettent d'automatiser un traitement par exemple). En règle générale, nous préférons utiliser MATLAB pour les traitements d'images car contrairement à ImageJ, tous les paramètres de traitements sont ajustables. Enfin, au cours de ces trois ans de thèse, nous avons cherché à automatiser au maximum les expériences. La plupart des expériences présentées dans la suite de ce manuscrit sont à réaliser plusieurs fois, le plus précisément possible pour éviter tout artefact pouvant provenir d'un paramètre mal contrôlé. En particulier, la variation de paramètres extérieurs (polarisation du laser, contrôle du déplacement des échantillons) a pu être contrôlée par le logiciel LABVIEW (National Instrument Corporation, Austin, TX, USA), comme nous le verrons dans le chapitre

suivant.

Nous présentons à présent les travaux de simulations numériques portant sur l'efficacité de collection comparée des voies NDS et DS, ainsi que sur l'influence de la fluorescence générée hors volume focal dans un milieu diffusant.

1.3 Profondeur d'imagerie en microscopie multiphoton : simulations numériques

La microscopie biphotonique opérant dans le domaine du proche infrarouge pour l'excitation et dans le visible pour la fluorescence émise, c'est le phénomène de diffusion de la lumière qui limite fondamentalement la profondeur d'imagerie, et non l'absorption qui peut être négligée. La diffusion intervient à la fois au niveau de l'excitation et de la collection. Le traitement de l'excitation est relativement complexe car il fait intervenir la dispersion spatiale et temporelle de l'impulsion de pompe, contrairement au phénomène de collection qui ne fait intervenir que la dispersion spatiale. Néanmoins, l'excitation et la collection sont deux phénomènes découplés et il est donc possible de traiter la collection indépendamment de l'excitation.

Dans un premier temps, nous avons simulé numériquement les efficacités de collection de la TPEF des voies descannée (DS) et non descannée (NDS) implémentées sur le microscope multiphoton. Dans un second temps, nous avons cherché à comprendre l'influence de la génération de fluorescence hors du volume focal de l'objectif. Ces simulations numériques ont été initialement développés dans le cadre de la thèse d'Aymeric LERAY au sein de l'équipe biophysique de l'Institut de Physique de Rennes [Leray, 2005].

1.3.1 Efficacités de collection comparées des voies descannée et non descannée

Efficacité de collection

L'efficacité de collection du microscope est le ratio entre le nombre de photons collectés par le microscope et le nombre total de photons émis par les différentes sources de fluorescence excitées dans l'échantillon. L'efficacité de collection η_0 d'un objectif de microscope d'ouverture numérique NA vis-à-vis d'une source ponctuelle isotrope placée en son foyer est donnée, en l'absence de pertes optiques (absorption, diffusion, réflexion), par :

$$\eta_0 = \frac{N_{\text{coll}}}{N_{\text{émis}}} = \frac{\Omega_{NA}}{4\pi} = \frac{1 - \cos \theta_{NA}}{2}, \quad (1.3)$$

où $N_{\text{coll}}/N_{\text{excit}}$ exprime le rapport du nombre de photons collectés au nombre de photons émis, et Ω_{NA} l'angle solide sous-tendu par le demi-angle d'ouverture θ_{NA} de l'objectif (cf figure 1.14).

Lorsque le milieu devient très diffusant, les photons qui en émergent ont subi de nombreuses diffusions et ont totalement perdu la mémoire de leur condition d'émission. Dans cette limite diffusive, un modèle unidimensionnel de diffusion dans un milieu diffusant semi-infini limité par une surface lisse conduit à l'expression suivante de l'efficacité de collection η_d [Beaurepaire, 2002] :

$$\eta_d \cong (1 - \cos \theta_{NA}) \left(1 - \cos^2 \left(\frac{r_{fov}}{ud} \right) \right) = 2\eta_0 \left(1 - \cos^2 \left(\frac{r_{fov}}{ud} \right) \right)$$

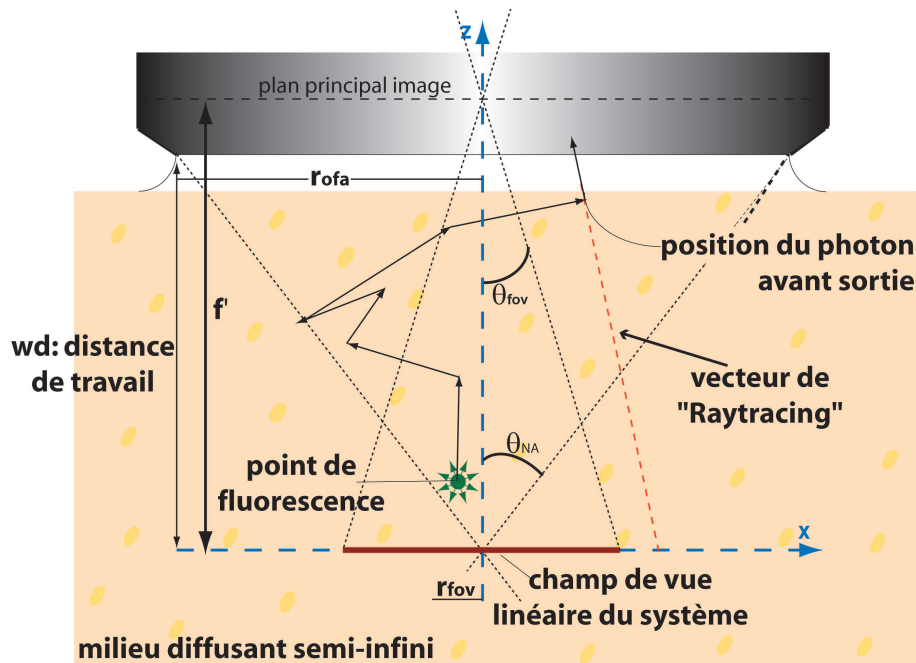


FIGURE 1.14 : Principe de la collection avec conditions. Dans ce cas précis, le photon qui a subi six diffusions, n'est pas considéré comme collecté car il ne fait pas partie du champ de vue du système, bien qu'il atteigne la lentille frontale de l'objectif.

La profondeur d'imagerie z_0 correspond ici à la distance de travail wd de l'objectif (le milieu diffusant est donc en contact avec la lentille de l'objectif) et r_{fov} est le rayon du champ de vue du système de collection (paramètres représentés sur la figure 1.14).

Dans le cas où $r_{fov} \ll wd$, ce qui est toujours vrai pour les objectifs à grande distance de travail et dans la limite diffusive, l'efficacité de collection η_d est proportionnelle au carré du champ de vue du système de collection :

$$\eta \cong \frac{2\eta_0 r_{fov}^2}{wd^2}$$

Pour comprendre l'influence des différents paramètres (tels que la profondeur d'imagerie, le champ de vue et coefficient de diffusion) sur le ratio N_{coll}/N_{emis} , il faut pouvoir calculer ce ratio en fonction des variations de ces paramètres. Ces variations sont relativement faciles à simuler numériquement, nous avons donc pu effectuer les simulations rendant compte du gain apporté par le mode de collection non descanné, lié à l'augmentation du champ de vue par rapport à celui du mode descanné.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'implémentation d'une voie de collection non descannée sur notre microscope multiphoton a permis d'augmenter le champ de vue du système, se rapprochant de celui des objectifs eux-mêmes, en étant plus de 20 fois supérieur à celui de la voie interne (voie confocale descannée en l'absence de diaphragme). Cette amélioration est

sans effet en l'absence de diffusion. Elle conduit néanmoins à un gain en efficacité de collection proportionnel au carré du champ de vue, dans la limite diffusive. En revanche, dans les régimes intermédiaires de diffusion correspondant aux profondeurs d'imagerie z_0 usuellement atteintes en microscopie multiphotonique, c'est-à-dire aux profondeurs voisines de la longueur de diffusion effective des photons ($z_0 \approx l_s/(1-g)$), l'efficacité de collection n'est pas quantifiable analytiquement.

De nombreux travaux relativement récents [Daria, 1998] ; [Elias & Elias, 2002] abordent ce problème, généralement à partir de simulations Monte Carlo [Beaurepaire, 2002] ; [Deng, 2002], et parfois expérimentalement [Gan, 1998] ; [Oheim, 2001]. De par leur souplesse, les méthodes de simulation Monte Carlo (MC) sont bien adaptées pour rendre compte de ces phénomènes de propagation. Sans rentrer ici dans le détail des calculs mis en œuvre (cf. A), nous résumons le principe des simulations Monte Carlo appliquées à la collection de la fluorescence excitée à deux photons.

Méthode Monte Carlo et principe de la diffusion des photons

Les méthodes Monte Carlo (MC) sont très utilisées pour simuler de nombreux problèmes dans beaucoup de domaines (finance, sciences physiques...). Un énoncé de son principe a été proposé par Lux et al : *"dans toutes les applications de la méthode Monte Carlo, on suppose que la quantité physique que l'on veut déterminer est la valeur moyenne d'une variable aléatoire. Si l'on est capable de bâtir un modèle stochastique de cette variable aléatoire, alors il sera possible de remonter à la valeur moyenne en simulant de manière appropriée différentes réalisations indépendantes de cette variable aléatoire."*

Ainsi, l'un des éléments clé d'une simulation MC est un générateur de nombres aléatoires à distribution uniforme entre 0 et 1. Comme la méthode est par nature statistique, un grand nombre d'échantillons est indispensable pour obtenir un résultat fiable, ce qui est coûteux en temps de calcul. L'optimisation des routines que nous avons implémentées en langage vectoriel Matlab est alors un élément essentiel à prendre en compte.

La méthode que nous avons choisie est de considérer que les photons se comportent comme des particules, de vitesse constante c , diffusés par les inhomogénéités de la matière. Cela revient à un problème de diffusion en trois dimensions par un milieu semi-infini, dépendant principalement de la loi de distribution du libre parcours moyen et de l'anisotropie de la diffusion.

Les principes de la propagation de photons que nous avons implémentés s'inspirent des programmes en langage C, de type Monte Carlo, développés par S.L. Jacques¹ pour des applications biomédicales. Les détails concernant le principe utilisé pour simuler la propagation des photons en milieu turbide ainsi que les conditions de collection de ces mêmes photons sont donnés annexe A.

1. disponible sur le site : <http://omlc.ogi.edu/classroom/ece532/class4/ssmc/mc321.c>

Comparaison entre théorie et expérience

Au niveau des efficacités de collection, la seule quantité accessible expérimentalement est le rapport η_{DS}/η_{NDS} des efficacités de collection en mode descanné et non descanné, et non chacune de ces quantités. En effet, ce qu'on mesure est le résultat d'un processus d'excitation et d'un processus de collection. Néanmoins, comme ces deux processus sont indépendants et que l'excitation est la même pour les deux modes de collection (même objectif et même source laser), le rapport entre les signaux collectés selon les deux modes ne dépend pas de l'excitation. Les mesures expérimentales des signaux TPEF collectés selon les deux voies correspondantes du microscope multiphoton ont été réalisées en fonction de la profondeur d'imagerie sur du tissu hépatique provenant d'un modèle murin, selon un protocole décrit dans la thèse de doctorat d'Aymeric LERAY [Leray, 2005], et présentés figure 1.15.

Pour les simulations MC correspondantes, il est nécessaire de disposer, outre des paramètres des objectifs eux-mêmes (distance de travail wd pour *work distance* et rayon de la lentille frontale r_{ofa} pour *optical front aperture*), des champs de vue des voies de collection DS et NDS notés θ_{fov}^{DS} et θ_{fov}^{NDS} respectivement. Les paramètres utilisés sont, pour l'objectif Olympus PlanApo 60X à immersion d'eau : $wd = 2.0 \text{ mm}$; $r_{ofa} = 1.8 \text{ mm}$; $r_{fov}^{NDS} = 320 \text{ }\mu\text{m}$; $r_{fov}^{DS} = 14 \text{ }\mu\text{m}$.

Nous avons donc pu comparer l'expérience avec les courbes théoriques obtenues par simulation MC. Ainsi, dans le but d'évaluer les performances des voies DS et NDS, nous avons tracé la valeur moyenne en intensité des 31 images acquises en fonction de la profondeur (de 0 à $60\mu\text{m}$) en utilisant le programme *Plot Z-axis profile* sous le logiciel ImageJ [Abramoff, 2004] comme le montre la figure 1.16.

Les courbes ainsi obtenues, figures 1.15e) et f), montrent clairement une meilleure collection de l'intensité sur la voie non descannée, au fur et à mesure que la profondeur d'imagerie augmente. La figure 1.16a) présente les intensités moyennes des images acquises selon les deux voies de collection en fonction de la profondeur d'imagerie. Le ratio de ces intensités moyennes des modes NDS et DS est donné figure 1.16b).

On s'attend à ce que ce rapport soit représentatif de celui des efficacités de collection NDS sur DS et ce, indépendamment du profil d'excitation de notre système (efficacité d'excitation en fonction de la profondeur d'imagerie). Différentes simulations MC du rapport η_{DS}/η_{NDS} ont été réalisées afin de rechercher le couple de valeurs (μ_s^{coll}, g^{coll}) conduisant au meilleur accord avec l'expérience, μ_s^{coll} étant l'inverse du libre parcours moyen de diffusion l_s , et g^{coll} le coefficient d'anisotropie du milieu. On observe alors un très bon accord entre les données expérimentales et le résultat de la simulation MC pour le couple $\mu_s = 105\text{cm}^{-1}$ et $g = 0.8$. Ces valeurs ont été obtenues à partir d'une grille de recherche où on a fait varier μ_s entre 100 et 110cm^{-1} par pas de 1cm^{-1} pour une valeur fixée de g entre 0.7 et 0.9, par pas de 0.05. Ces paramètres de diffusion sont en accord avec ceux que l'on peut trouver dans la littérature pour du tissu hépatique murin [Cheong, 1990]. On remarque que $\eta_{NDS}/\eta_{DS} \approx 1.25$ à la profondeur 0 (point focal à la surface de l'échantillon), tandis que ce ratio vaut 2.2 pour une profondeur d'imagerie de seulement $60\mu\text{m}$. Pour une profondeur d'imagerie $z_0 = 4 \times l_s \approx 380\mu\text{m}$, nos simulations MC

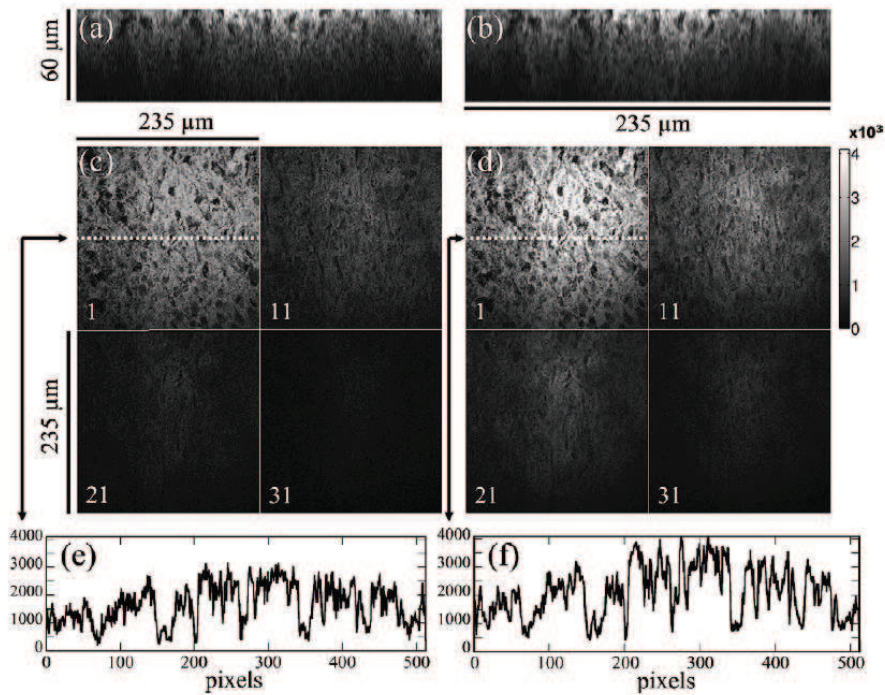


FIGURE 1.15 : (images du haut) Projection XZ de l'autofluorescence d'un foie de souris non marqué reconstruit à partir d'une pile de 31 images en Z acquises par pas de $2\mu\text{m}$ jusqu'à $60\mu\text{m}$ au dessous de la surface de l'échantillon en utilisant a) la voie DS et b) la voie NDS du microscope multiphotonique équipé d'un objectif $60\times - NA1.4$ à immersion d'huile. c-d) 4 images tirées des piles en Z, tous les $10\mu\text{m}$, sur les voies DS et NDS respectivement. Le nombre indique le rang de l'image dans la pile. e-f) profils d'intensités tirés des lignes en pointillés sur les images c1) et d1) respectivement.

prédisent un ratio η_{NDS}/η_{DS} d'environ 40 pour une efficacité de collection absolue des voies DS et NDS respectivement de 1% et 40% de celle trouvée à la surface de l'échantillon. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication en 2008 dans *Optics Communications* à laquelle j'ai participé [Le Grand, 2008]. Néanmoins, pour atteindre de telles profondeurs d'imagerie dans un tissu biologique sans marquage, tout en préservant la résolution optique, il devient nécessaire d'utiliser des méthodes d'optique adaptative pour compenser la distorsion des fronts d'onde au point focal [Marsh, 2003] ; [Leray, 2006b] et de supprimer la génération de fluorescence hors foyer, fluorescence parasite qui peut dépasser la fluorescence utile, comme nous allons le voir à présent.

1.3.2 Distribution spatiale de l'efficacité de collection de la fluorescence

Quand on image en profondeur dans un milieu fortement diffusant, on peut observer de l'excitation de la fluorescence à deux photons en dehors du foyer du microscope, comme le montre la figure 1.17 obtenue sur un système modèle (fluorophore en solution). Cette génération de fluorescence hors foyer est difficilement quantifiable expérimentalement. Il apparaît alors intéressant

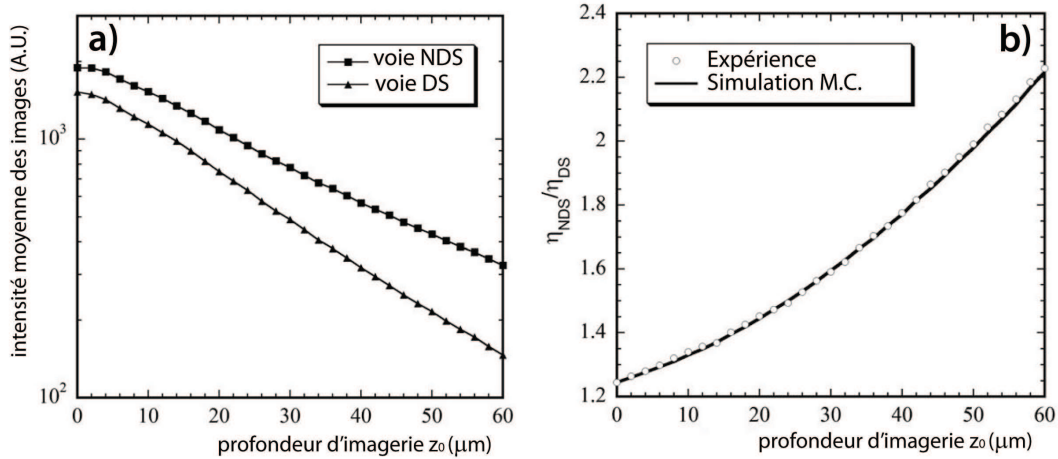


FIGURE 1.16 : a) Profils en Z de l'intensité moyenne d'une pile de 31 images, acquise par pas de $2\mu\text{m}$, d'une couche épaisse de foie de souris détectée par les voies DS et NDS de notre microscope. Les lignes en plein sont des guides pour améliorer la lecture. b) Ratio des efficacités de collection NDS sur DS en fonction de la profondeur d'imagerie. La simulation Monte Carlo est tracée en ligne pleine avec comme paramètres $\mu_s = 105\text{cm}^{-1}$ et $g = 0.8$. Pour l'optique, les paramètres sont ceux de l'objectif $60x - NA1.4$ utilisé pour l'expérience.

de simuler numériquement la distribution spatiale de cette fluorescence émise, et l'efficacité de collection du microscope multiphoton correspondante, de manière à pouvoir comparer la fluorescence parasite détectée qui en résulte, à la fluorescence utile issue du foyer et formant l'image après balayage du plan focal.

Fluorescence produite hors foyer en milieu diffusant

La série d'images de la figure 1.17 obtenues au laboratoire illustre ce phénomène. Une cuve remplie d'un fluorophore (sulforhodamine B) présentant une forte section efficace d'absorption à deux photons est éclairée par un objectif de microscope à air, par le faisceau du laser Ti : Sa accordé à 800nm . L'image de gauche montre la localisation intrinsèque de l'excitation observée généralement lorsque le milieu fluorescent diffuse peu. Pour obtenir l'image du centre, nous avons dilué une petite quantité d'IntralipidTM (Kabivitrum Inc., California and Stockholm) dans la solution fluorescente de départ afin d'obtenir un coefficient de diffusion comparable à celui d'un tissu biologique et permettant d'obtenir une épaisseur optique $\mu_s^{exc} z_0$ de l'ordre de 5 (profondeur d'imagerie z_0 égale à 5 fois le libre parcours moyen de diffusion des photons μ_s^{-1}). Il en résulte une diminution très forte de l'intensité de fluorescence produite au foyer de l'objectif, en $\exp(-2\mu_s z_0)$, compensable par une augmentation de la puissance laser injectée pour retrouver le niveau de fluorescence initial au foyer. Dans ce cas, on voit apparaître à l'entrée de la cuve, sur l'image du centre, la "trace" de fluorescence du diabolisme d'excitation de l'objectif.

Ce phénomène montre clairement que dans ce régime de diffusion ($\mu_s^{exc} z_0 \approx 5$), la fluorescence

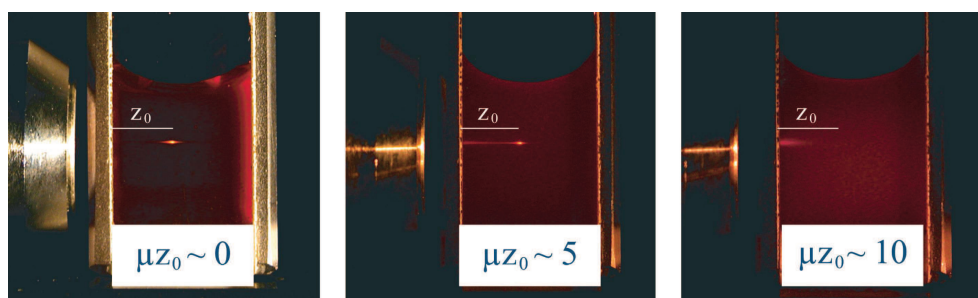


FIGURE 1.17 : Mise en évidence d'un signal de fond généré par l'excitation hors foyer dans une cuve de fluorophore présentant une forte section d'absorption à deux photons éclairée via un objectif de microscope à air, par le faisceau du laser Ti : Sa accordé à 800nm. Image de gauche : $\mu_s^{exc} z_0 \approx 0$, localisation intrinsèque de l'excitation. Image du centre : épaisseur optique $\mu_s^{exc} z_0 \approx 5$, apparition du signal de fond généré par l'excitation hors foyer. Image de droite : $\mu_s^{exc} z_0 \approx 10$, disparition complète de la fluorescence au foyer, aucun photon balistique n'arrive au foyer.

produite par excitation biphotonique dans les premières couches de l'échantillon est susceptible de produire un signal de fond comparable au signal utile issu du foyer de l'objectif. L'image de droite enfin, est obtenue après avoir rajouté à nouveau la quantité d'IntralipidTM nécessaire à obtenir une épaisseur optique d'environ 10 pour le foyer. Dans ce cas, la fluorescence au foyer disparaît complètement et ce, même à puissance laser maximale. En revanche, la fluorescence produite à l'entrée de la cuve, peu sensible à la diffusion, change peu. Cette fluorescence parasite est susceptible d'être détectée par notre système car comme nous l'avons vu, la collection en microscopie multiphoton se fait en champ large. Il est envisageable d'améliorer la sélectivité spatiale de la collection de la fluorescence émise au foyer au moyen d'une sélection partiellement confocale. Malheureusement, pour une profondeur optique $\mu_s^{exc} z_0 \approx 5$ correspondant à une excitation dans l'infrarouge, la profondeur optique pour la collection de la fluorescence issue du foyer est $\mu_s^{exc} z_0 \approx 10$ dans le domaine du visible. Dans ces conditions proches de la limite diffusive, la réduction du champ de vue du système de collection se traduirait essentiellement par une diminution de l'efficacité de collection de tous les photons, y compris ceux provenant du foyer [Beaurepaire, 2002].

La simulation numérique s'avère alors indispensable pour quantifier cette fluorescence excitée au foyer, et en dehors du foyer. L'excitation de la fluorescence en milieu diffusant et régime impulsif a été étudiée expérimentalement et les mesures confrontées à des simulations Monte Carlo résolues en temps dans le cadre de la thèse d'A. LERAY [Leray, 2005] [Leray, 2006a]. Durant ma thèse, j'ai participé aux simulations Monte Carlo pour la collection de la fluorescence. Ces simulations sont indépendantes du temps puisque le processus de collection est linéaire, contrairement à l'excitation.

Distribution spatiale de l'efficacité de collection

Nous nous sommes donc intéressés à la simulation Monte Carlo de la distribution spatiale de l'efficacité de collection dans les conditions considérées précédemment pour l'excitation (objectif 60x à immersion d'eau, à la profondeur d'imagerie maximale $z_0 = wd = 2000\mu\text{m}$). Comme nous l'avons précisé plus tôt, dans nos simulations Monte Carlo les variables d'entrée du programme sont les paramètres de diffusion du milieu (coefficient de diffusion et libre parcours moyen), ainsi que les caractéristiques optiques de l'objectif (champ de vue notamment) et de la voie de collection du microscope, contrairement à l'excitation. Une représentation en trois dimensions de l'efficacité de collection simulée $C(\rho, z)$ est donnée figure 1.18, considérant le profil de collection de la voie NDS. La courbe correspondant à la voie DS n'est pas donnée ici, le profil étant très similaire avec un plus grand bruit statistique, dû à la beaucoup plus faible efficacité de collection de cette voie (voir l'étude η_{DS}/η_{NDS} plus haut).

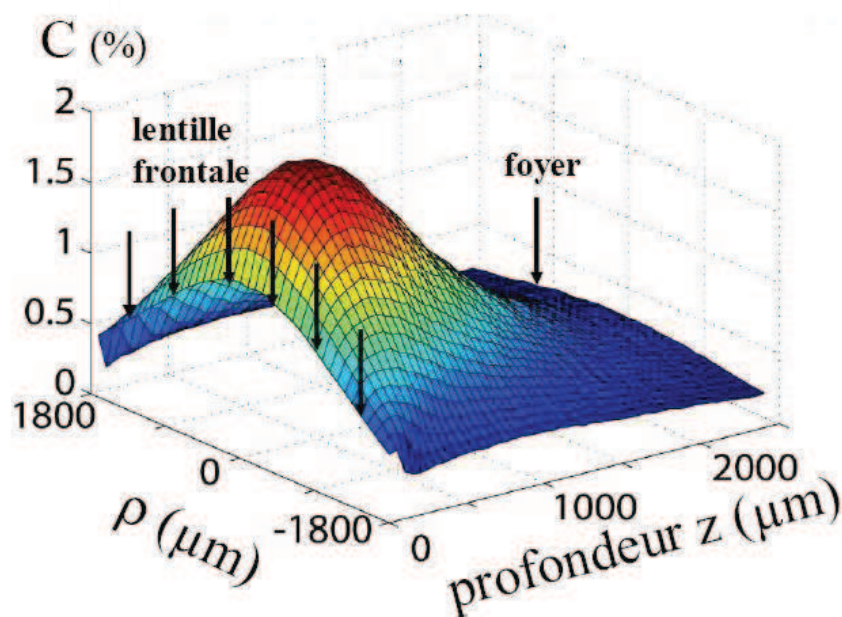


FIGURE 1.18 : Simulation Monte Carlo de la distribution spatiale de l'efficacité de collection. En $z = 0$, la lentille frontale de l'objectif du microscope est à la surface de l'échantillon, et en $\rho = 0$, on se trouve sur l'axe optique du système.

On constate que l'efficacité de collection est fortement dépendante de la position de la source fluorescente en z ainsi que de sa distance ρ de l'axe optique. En particulier, l'efficacité de collection de la fluorescence émise au point focal pour notre simulation, à $2000\mu\text{m}$ de la surface du milieu diffusant, est trois fois plus faible que le maximum observé hors point focal, à environ $400\mu\text{m}$ de la surface. En d'autres termes, on constate que le processus de collection favorise la collection de la fluorescence produite en dehors du plan focal (entre le point focal et la surface du milieu diffusant), au détriment de la fluorescence issue du volume focal.

En microscopie à deux photons, il est coutume de dire que l'excitation quadratique de la fluorescence la confine au volume focal du microscope, permettant ainsi la collection de cette fluorescence en champ large. Néanmoins, comme nous l'avons montré, la profondeur d'imagerie en milieu diffusant est limitée par l'excitation de la fluorescence en dehors du foyer et par sa collection qui se fait préférentiellement au voisinage de la surface de l'échantillon. Fort heureusement, ce "fond" de fluorescence généré et collecté hors foyer n'est pas du bruit, et on peut envisager de s'en affranchir par des méthodes de soustraction basées sur des concepts d'optique adaptative [Leray, 2006b].

Microscopie multiphotonique du collagène et de la myosine

Le collagène et la myosine comptent parmi les protéines fibrillaires les plus abondantes chez les vertébrés. Le collagène extra-cellulaire a un rôle structural fondamental au niveau du tissu conjonctif alors que la myosine est au cœur du mécanisme de contraction musculaire. Toute anomalie impliquant ces protéines peut avoir des conséquences organiques graves. Ces protéines possèdent une susceptibilité non-linéaire quadratique telle qu'il est possible de les imager de façon spécifique au sein des tissus par microscopie de seconde harmonique, sans marquage préalable. Nous présentons dans ce chapitre la composition, le rôle biologique de ces deux protéines fibrillaires, ainsi qu'un état de l'art des différentes études associées à ces structures fibrillaires menées à ce jour en microscopie multiphotonique. Nous présentons ensuite une méthode développée au laboratoire permettant la reconstruction de champs d'orientation de protéines fibrillaires par microscopie de seconde harmonique modulée en polarisation. Cette technique permet en fait de reconstruire les champs d'orientation de l'axe principal de la susceptibilité non linéaire associée aux fibres, en supposant une symétrie de type cylindrique pour la supramolécule "harmonophore", et un modèle planaire. Nous avons pu montrer, pour le collagène et la myosine, que cette orientation coïncide avec celle de la fibre. La méthode permet également de remonter à l'image des rapports des composantes de la susceptibilité non linéaire, $\rho = \chi_{zzz}/\chi_{zxz}$ et $\xi = \chi_{zxx}/\chi_{xzx}$, ainsi qu'à une image indépendante de la polarisation, ou image isotrope. Son contraste dépend principalement de la concentration en harmonophores. Le dispositif expérimental et les procédés d'automatisation qui ont été utilisés pour réaliser les images SHG et TPEF au cours de ces travaux de thèse sont également présentés dans ce chapitre.

2.1 Les collagènes

Le corps humain est constitué de deux sortes de protéines, les protéines fonctionnelles et les protéines structurales. Les protéines fonctionnelles jouent des rôles très divers au sein de la cellule et de l'organisme :

- * les protéines de transport, qui assurent le transfert des différentes molécules dans et en dehors des cellules,
- * les protéines régulatrices, qui module l'activité d'autres protéines,
- * les protéines de signalisation, qui captent les signaux extérieurs, et assurent leur transmission dans la cellule ou l'organisme,
- * les protéines motrices, permettant aux cellules ou organismes de se mouvoir.

D'autre part, les protéines structurales façonnent les organismes, les structurent et permettent à la cellule de maintenir son organisation dans l'espace. Parmi celles-ci, les collagènes sont particulièrement représentatifs. On parle "des collagènes" car il en existe différents types, se distinguant les uns des autres par les différentes combinaisons des trois chaînes polypeptidiques associées qui les composent.

2.1.1 Les différents types de collagènes

Les collagènes sont une famille de glycoprotéines fibreuses synthétisées et sécrétées par les cellules des tissus conjonctifs et divers autres types cellulaires. Ils représentent les protéines les plus abondantes de l'organisme, soit plus du quart de la masse protéique totale. Ils sont le principal constituant des tissus conjonctifs du corps humain (80%), qui servent à soutenir et à relier les autres tissus du corps [Di Lullo, 2002]. Leurs fonctions principales sont donc celles d'attache, d'enveloppe ou de remplissage, d'isolation et de protection ou encore du transport dans le cas du tissu sanguin. Nous retrouvons donc d'une part, du collagène dit *interstitiel* dans les tendons, les cartilages, les os, la peau et les vaisseaux sanguins, et d'autre part du collagène dit *péricellulaire* autour des cellules.

On peut classer les collagènes d'après leur organisation en collagène fibrillaires (composés de fibres, de fibrilles,...) et collagènes non fibrillaires. Les collagènes fibrillaires confèrent leur résistance à des tissus comme le tendon ou l'os. Les collagènes non fibrillaires forment des réseaux dans les membranes basales et sont impliqués dans l'architecture tridimensionnelle des fibres collagéniques, et s'organisent en plusieurs familles :

- a) les collagènes formant des réseaux,
- b) les collagènes FACIT (Fibril associated collagens with interrupted triple helix),
- c) les collagènes microfibrillaires,
- d) les collagènes formant des fibrilles d'ancrage,
- e) les collagènes transmembranaires ou MACIT (Membrane associated collagens with interrupted

triple helix),

f) les collagènes de la famille des multiplexines (multiple triple helix domain and interruption).

A ce jour, 29 types différents de collagène sont répertoriés, différant les uns des autres génétiquement, chimiquement et immunologiquement. Une fibre de collagène (diamètre de 10 à 100 μm) peut ne renfermer soit qu'un seul type de collagène, soit plusieurs; on parle alors de fibre de collagène hétérodyne [pour revue, Bailey & Ligth, 1989].

Parmi les grandes classes de collagène, celui de type I se trouve dans les os, la peau, les ligaments, les tendons, la cornée et les parois vasculaires, le type II se retrouve dans les cartilages, le type III dans les parois vasculaires et la peau, le type IV dans les lames basales participant à la formation de la membrane basale, et le type V dans la plupart des tissus interstitiels. Le tableau 2.1.1 décrit de manière plus complète le rôle associé aux différents types de collagènes.

Les collagènes fibrillaires sont de types I, II, III, V et XI, et parmi ceux là, le collagène de type I, que l'on extrait aisément à partir de tendon, a particulièrement été étudié au niveau structural en utilisant la diffraction par rayons X (RX) et la microscopie électronique. Dans la suite de ce manuscrit, le terme "collagène" se rapportera à celui de type I, sauf mention contraire.

2.1.2 Rôle biologique du collagène

Le rôle biologique du collagène est double. D'une part, avec l'élastine, les protéoglycanes et les glycoprotéines, il fait partie de la matrice extra-cellulaire (MEC) responsable de la cohésion des tissus et des organes. Dans certaines pathologies, la prolifération de MEC est le résultat d'une réponse cicatricielle suite aux agressions récurrentes subies par des organes (foie, rein, poumons...). D'autre part, les collagènes fibrillaires échafaudent des tissus comme le tendon, l'os (collagène I) et en association avec d'autres composantes de la matrice extra-cellulaire tels que l'élastine, ils apportent à la fois résistance et élasticité à des tissus comme la peau ou les parois vasculaires. Les collagènes non fibrillaires forment des réseaux dans les membranes basales (collagène IV), ils sont impliqués dans l'organisation tridimensionnelle des fibres collagéniques (collagènes IX, XII, XIV, ...) ou dans l'ancrage des tissus de recouvrement aux tissus conjonctifs sous-jacents (collagènes VII, XVII). Les altérations du collagène se répercutent sur le fonctionnement de nombreux tissus et organes.

2.1.3 Structure du collagène fibrillaire

La molécule de collagène a une structure caractéristique en triple hélice droite, formée de 3 chaînes polypeptidiques, les chaînes α . La forme mature de cette triple hélice longue de 300nm s'appelle le tropocollagène. Le domaine hélicoïdal de ces chaînes α présente une glycine tous les trois résidus. Cet acide aminé fait ainsi partie d'une unité tripeptidique (*GlyXY*) se répétant n fois et indispensable pour la conformation en hélice gauche de chaque chaîne α . Bien que chaque type ait sa propre et unique séquence d'acides aminés, tous sont principalement composés de glycine (*Gly*) pour 35%, de proline (*X*) pour 7 à 9% et d'hydroxyproline (*Y*) pour 12 à 14%

Type et structure	Distribution dans les tissus	Caractéristiques
<i>Collagènes fibrillaires</i>		
I, $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	os, derme, tendon, ligaments, cornée, organes internes.	90% du collagène d'un vertébré, trame de l'os
$[\alpha 1(I)]_3$	derme, dentine	forme mineure
II, $[\alpha 1(II)]_3$	cartilage, humeur vitrée, nucleus pulposus	majoritaire dans les cartilages
III, $[\alpha 1(III)]_3$	derme, muscle squelettique, parois des vaisseaux...	associé avec le type I
V, $\alpha 1(V), \alpha 2(V), \alpha 3(V)$	poumon, cornée, os...	tissus conjonctifs, associé au type I
XI, $\alpha 1(XI), \alpha 2(XI), \alpha 3(XI)$	cartilage, corps vitré, nucleus pulposus	associé avec le type II
<i>Collagène des membranes basales</i>		
IV, $[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV), \alpha 1-\alpha 6$	membranes basales	forme des réseaux 2D, n'est pas strié en microscopie électronique
<i>Collagène microfibrillaire</i>		
VI, $\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI)$	derme, cartilage, placenta, poumon, paroi des vaisseaux, nucleus pulposus	tissus conjonctifs, associé au type I
<i>Fibrilles d'ancrage</i>		
VII, $[\alpha 1(VII)]_3$	peau, jonction dermo-épidermiques, muqueuse orale, dermix	la forme des fibrilles permet l'accrochage de la lame basale au tissu conjonctif sous-jacent.
<i>Réseaux hexagonaux</i>		
VIII, $[\alpha 1(VIII)]_2\alpha 2(VIII)$	cellules endothéliales, membrane de Descemet	
X, $[\alpha 3(X)]_3$	cartilage hypertropique	minéralisé
<i>Collagènes FACIT</i>		
IX, $\alpha 1(IX), \alpha 2(IX), \alpha 3(IX)$	cartilage, corps vitré, cornée	associé avec le type II
XII, $[\alpha 1(XII)]_3$	ligament, tendon, périchondre	associé avec le type I et III
XIV, $[\alpha 1(XIV)]_3$	derme, tendon placenta, poumon, paroi des vaisseaux, foie	associé avec le type I
XIX, $[\alpha 1(XIX)]_3$	rhabdomyosarcome humain	
XX, $[\alpha 1(XX)]_3$	épithélium cornéen, tendon, peau au stade embryonnaire, cartilage costal	
XXI, $[\alpha 1(XXI)]_3$	paroi des vaisseaux sanguins	
<i>Collagènes transmembranaires</i>		
XIII, $[\alpha 1(XIII)]_3$	épiderme, follicule de cheveux, poumon, foie, chondrocytes, endomysium, intestin	
XVII, $[\alpha 1(XVII)]_3$	jonctions dermo-épidermiques	renforce l'ancrage de la lame basale
<i>Multiplexines</i>		
XV, $[\alpha 1(XV)]_3$	fibroblastes, cellules musculaires lisses, rein, pancréas	disséminés; près de la lame basale des muscles
XVI, $[\alpha 1(XVI)]_3$	fibroblastes, amnios, kératinocytes	
XVIII, $[\alpha 1(XVIII)]_3$	poumon, foie	collagène de jonction d'ancrage

TABLE 2.1 : Les différents types de collagènes. (tableau traduit à partir du site : <http://en.wikipedia.org/wiki/Collagen>, dernière mise à jour avril 2010.)

(selon le type). Le nombre de répétitions n varie également avec le type de collagène. Dans le cas du collagène fibrillaire, le domaine hélicoïdal est dit *collagénique*, c'est-à-dire un domaine sans interruption par des chaînes non hélicoïdales. Etant le plus petit acide aminé avec seulement un atome d'hydrogène dans sa chaîne latérale, la glycine occupe une position centrale dans l'hélice, tandis que X et Y ont leurs chaînes latérales orientées vers l'extérieur. Ceci permet un assemblage compact de 3 chaînes α pour former une triple hélice droite, la molécule de procollagène.

Les fibres de collagène sont constituées d'une multitude de très longues fibrilles et la distribution de leurs diamètres est directement reliée à leurs fonctions [Parry, 1984]. Ces fibres ont un diamètre variant entre 10 et 300nm, et des longueurs qui peuvent aller jusqu'à quelques centaines de μm . La structure fibrillaire du collagène montre une répétition de motifs en bande transversale caractéristique quand on l'observe au microscope électronique, d'une période proche de 67nm, comme le montre la figure 2.1.

Les molécules individuelles de collagène de 300nm de long sont axialement alignées dans la fibre selon le modèle de Hodge [Hodge, 1963], où la pseudo-périodicité interne de la molécule de collagène facilite le décalage des interactions moléculaires. Cet arrangement produit donc des changements réguliers de densité électronique, produisant les bandes caractéristiques de 67nm observées dans les fibres de collagène en microscopie électronique (figure 2.1c).

2.2 La myosine

La myosine, moteur moléculaire se fixant sur l'actine, est une protéine qui joue un rôle fondamental dans les mécanismes de la contraction musculaire. Elle se retrouve donc dans les cellules des vertébrés qui, associée à une actine, jouent un rôle de contraction, telles les cellules musculaires. Il existe plusieurs types de myosine, qui diffèrent par le nombre de "tête" (une -myosine V, IXb- ou deux -la plupart des autres myosines-), par la longueur des différentes parties. La myosine de type II est celle qui constitue l'appareil contractile du muscle strié squelettique. Un muscle strié est constitué de cellules musculaires comportant un important matériel contractile. Celui-ci se compose de nombreuses myofibrilles, structures tubulaires allongées d'un diamètre de 1 à 2 μm , constituées de myofilaments (filaments fins constitués d'actine associés à de la tropomyosine et de la troponine, et filaments épais constitués de myosine). Ces myofilaments sont disposés selon une organisation géométrique en trois dimensions extrêmement rigoureuse (figure 2.2).

Structure des myofilaments

Les fibres musculaires sont constituées de plusieurs myofibrilles dites striées du fait d'une alternance de bandes sombres et claires observées au microscope électronique et appelées respectivement bande A et bande I (figure 2.2). Au centre de chaque bande A, une zone plus claire est appelée zone H et le centre de chaque bande I est marqué par la présence d'une ligne sombre

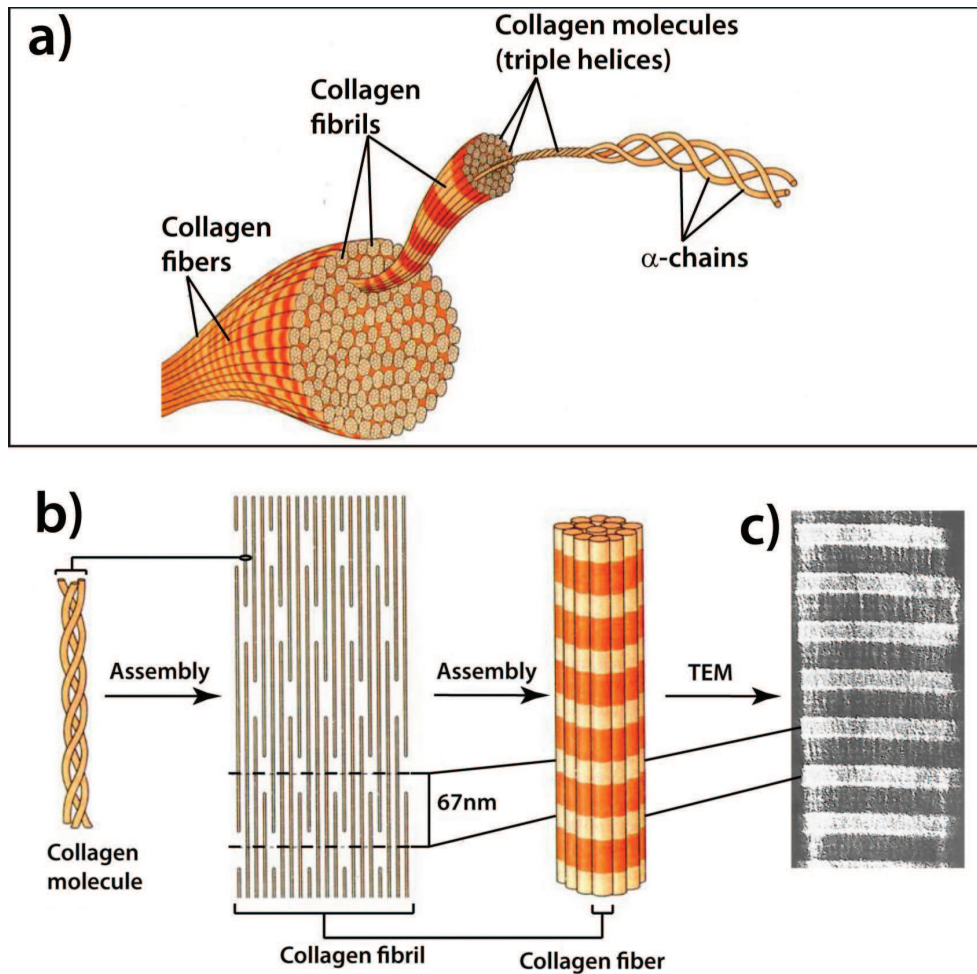


FIGURE 2.1 : Structure du collagène fibrillaire : **a)** Une fibre de collagène est composée d'une multitude de très longues fibrilles d'un diamètre variant entre 10 et 300nm, et des longueurs qui peuvent aller jusqu'à quelques centaines de μm . **b)** Les molécules de tropocollagène I, II (cartilage), III ou V, d'une longueur de 380nm, s'assemblent longitudinalement et transversalement, pour former une "fibrille de collagène" avec sa striation périodique caractéristique de 67nm où les bandes sombres correspondent aux espaces entre les molécules dans lesquels se sont fixés les produits de contraste utilisés en microscopie électronique : **(c)** (figure tirée de [Squier, 1987]).

nommée ligne Z. La portion de myofibrilles entre deux lignes Z successives constitue la plus petite unité contractile appelée sarcomère. C'est l'unité fonctionnelle de la cellule musculaire.

Chaque sarcomère est composé de deux types de filaments protéiques. Les filaments épais de myosine sont localisés dans la bande A. Les filaments fins d'actine se localisent principalement dans la bande I. Les filaments fins d'actine sont attachés par une de leur extrémité à la ligne Z et se prolongent parallèlement à l'axe de la myofibrille, jusqu'à la partie médiane du sarcomère, le long de la bande I, puis dans la bande A. La superposition des filaments d'actine et des filaments de myosine donne la zone sombre de la bande A, l'absence de filaments d'actine au centre de la bande A constitue la bande H, zone claire. Vue en coupe transversale (figure 2.2(b)), l'organisa-

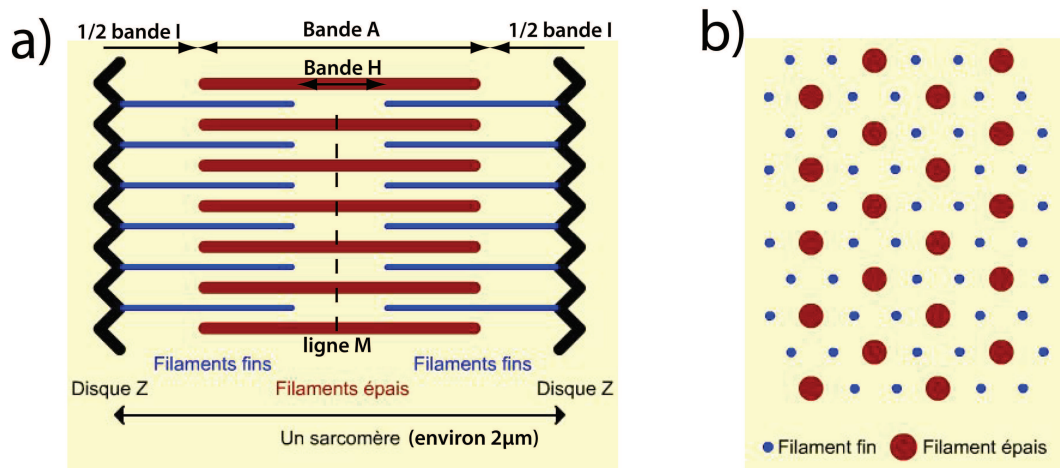


FIGURE 2.2 : **a)** Vue longitudinale d'un sarcomère ; **b)** Coupe transversale d'une myofibrille. Figures tirées du site : <http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/muscles/muscles.htm>

tion se révèle extrêmement régulière avec une disposition hexagonale. De nombreux sarcomères sont alignés les uns à la suite des autres pour former une myofibrille.

Sans rentrer dans les détails de la composition biochimique de ces protéines, notons ici que les filaments d'actine sont constitués d'une double hélice d'actine et de deux autres protéines : la tropomyosine (Tm) qui s'étend dans la gouttière de l'hélice d'actine, et la troponine (Tn), qui se fixe périodiquement sur la Tm, environ toutes les 8 molécules d'actine. Cette macromolécule est donc centrosymétrique et ne donne aucun signal SHG sous excitation biphotonique.

Chaque filament épais de myosine se compose d'environ 150 à 360 molécules de chaînes lourdes de myosine, assemblées à la manière d'une torsade et associées à des protéines de liaison de la myosine. Cette macromolécule est non-centrosymétrique, et donne un fort signal SHG sous excitation biphotonique. L'enchevêtrement particulier des chaînes lourdes formant les filaments épais a longuement été discuté au sein de la communauté scientifique. En effet, les sous filaments formant la torsade possèdent chacun une paire de têtes de myosine bien orientées l'une par rapport à l'autre. Dans les deux modèles proposés, la différence porte sur l'arrangement de ces têtes, plus particulièrement sur leurs orientations, discutées à 60° ou 180° . Dans le modèle tendant à être généralisé, chaque tête de myosine est séparée de sa paire de 180° . Le filament épais torsadé ainsi créé possède un angle hélicoïdal d'environ 60° entre deux têtes de myosine successives [Pollack, 1990]. Cet angle hélicoïdal peut être retrouvé en estimant, par différentes méthodes optiques basées sur la SHG, l'angle d'orientation des harmonophores de la myosine [Plotnikov, 2006a] ; [Tiaho, 2007] ; [Odin, 2008]. Ces différentes techniques seront passées en revue dans la section suivante. Par ailleurs, ces domaines de myosine en fibre enroulée ont été identifiés comme étant la structure génératrice de SHG dans les fibres musculaires [Plotnikov, 2006a].

Rôle biologique de la myosine

La myosine joue un rôle majeur dans le mécanisme de contraction musculaire. Plus précisément, c'est l'interaction entre l'actine et la myosine dans la bande A du sarcomère qui est responsable de la contraction du muscle, suivant le modèle des filaments glissant les uns sur les autres. L'actine joue le rôle de la molécule tractée, et la myosine est le moteur moléculaire, qui tire les filaments d'actine vers la bande H.

2.3 Microscopie multiphotonique endogène du collagène et de la myosine

Le développement récent des techniques d'imagerie multiphoton, en particulier la microscopie SHG, a permis une avancée significative dans l'étude spécifique des composés biologiques fibrillaires. Le couplage des contrastes TPEF/SHG permet d'étudier la matière biologique sans marquage, à partir des émissions endogènes de différentes protéines. Un nombre croissant d'études expérimentales révèle le potentiel de la microscopie non linéaire pour l'étude des structures macromoléculaires en l'absence totale de coloration. Ainsi, pour le collagène par exemple, l'imagerie par SHG s'avère utile pour la caractérisation de certaines pathologies associées à une altération et des fibres musculaires (myopathies, élongations musculaires...) et de la matrice extra-cellulaire (fibroses, maladies impliquant le collagène, blessures au niveau du tendon ou des ligaments...).

2.3.1 Spécificité du signal SHG

Comme nous l'avons vu section 1.2.2, la génération de seconde harmonique est un phénomène qui se produit dans des conditions bien spécifiques. En particulier, les molécules et leur arrangement doivent être exempts de centrosymétrie. De ce fait, dans l'étude des milieux biologiques, seuls quelques composés, comme le collagène et la myosine génèrent de la seconde harmonique sous excitation laser impulsionnelle suffisamment intense. Ces deux protéines génèrent donc de la SHG de manière endogène, sans aucun marquage, qu'elles soient contenues dans un échantillon frais, ou fixé. Tai *et al.* ont montré qu'un échantillon contenant du collagène marqué au Masson Trichrome génère bien plus de bruit de fond en SHG qu'un échantillon non marqué [Tai, 2009], et donc qu'il est préférable de travailler avec des échantillons non colorés. L'imagerie multiphotonique endogène est donc un outil de choix pour l'aide au diagnostic biomédical par exemple.

Colocalisation de signaux SHG avec des marquages

La spécificité du signal SHG pour certains types de collagènes et pour la myosine est bien documentée [Strupler, 2007] ; [Plotnikov, 2006a].

Des deux grands types de collagène, les collagènes fibrillaires (types I, II, III, V) et les collagènes non fibrillaires constitutifs des membranes basales (type IV essentiellement), seuls ceux de type I et dans une moindre mesure de type III, semblent donner un signal SHG. Ce résultat a été obtenu par des études de colocalisation SHG/immunomarquage fluorescent [Strupler, 2007] ; [Gailhouste, 2010]. Dans le muscle strié, Plotnikov *et al.* ont montré que l'émission de SHG provient des domaines du sarcomère contenant les filaments épais, c'est-à-dire la myosine [Plotnikov, 2006a], protéine comprenant une forte densité de molécules bien alignées.

Nous avons étudié le problème de spécificité d'émission des collagènes I et III dans les échantillons de foie humain, qui nous intéressent dans la suite de cette thèse, en relation avec le

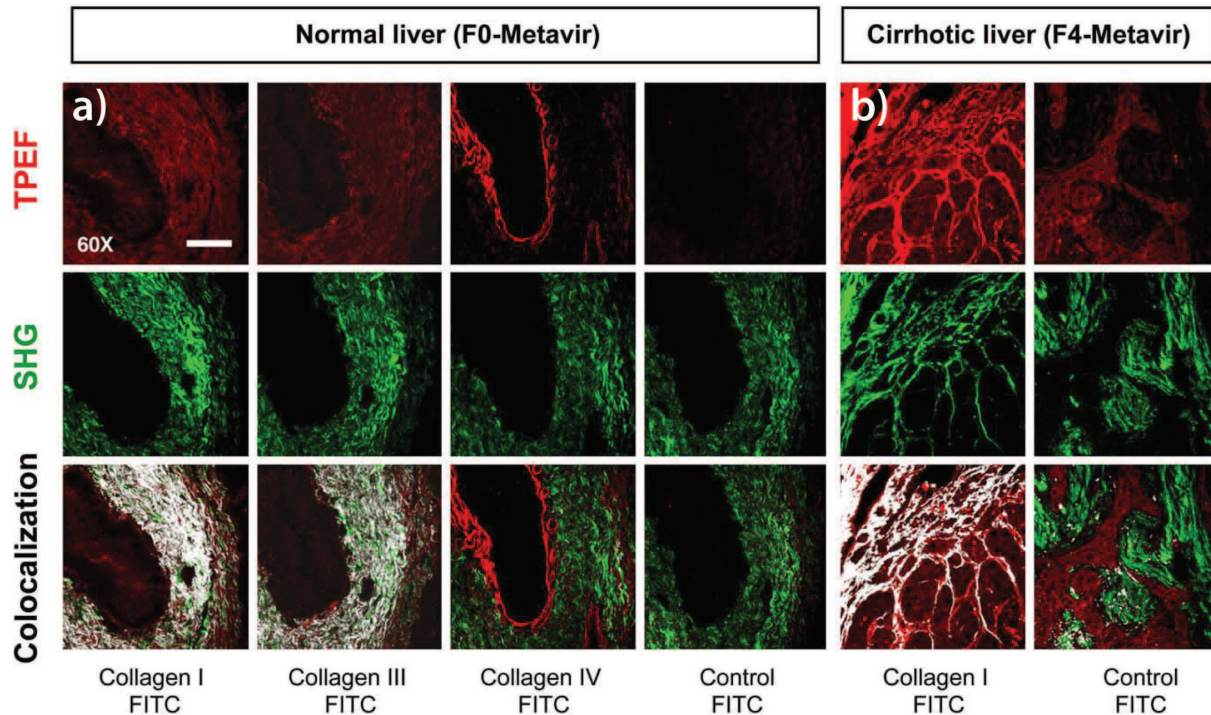


FIGURE 2.3 : Spécificité du signal SHG au collagène fibrillaire du foie : analyse du collagène fibrillaire (type I et III) par immuno-marquage sur des coupes sériées de foie sain : **a)** Métavir F0 et **b)** cirrhotique. La colocalisation des signaux TPEF et SHG apparaît en blanc sur la ligne du bas (pseudo couleurs). L'échantillon control n'est pas marqué et sert de référence. Excitation laser : 25mW à $\lambda = 810nm$; objectif 60x-NA1.2W ; barre d'échelle : 50 μm .

développement de la fibrose hépatique. Les marquages immunohistochimiques ont été réalisés par Luc Gailhouste au cours de ses travaux de thèse, sur des biopsies chirurgicales fixées au formol, de stade normal (F1, 5 μm d'épaisseur) et cirrhotique (F4, 5 μm d'épaisseur) [Gailhouste, 2010]. L'imagerie SHG et TPEF simultanée a été effectuée à la longueur d'onde d'excitation de 810nm. La colocalisation entre les deux signaux a été établie à partir d'une routine du logiciel ImageJ. Comme le montre la figure 2.3, la TPEF issue de l'immuno-marquage du collagène de type I est essentiellement localisée dans l'adventice et colocalise parfaitement avec le signal SHG. Le collagène de type III colocalise également avec le signal SHG, et montre une distribution identique au collagène de type I, ce qui apparaît normal dans le sens où le collagène de type III est très souvent associé à celui de type I (table 2.1.1). Par contre, le collagène de type IV, non fibrillaire, montre une distribution restreinte et localisée dans la lame basale, et ne colocalise pas avec le signal SHG, que ce soit dans un foie sain ou cirrhotique.

Ce résultat est *a priori* surprenant car les molécules de collagène I et IV sont très semblables, excepté par la taille de leurs domaines en triple hélice. Si des différences sont observées entre les 2 types de molécules, elles semblent néanmoins insuffisantes pour expliquer la réponse radicalement différente des 2 types de collagène à l'échelle d'un tissu [Strupler, 2008(thèse)]. Il faut donc rechercher des explications non pas au niveau moléculaire mais au niveau de l'organisation

macromoléculaire, tout aussi déterminante pour la génération de second harmonique. Les fibres de collagène I comprennent une forte densité de molécules bien alignées, d'où une construction cohérente efficace du signal SHG, puisque les champs rayonnés par les diverses molécules interfèrent constructivement. En revanche, les molécules de collagène IV sont arrangées de façon centro-symétrique, et les champs rayonnés, en opposition de phase, s'annulent. Il ne subsiste que la partie incohérente du signal, ou diffusion Hyper-Rayleigh, trop faible pour être détectée en raison des petits volumes sondés en microscopie et de la faible densité du collagène IV et des temps d'acquisition (ou d'intégration) par pixel ($\approx 10\mu s$) [Pena, 2005]. La microscopie SHG apparaît ainsi comme une sonde structurelle du collagène fibrillaire.

2.3.2 Complémentarité des contrastes SHG/TPEF

Il est très aisé de détecter simultanément les signaux TPEF et SHG endogènes d'un tissu. La fluorescence endogène provient en général de dérivés d'acides aminés aromatiques, de dérivés de vitamines ou de dérivés de porphyrines, alors que la SHG serait principalement spécifique aux collagènes I-III ou à la myosine. Il est évident que ces deux contrastes contiennent des informations complémentaires dont nous fournissons quelques illustrations dans cette section.

Le foie : Cet organe présente une autofluorescence importante permettant d'imager aisément et en profondeur le parenchyme hépatique ($> 200\mu m$). La forte intensité des signaux TPEF observées dans le foie est essentiellement due à la richesse des hépatocytes en fluorophores endogènes tels que certaines flavines ou d'autres dérivés de vitamines. Ce type de molécule fournit en microscopie de fluorescence par excitation à deux photons un marqueur endogène puissant permettant par exemple, d'évaluer l'activité métabolique des cellules.

La figure 2.4 illustre le fort potentiel de l'acquisition simultanée des contrastes endogènes SHG/TPEF. Deux zones différentes de foie modérément fibrosé (Métavir F2) sont présentées, aux grossissements 10x NA-0.25 et 60x NA-1.2W. La figure 2.4f) révèle clairement la distribution de la matrice extra-cellulaire autour des hépatocytes, démontrant ainsi la complémentarité des deux contrastes.

La complémentarité des contrastes SHG/TPEF pour l'imagerie du collagène peut aussi être illustrée par la colocalisation des signaux TPEF et SHG du tendon de queue de souris, réalisée au laboratoire. Le signal de fluorescence excitée à deux photons (figure 2.5a-d)) est émis par des fluorophores endogènes, tels les protéoglycanes. Ce signal est diffus et localisé autour des fibres de collagène que l'on distingue clairement (figure 2.5b,e)). Les figures 2.5c) et f) sont codées en RGB, la colocalisation des signaux TPEF (rouge) et SHG (vert) apparaît donc en jaune, couleur très peu présente, illustrant encore une fois la complémentarité des contrastes.

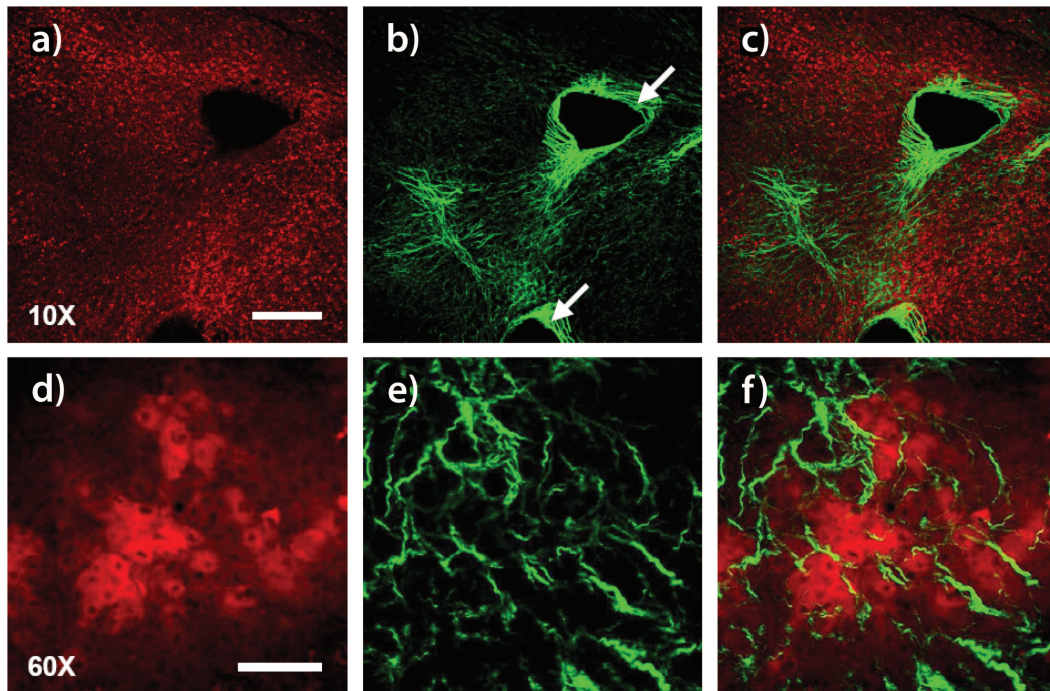


FIGURE 2.4 : *Microscopie non linéaire de foie humain fibrosé, colocalisation des signaux SHG/TPEF. Image pleine échelle 1024×1024 , objectif 60x à eau, NA 1.2 : a),d) images TPEF acquises au milieu de l'échantillon ($50\mu m$) aux grossissements 10x NA-0.25 et 60x NA-1.2W. Barres d'échelles respectivement 250 et $60\mu m$; b),e) images SHG acquises en polarisation circulaire. Les flèches montrent les espaces portes; c),f) TPEF + SHG, image RGB; $\lambda = 810nm$, intensité laser au point focal $50mW$.*

Le muscle : Un signal SHG endogène a été mis en évidence au sein du muscle squelettique fin des années 90. Ce signal a dès lors été attribué au complexe acto-myosine des sarcomères [Guo, 1997]; [Campagnola, 2002]; [Mohler, 2003]; [Chu, 2003]; [Both, 2004]. La SHG est générée par la myosine et non par l'actine qui est une protéine centrosymétrique. Plusieurs études ont été menées depuis, en particulier pour essayer de mieux comprendre et de caractériser certaines pathologies telle que la maladie de Pompe [Ralston, 2008], pour améliorer le contraste SHG de l'image du muscle squelettique [Plotnikov, 2006b], ou encore pour mieux comprendre l'origine du signal SHG issue de la myosine [Recher, 2009].

La figure 2.6 montre un exemple d'une image SHG d'un muscle bovin semi tendineux adulte. La coupe, d'une épaisseur de $60\mu m$, a été réalisée le long de l'axe principal des fibres musculaires. L'aspect strié des myofibrilles, dû à la segmentation en unités contractiles de bases (sarcomères), est directement observable par une succession de bandes claires et sombres.

La figure 2.7 présente une acquisition SHG/TPEF d'une coupe longitudinale avec un fort grossissement. Ici, l'aspect strié du muscle bovin apparaît sur les deux contrastes, SHG et TPEF (figures 2.7a) et b)) [Boulesteix, 2004]. Le codage RGB utilisé pour présenter la figure 2.7c), implique qu'un chevauchement des signaux SHG et TPEF se traduit par une couleur jaune. Or,

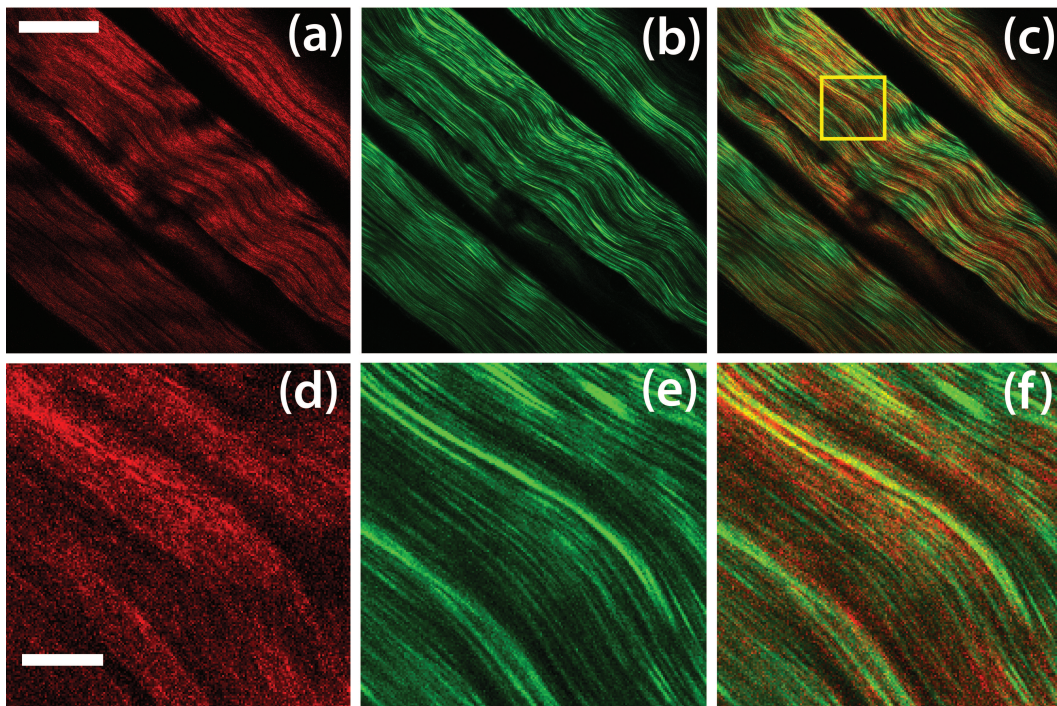


FIGURE 2.5 : Colocalisation des signaux TPEF et SHG du tendon de queue de souris : images codées en RGB. Image pleine échelle 1024×1024 , objectif $60\times$ NA-1.2w. **a)** TPEF (rouge) ; **b)** SHG en polarisation circulaire (vert) ; **c)** TPEF + SHG, image RGB. Barre d'échelle $50\mu\text{m}$; **d-f)** images en zoom tirées du carré jaune de c), barre d'échelle $15\mu\text{m}$

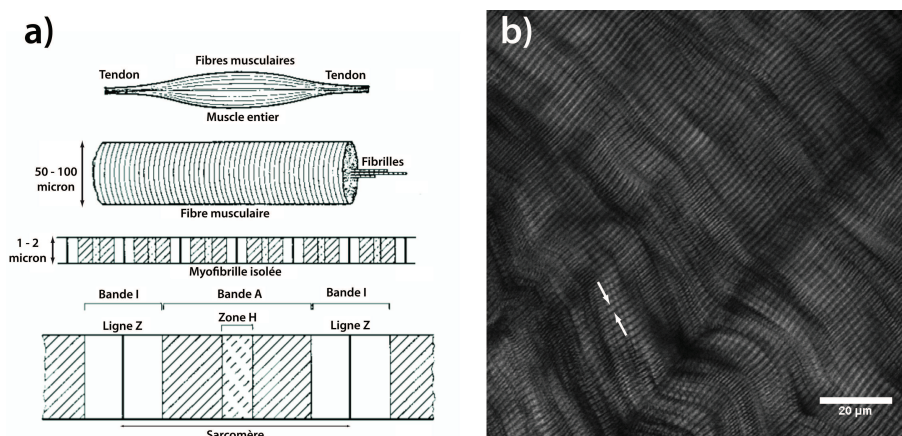


FIGURE 2.6 : **a)** Décomposition d'un muscle en fibres, myofibrilles, jusqu'au sarcomère. **b)** Image SHG d'une coupe longitudinale d'un échantillon de muscle bovin semi tendineux adulte. Objectif $60\times$ - NA1.2W, 1024×1024 pixels, zoom 2x. Les deux flèches délimitent un sarcomère.

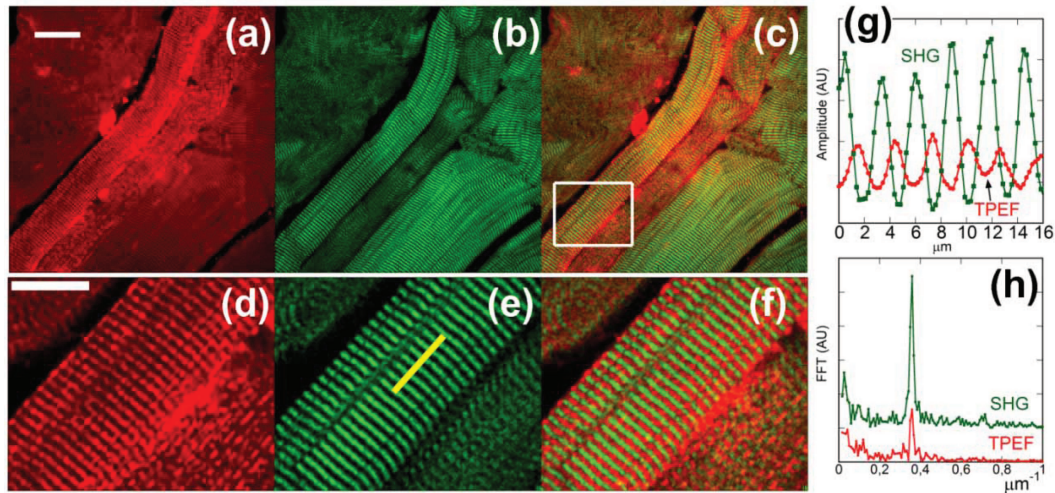


FIGURE 2.7 : Colocalisation des signaux TPEF et SHG d'un muscle frais de veau : images codées en RGB. Image pleine échelle 1024×1024 , objectif $60\times$ à eau, NA 1.2 : **a)** TPEF (rouge) ; **b)** SHG en polarisation circulaire (vert) ; **c)** TPEF + SHG, image RGB. Barre d'échelle $40\mu\text{m}$; **d-f)** images en zoom tirées du rectangle blanc de **c)**, barre d'échelle $20\mu\text{m}$; **g)** profils des intensités TPEF et SHG d'une coupe le long de l'axe principal des myofibrilles (trait blanc de **e)**) ; **h)** transformée de Fourier spatiale des profils (longueur $65\mu\text{m}$).

comme le montre la figure 2.7c), il n'y a pas de chevauchement entre les bandes verte de SHG et rouge de TPEF. Pour mettre en évidence cette structure en alternance, nous pouvons étudier les profils d'intensité, comme indiqué sur la figure 2.7g), où un zoom est présenté : les signaux TPEF et SHG sont en opposition de phase le long de l'axe principal de la fibre avec un écart entre deux maxima de l'ordre de $2.8\mu\text{m}$. Les transformées de Fourier des amplitudes des profils linéaires (calculées pour une longueur de $65\mu\text{m}$) sont données figure 2.7f. Un pic fin à $q_{\text{max}} = 0.358\mu\text{m}^{-1}$ est observable pour les deux signaux TPEF et SHG, indiquant que la périodicité des sarcomères est très régulière le long des myofibrilles. La position du pic permet d'estimer la période des sarcomères pour cet échantillon ($q_{\text{max}} = 1/l$). Nous obtenons une valeur de $l = 2.8\mu\text{m}$, en accord avec l'estimation dans l'espace direct sur l'agrandissement présenté par la figure (g). Cette valeur est la longueur typique des sarcomères.

2.3.3 Applications

Ces dernières années, le nombre d'articles relatant les diverses applications de l'imagerie du collagène et de la myosine par génération de seconde harmonique a très fortement augmenté. Nous présentons ici quelques-uns de ces travaux, résumés dans la table 2.3.3.

Un autre exemple d'application à la biologie de la microscopie de seconde harmonique repose sur l'observation du collagène constitutif du système cardiovasculaire. L'imagerie SHG couplée à l'acquisition des signaux TPEF rend possible la caractérisation précise des composés fibrillaires présents au niveau de la paroi des vaisseaux sanguins. L'analyse bimodale SHG/TPEF apporte ainsi de précieuses informations sur l'organisation des réseaux de collagène fibrillaire (SHG) et

Microscopie non linéaire de matériaux biologiques

Informations physiques et structurales

Applications biomédicales

Collagène (SHG)

Cartographie du tendon de queue de rat [Freund, 1986]
 Sonde de potentiel membranaire [Bouevitch, 1993]; [Peleg, 1999]; [Dombeck, 2004]
 Imagerie de tissus animaux (peau, muscle) [Guo, 1996]; [Guo, 1997]
 Discrimination entre le collagène I et II dans la peau [Cox, 2002]
 Imagerie de la dénaturation du collagène de type I [Sun, 2006]
 Imagerie de structures osseuses [Brockbank, 2008]; [Lacomb, 2008]
 Imagerie de l'organisation tridimensionnelle du collagène fibrillaire matriciel sur culture cellulaire [Zoumi, 2002]; [Boerboom, 2007] et *in situ* [Campagnola, 2002]; [Cox, 2003]; [Williams, 2005]
 Imagerie de la cornée porcine [Vohnsen, 2008]
 Caractérisation de la susceptibilité non linéaire du collagène [Stoller, 2002]; [Tiaho, 2007]; [Odin, 2008]; [Psilodimitrakopoulos, 2009a]
 Reconstruction de champs d'orientations de fibres de collagène [Odin, 2007]; [Odin, 2008]; [Psilodimitrakopoulos, 2009a]

Peau : discrimination entre tissus cicatriciels et derme sain [Chen, 2009]; [König, 2000], DermaInspect®
Cornée : détection d'anomalies structurales [Morishige, 2007]
Aorte : détection de l'altération du collagène III [Gong, 2008]
Foyers cancéreux : ostéosarcome, mélanome, carcinome mammaire [Brown, 2003]; [Provenzano, 2006]; [Provenzano, 2008]; [Han, 2008]; [Perentes, 2009]; [Chernyavskiy, 2009]
Fibroses : rénale [Strupler, 2007], pulmonaire [Pena, 2007], hépatique [Sun, 2008]; [Tai, 2009] [Gailhouste, 2010]
Micro-endoscopie : [Bao, 2010]; [König, 2007]

Collagène (SHG) et fluorophores endogènes (TPEF)

Imagerie de la cornée (TPEF : cellules épithéliales)
 Imagerie de la structure 3D du système sanguin, parois des artères (TPEF : vaisseaux sanguins)
 Imagerie de l'organisation des réseaux de collagènes et d'élastine (TPEF)

[Chen, 2008]
 [Werkmeister, 2007]; [Schenke-Layland, 2006]
 [Zipfel, 2003b]; [Zoumi, 2004]; [Boulesteix, 2005]; [Débarre, 2006]; [Chen, 2007]

Myosine (SHG)

Imagerie de fibres musculaires *in situ* [Both, 2004]; [Vanzi, 2006]
 Etude de la conformation structurale [Nucciotti, 2009]
 Caractérisation des sarcomères [Recher, 2009]
 Caractérisation de la susceptibilité non linéaire de la myosine [Plotnikov, 2006a]; [Tiaho, 2007]; [Odin, 2008]; [Psilodimitrakopoulos, 2009a]
 Reconstruction de champs d'orientations de fibres musculaires [Odin, 2008]; [Psilodimitrakopoulos, 2009c]

Caractérisation de maladie musculaire [Plotnikov, 2008]
 Caractérisation de la maladie de Pompe [Ralston, 2008]
Micro-endoscopie : [Llewellyn, 2008]

Axonèmes/Microtubules (SHG)

Imagerie des axonèmes [Dombeck, 2003]; [Kwan, 2008]
 Caractérisation de la susceptibilité non linéaire des axonèmes [Odin, 2009] Reconstruction de champs d'orientations d'axonèmes [Odin, 2009]

Imagerie de tissus potentiellement liés à la maladie d'Alzheimer [Kwan, 2009]

Caractérisation de l'orientation effective de la source de SHG dans une culture de neurones corticaux [Psilodimitrakopoulos, 2009b]

TABLE 2.2 : *Essor de la microscopie multiphotonique appliquée à la biologie.*

d'élastine (TPEF) dans une large variété de vaisseaux (aorte, carotide et coronaires) [Zoumi, 2004] ; [Boulesteix, 2005]. D'autres équipes ont pu reconstruire la structure tridimensionnelle du système sanguin à l'échelle macroscopique en tirant partie des propriétés du collagène, mettant alors en évidence son organisation structurale au niveau de la paroi des artères, sans marquage, sans photo-toxicité, donc sans la destruction du tissu imagé [Werkmeister, 2007]. Enfin, la SHG a permis de mieux comprendre la formation des altérations congénitales de l'aorte grâce au développement de modèles expérimentaux chez le rongeur rendant possible la caractérisation des aberrations qualitatives et quantitatives du collagène de type III dans l'anévrisme aortique [Gong, 2008] ; table 2.3.3.

Le développement rapide des dispositifs de microscopie non linéaire a permis d'étendre l'étude du collagène fibrillaire par SHG à de nombreux autres tissus. Les plus étudiés sont les fibres musculaires (myosine), la cornée, les structures osseuses ou encore les axonèmes (table 2.3.3). Ces travaux démontrent là encore le potentiel de l'imagerie non linéaire dans l'investigation des altérations qualitatives et quantitatives de la matrice extra-cellulaire associées à certaines pathologies. Des applications directes de la microscopie multiphoton dans des domaines variés tels que l'ophtalmologie et la dermatologie sont aujourd'hui efficaces en imagerie biomédicale. Enfin, une autre voie extrêmement prometteuse est celle suivie par [Llewellyn, 2008] ; [Bao, 2010] ou encore [König, 2007], concernant la mise au point de micro-endoscopes SHG fibrés. L'alliance de la microscopie multiphotonique avec les technologies à fibre optique permettront certainement dans un futur proche de réaliser des biopsies virtuelles. Le diagnostic serait alors réalisé sans avoir recours à la biopsie, qui reste encore aujourd'hui la méthode de référence, mais qui n'est pas sans risque pour le patient.

2.4 Reconstruction de champs d'orientation de protéines fibrillaires par microscopie de seconde harmonique

De nombreux tissus biologiques ont une structure fibrillaire, plus ou moins compacte, dont le degré d'orientation et d'organisation des fibres diffère suivant le rôle du tissu. Ainsi, le réseau fibrillaire du collagène dans le tendon, ou celui des myofibrilles dans un muscle strié, est composé de faisceaux de fibrilles relativement parallèles entre elles et très organisées. À l'opposé, le réseau de collagène de la matrice extra-cellulaire du foie sain apparaît très peu dense, avec une structure tridimensionnelle des fibres très désordonnée. On comprend bien que la détermination de l'architecture du réseau fibrillaire des tissus biologiques, sorte de matériaux composites hétérogènes renforcés de fibres, est d'importance pour la compréhension de leurs propriétés physiques (déformation, porosité, dénaturation), et de leur rôle biologique.

De nombreuses méthodes permettent d'obtenir l'orientation d'objets allongés ou de fibres à partir d'images ou de séquence d'images. Les méthodes indirectes utilisent le contraste d'intensité pour remonter à des directions préférentielles par traitement d'image, par exemple en exploitant les gradients [Noorlander, 2002]. Souvent ces méthodes ne permettent malheureusement pas d'avoir des estimations précises et de valider les champs d'orientation obtenus.

La seconde classe de méthodes utilise l'anisotropie des tenseurs d'interaction des objets anisotropes que sont les fibrilles, pour déterminer l'un des axes principaux et obtenir ainsi une image des orientations de ces axes principaux. Ce sont des méthodes polarimétriques. Par exemple, en microscopie linéaire, la biréfringence est une propriété intéressante. L'étude en fonction de la polarisation permet de remonter aux deux informations principales que sont la retardance (définie comme $\delta = \Delta n \cdot e = (n_e - n_o) \cdot e$, avec n_e et n_o , indice extraordinaire et ordinaire du matériau biréfringent, et e son épaisseur) et l'orientation des axes principaux [Glazer, 1996] ; [Panula, 1998] ; [Massoumian, 2003] ; [Oldenbourg, 1998]. Cette méthode est particulièrement intéressante pour les systèmes très fins et dont les axes principaux sont dans le plan.

En optique non linéaire, on utilise le fait que l'intensité SHG est très fortement dépendante de la polarisation du champ incident. Ainsi, la modulation de la polarisation en imagerie SHG est la méthode la plus utilisée [Gupta, 1994] ; [Golovan, 2001]. Selon les travaux novateurs de [Stoller, 2002], une cartographie de l'orientation des fibrilles de collagène peut être obtenue en utilisant la génération de seconde harmonique modulée en polarisation. Bien que très puissante, cette technique basée sur la modulation électro-optique de la polarisation du faisceau laser incident n'est pas facilement implémentable sur les microscopes à balayages commerciaux utilisant des miroirs galvanométriques. En outre, cette technique requiert un temps d'exposition de l'échantillon à l'excitation laser très long, ce qui devient préjudiciable aux milieux biologiques. Enfin, cette méthode suppose implicitement que l'orientation de l'axe principal de la susceptibilité non linéaire correspond à l'orientation propre de la fibrille, sans le montrer.

Cette méthode a été fortement simplifiée et améliorée par C. Odin et Y. Le Grand au laboratoire, pour être implémentée sur un microscope multiphotonique et permettre la reconstruction, pixel par pixel, du champ d'orientation des fibres d'un système fibrillaire. Elle a été nommée OF-SHM (Orientation Field Second Harmonic Microscopy) par ses auteurs [Odin, 2007] ; [Odin, 2008] ; [Odin, 2009]. La méthode n'utilise que 4 images acquises par microscopie de seconde harmonique avec 4 polarisations linéaires du faisceau laser incident bien définies, et peut être implémenté sur n'importe quel microscope optique à balayage imageant en transmission. Elle permet, sous certaines hypothèses explicitées ci-dessous, d'obtenir les images de deux rapports caractéristiques des composantes de la susceptibilité non linéaire des fibres, l'image des orientations locales de l'axe principal de la susceptibilité non linéaire et une image indépendante de la polarisation (dite isotrope). Nous verrons qu'en réalité, l'image des orientations fournit en fait les orientations fibrillaires locales, rendant possible l'étude intrinsèque et endogène de champs d'orientations fibrillaires. La méthode OF-SHM permet ainsi, de façon simple, rapide et efficace, de remonter à une information d'orientation locale, ainsi qu'à un ratio ρ des éléments principaux du tenseur de susceptibilité non linéaire, paramètre relié à l'organisation structurale des harmonophores dans la fibre. L'imagerie OF-SHM a été appliquée au collagène [Odin, 2007] ; [Odin, 2008], à la myosine [Odin, 2008] et aux axonèmes [Odin, 2009]. En principe, son domaine de validité s'étend à toute source de génération de seconde harmonique fibrillaire ayant une symétrie suffisante (voir suite).

Après avoir présenté le principe de la méthode OF-SHM et son implémentation et automatisation au sein de notre microscope multiphoton, nous verrons quelques exemples d'applications au collagène et à la myosine.

2.4.1 Présentation de la méthode OF-SHM

Nous nous proposons de calculer la réponse SHG d'une fibre disposée dans le plan focal de l'objectif. Les bases physiques de la réponse en polarisation de systèmes fibrillaires présentant une réponse SHG sont bien établies [Roth, 1979] ; [Stoller, 2002] ; [Campagnola, 2002] ; [Odin, 2007] ; [Psilodimitrakopoulos, 2009a]. Nous les résumons dans cette partie.

Le champ $E^{2\omega}$ de seconde harmonique provient de la polarisation non linéaire $P^{2\omega}$ induite par le mélange de champs électriques E^ω intenses à la fréquence ω dans le milieu. Cette polarisation non linéaire est décrite par l'égalité tensorielle $P_\alpha^{2\omega} = \sum_{\beta\gamma} \chi_{\alpha\beta\gamma}^{(2)} E_\beta^\omega E_\gamma^\omega$, où $\chi_{\alpha\beta\gamma}^{(2)}$ est le tenseur de susceptibilité non linéaire local d'ordre 2 et où les indices α , β et γ décrivent les coordonnées du laboratoire (X , Y , Z). Les principales hypothèses utilisées pour appliquer notre méthode OF-SHM sont :

[i] le système est planaire, avec la fibre dans le plan focal de l'objectif du microscope.

[ii] l'intensité SHG est générée par des supramolécules longues et fines, de symétrie cylindrique C_∞ [Roth, 1979] ; [Stoller, 2002] ; [Williams, 2005] ; [Plotnikov, 2006a] le long de l'axe principal de la fibre. Par conséquent, l'intensité de seconde harmonique est interprétée à partir du tenseur de

susceptibilité non linéaire $\chi^{(2)}$ de symétrie C_n ($n \geq 6$), avec cet axe de symétrie contenu dans le plan focal XZ et incliné d'un angle ϕ par rapport à l'axe Z . Cette hypothèse est toujours valide pour les systèmes fibrillaires que nous étudions, qui sont décrits comme des assemblages de fibres et de fibrilles condensés et bien orientés [Fratzl, 2003]; [Nicastro, 2005]; [Plotnikov, 2006a]. Le tenseur de susceptibilité non linéaire $\chi^{(2)}$, comprend alors 3 composantes indépendantes $\chi_{zzz}^{(2)}$, $\chi_{iiz}^{(2)} = \chi_{izi}^{(2)}$, et $\chi_{zii}^{(2)}$, avec $i = x$ ou y [Nye, 1985].

[iii] il n'y a pas d'analyse de la polarisation réalisée à la détection : l'intensité s'écrit alors [Stoller, 2002]; [Plotnikov, 2006a]; [figure 2.8a)] :

$$I^{2\omega}(\theta) \propto [\chi_{xzx} \sin 2\theta]^2 + [\chi_{zzz} \cos^2 \theta + \chi_{zxx} \sin^2 \theta]^2 \quad (2.1)$$

avec $\theta = \psi - \phi$ l'angle entre la polarisation linéaire du laser et l'axe de symétrie C_n , si l'orientation ψ de la polarisation du laser est connue. Le champ du laser incident se propage donc selon l'axe Y , et est polarisé linéairement avec un angle ψ par rapport à l'axe X . L'axe de symétrie Z_χ de $\chi^{(2)}$ est orienté avec un angle azimutal ϕ par rapport à l'axe Z , comme représenté sur la figure 2.8a). Seuls les ratios $\xi = \chi_{zxx}/\chi_{xzx}$ et $\rho = \chi_{zzz}/\chi_{xzx}$ peuvent être mesurés, ainsi que l'angle ϕ .

Avec ces hypothèses, on peut montrer que l'intensité SHG en chaque pixel d'une image peut être écrite comme :

$$I(\phi, \psi) = U + V \cos(2\phi - 2\psi) + W \cos(4\phi - 4\psi) \quad (2.2)$$

toujours dans le cas où la polarisation n'est pas analysée à la détection.

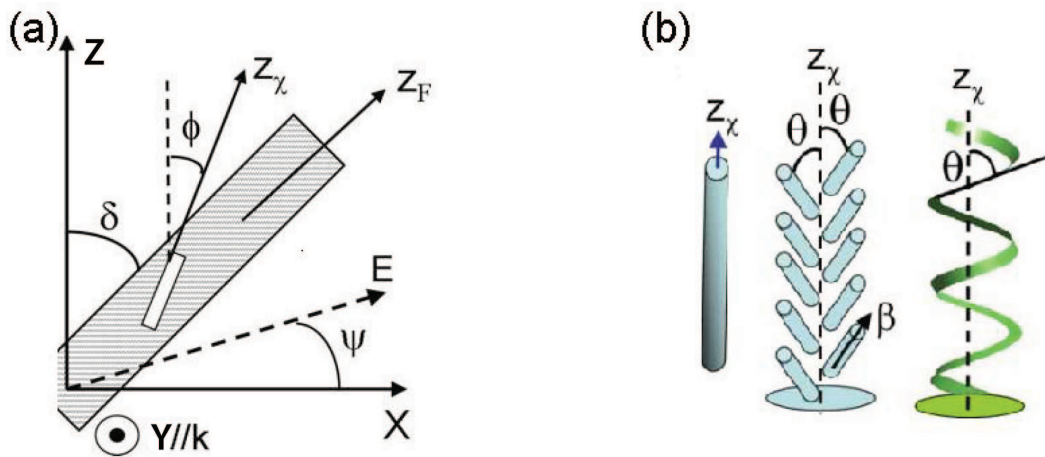


FIGURE 2.8 : **a)** Représentation planaire d'une fibrille harmonophore, et définition des différents angles. L'orientation δ de la fibre correspond à l'angle entre les axes Z et Z_F . L'orientation de la polarisation du laser par rapport à X est ψ . A l'intérieur de la fibre, le segment visualise l'orientation locale de l'axe de symétrie Z_χ de la susceptibilité non linéaire $\chi^{(2)}$, orientée avec un angle ϕ par rapport à l'axe Z . **b)** Deux interprétations de l'angle polaire θ rentrant dans la formulation de ρ lorsque la fibre est composée d'harmonophores ayant une hyperpolarisabilité β_{zzz} l'emportant sur toutes les autres : $\rho = 2/\tan^2 \theta$.

Les coefficients U , V et W sont des fonctions de χ_{zzz} , χ_{zxx} et χ_{xxx} , et sont proportionnels aux carrés de l'intensité laser I_0 et de la concentration locale $c(r)$ en harmonophores. Il est important de noter que l'équation 2.2 reste valide quand l'axe de symétrie Z_χ n'est pas dans le plan image, mais l'expression des amplitudes U , V et W devient fonction de l'angle d'élévation de Z_χ . Dans tous les cas, l'angle azimutal ϕ représente l'angle entre la projection de l'axe principal de la susceptibilité non linéaire dans le plan image et l'axe de référence Z . L'équation 2.2 peut donc être utilisée pour mesurer l'angle azimutal Z_χ dans le plan image, même si les fibrilles sont orientées hors de ce plan. Par conséquent, même si une pile d'images peut être acquise en vue d'une reconstruction 3D, seules les projections des champs d'orientation dans chaque plan image peuvent être obtenues.

Il existe deux cas particuliers pour lesquels il est possible de remonter à une valeur de ρ et θ . Dans un premier cas, lorsque le tenseur de susceptibilité non linéaire $\chi^{(2)}$ est de symétrie C_n ($n \geq 6$) et que la règle de Kleinman s'applique [Kleinman, 1962], le tenseur de susceptibilité non linéaire n'a plus que deux composantes χ_{zzz} et χ_{zxx} indépendantes, et $\xi = 1$.

Dans le second cas, sous l'hypothèse d'une isotropie azimutale des orientations des harmonophores (figure 2.8b)) au sein de chaque fibrille, le développement est similaire à celui décrit pour des dépôts en monocouche de molécules non linéaires (monocouche de Langmuir-Blodgett par exemple). Il est alors possible de relier $\chi^{(2)}$ au tenseur d'hyperpolarisabilité moléculaire $\beta^{(2)}$. Si ce tenseur d'hyperpolarisabilité possède une composante axiale β_{zzz} dominante, on retrouve $\xi = 1$ et $\rho = 2/\tan^2\theta$ [Heinz, 1983]; [Shen, 1989]; [Brevet, 1996]; [Leray, 2004].

Dans ces deux cas de figure, $\xi = 1$, nous avons montré au laboratoire (méthode OF-SHM) que les paramètres d'orientation ϕ et de couplage ρ pouvaient être obtenus à partir de seulement 4 images acquises avec 4 polarisations linéaires à 0, 45, 90 et 135° [Odin, 2007]; [Odin, 2008]. Cette méthode a été développée par analogie avec les méthodes de cyclage de phase en RMN [Odin, 2006].

En définissant $I_\perp \propto [\chi_{zxx} I_0 c(r)]^2$ comme étant l'intensité mesurée lorsque la polarisation du laser est perpendiculaire à Z_χ , il vient si $\xi = 1$

$$\begin{aligned} U &= \frac{I_\perp}{8}(3\rho^2 + 2\rho + 7) \\ V &= \frac{I_\perp}{2}(\rho^2 - 1) \\ W &= \frac{I_\perp}{8}(\rho^2 - 2\rho - 3) \end{aligned} \quad (2.3)$$

où $\rho = \chi_{zzz}/\chi_{zxx}$. Sous certaines hypothèses (isotropie azimutale des harmonophores au sein de la fibrille), ρ donne une information orientationnelle à l'échelle de la structure [Plotnikov, 2006a].

L'équation 2.2 a été principalement utilisée pour mesurer le paramètre ρ [Roth, 1979]; [Tiaho, 2007]; [Han, 2008] en supposant *a priori* que Z_χ est parallèle à l'orientation apparente de la

fibrille. L'estimation de ρ peut être effectuée sur une portion d'image pour avoir un meilleur rapport signal sur bruit, ou même pixel par pixel [Odin, 2007] ; [Psilodimitrakopoulos, 2009c]. Elle est obtenue à partir d'un jeu d'intensités acquises avec n polarisations du laser entre 0 et 180° , ou 0 et 360° (la symétrie intrinsèque de l'expression 2.2 montre que les intervalles $0 - 180^\circ$ et $180 - 360^\circ$ contiennent la même information). Cette suite d'intensités est ensuite ajustée par une méthode de moindres carrés afin d'obtenir une estimation de ρ . Toutefois, si ξ est inconnu, tous ces paramètres peuvent être obtenus à partir de 6 acquisitions aux polarisations laser $n\pi/6$, en ajustant l'équation 2.2 avec l'intensité des pixels, par une méthode de moindres carrés non linéaire.

La méthode utilisée pour remonter aux paramètres d'orientation ϕ et de couplage ρ est la suivante. En posant $I_n(\phi) = I(\phi, \psi_n)$ pour l'intensité de la $n^{\text{ième}}$ polarisation incidente avec $\psi_n = n\pi/\psi$, et en combinant ces 4 intensités, il vient à partir de l'équation (2.2) :

$$\begin{aligned} I_{02}(\phi) &= [I_0(\phi) - I_2(\phi)]/2 = V \cos(2\phi) \\ I_{31}(\phi) &= [I_3(\phi) - I_1(\phi)]/2 = V \sin(2\phi) \end{aligned} \quad (2.4)$$

en tenant compte de l'annulation du terme proportionnel à $\cos(4\psi - 4\phi)$. Les différences d'intensités $I_{02}(\phi)$ et $I_{31}(\phi)$ permettent d'obtenir 2ϕ compris dans l'intervalle $[-\pi, \pi]$. En posant $c = \cos(2\phi)$ et $s = \sin(2\phi)$, l'angle $2\phi = \text{atan2}(s, c)$ dans $[-\pi, \pi]$ est obtenu à partir de la fonction standard ANSI C *atan2*, fonction implémentée dans la plupart des langages de programmation, et définie comme

$$\begin{aligned} \text{atan2}(s, c) &= \arctan(s/c) \text{ pour } c > 0 \\ &= \pi + \arctan(s/c) \text{ pour } c < 0 \text{ et } s > 0 \\ &= -\pi + \arctan(s/c) \text{ pour } c < 0 \text{ et } s < 0 \end{aligned} \quad (2.5)$$

De plus, l'angle 2ϕ est donné par $I_{02}(\phi)$ et $I_{31}(\phi)$ sous l'hypothèse que le signe de V est connu. L'application de cette méthode à chaque pixel d'une image mène à une image de l'orientation ϕ de l'axe de symétrie Z_χ de $\chi^{(2)}$. Si cet axe de symétrie coïncide avec l'orientation réelle de la fibrille, l'image des orientations ϕ représente directement le champ d'orientation des fibrilles imagées en microscopie SHG. Notons que ϕ peut être déterminé sans ambiguïté, même si les valeurs de U , V et W varient d'un pixel à un autre, tant que le signe de V reste homogène sur toute l'image. Néanmoins, la valeur de ϕ est décalée de $\pi/2$ si le mauvais signe est attribué à V . A partir de l'équation 2.3, et des résultats publiés par [Stoller, 2002] ; [Tiaho, 2007] ; [Han, 2008], nous pouvons remarquer qu'en général, $\rho > 1$ avec $V > 0$ pour la collagène de type I, tandis que $\rho < 1$ avec $V < 0$ pour la myosine. Par conséquent, une convention utilisée pour trouver l'angle d'orientation ϕ lors de l'application de la méthode OF-SHM est donnée par

$$\text{pour } V > 0, 2\phi = \text{atan2}(-I_{31}, -I_{02}) \quad (2.6)$$

$$\text{pour } V < 0, 2\phi = \text{atan2}(I_{31}, I_{02}) \quad (2.7)$$

pour chaque valeur d'intensité détectée par pixel, en fonction du type de tissu majoritaire imagé, à savoir du collagène ou de la myosine.

L'amplitude du contraste de polarisation $|V|$ est estimé par $|V| = \sqrt{I_{02}^2 + I_{31}^2}$, et une image indépendante de la polarisation incidente avec une intensité U peut être obtenue en moyennant pixel par pixel les n intensités, à savoir $U = \sum_n I_n/n$. Une telle image SHG isotrope a déjà été obtenue par [Gao, 2006] en additionnant 3 images acquises aux polarisations incidentes $0, \pi/3$ et $2\pi/3$. Cependant, au moins 4 images sont nécessaires pour remonter à ϕ . Notons que U et $|V|$ dépendent principalement de l'intensité I_0 du laser incident, de la concentration locale en harmonophore $c(r)$ et des composantes du tenseur $\chi^{(2)}$, comprises dans ρ . Pour résumer, la détermination de ϕ donne l'orientation de Z_χ , orientation fortement corrélée à l'orientation de la fibrille elle-même (nous le verrons par la suite), et le ratio

$$r = |V|/U = 4(\rho^2 - 1)/(3\rho^2 + 2\rho + 7) \quad (2.8)$$

qui est uniquement une fonction de ρ , et qui sera utilisé par la suite pour l'estimation de ce paramètre. Comme ρ varie de 0 à $+\infty$, $r\rho$ est une fonction croissante variant entre $-4/7$ et $4/3$. L'équation 2.8 peut être inversée, ce qui donne pour $\rho > 0$:

$$\rho = \frac{r + 2\sqrt{4(1+r) - 5r^2}}{4 - 3r} \quad (2.9)$$

avec $r = |V|/U$ sous l'hypothèse que $\rho > 1$ (pour le collagène) et $r = -|V|/U$ si $0 < \rho < 1$ (pour la myosine), car seule la valeur absolue de $|V|/U$ peut être mesurée à partir de l'analyse polarimétrique.

Nous pouvons ainsi mesurer l'orientation ϕ de l'axe principal de $\chi^{(2)}$ et un terme de couplage ρ avec seulement 4 images. Nous avons en outre montré que ϕ est parfaitement corrélé à l'orientation des fibrilles [Odin, 2007] ; [Odin, 2008] [figures 2.13e) et 2.15e)].

Ainsi, le champ d'orientation mesuré par SHG se confond avec le champ d'orientation des fibrilles (collagène ou myosine). C'est un résultat important qui découle d'une mesure directe d'orientation, contrairement à beaucoup de résultats utilisant une reconstruction indirecte, par exemple par traitement d'image avec des opérateurs gradient.

La méthode OF-SHM nécessitant au moins 4 images SHG successives avec différentes polarisations du laser, elle met en jeu un grand nombre d'opérations qu'il est nécessaire d'automatiser, tant pour gagner du temps que pour minimiser les erreurs possibles. C'est ce que nous présentons dans le paragraphe suivant. Deux exemples d'applications de notre méthode sont donnés dans la suite de ce chapitre, la première portant sur le collagène issu du tendon d'agneau, la seconde sur la myosine du muscle de veau.

2.4.2 Implémentation et automatisation de la méthode OF-SHM

Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé est celui décrit au chapitre 1. Pour contrôler l'orientation de la polarisation du laser excitateur, une lame demi-onde ($\lambda/2$) est placée sous l'objectif, en lieu et place de la roue porte filtres utilisée pour la microscopie de fluorescence en champ large. L'orientation de cette lame est contrôlée à l'aide d'une platine de rotation (PR50CC, Newport). La lame $\lambda/2$ permet de faire tourner la polarisation rectiligne du laser (rotation d'un angle 2θ , où θ est l'angle de rotation de la lame $\lambda/2$) tout en conservant la nature rectiligne de la polarisation. Nous avons commencé nos expériences en utilisant une lame $\lambda/2$ achromatique et traitée anti-reflets dans la gamme $700 - 1000nm$ (lame en quartz et MgF_2 , réf. F46-561, Edmund Optics, UK). Nous nous sommes vite aperçu que cette lame génère un signal SHG parasite fortement dépendant de son orientation par rapport à la polarisation du laser incident. Cette dépendance en polarisation (figure 2.9a), mesures représentées par les cercles pleins) peut être simplement interprétée par une loi en \cos^4 ou \sin^4 (en fonction de la référence choisie pour les angles) de l'angle d'orientation, car le quartz possède une susceptibilité non linéaire dominée par une seule composante (χ_{xxx} ou d_{11}). L'épaisseur de quartz nécessaire à la réalisation d'une lame $\lambda/2$ achromatique en association avec MgF_2 est telle ($e = \frac{(2k+1)\lambda}{2\Delta n}$, avec $k \in \mathbb{N}$) que le signal SHG produit est non négligeable par rapport aux signaux générés par le collagène ou la myosine, et très supérieur au bruit de fond dans les images SHG.

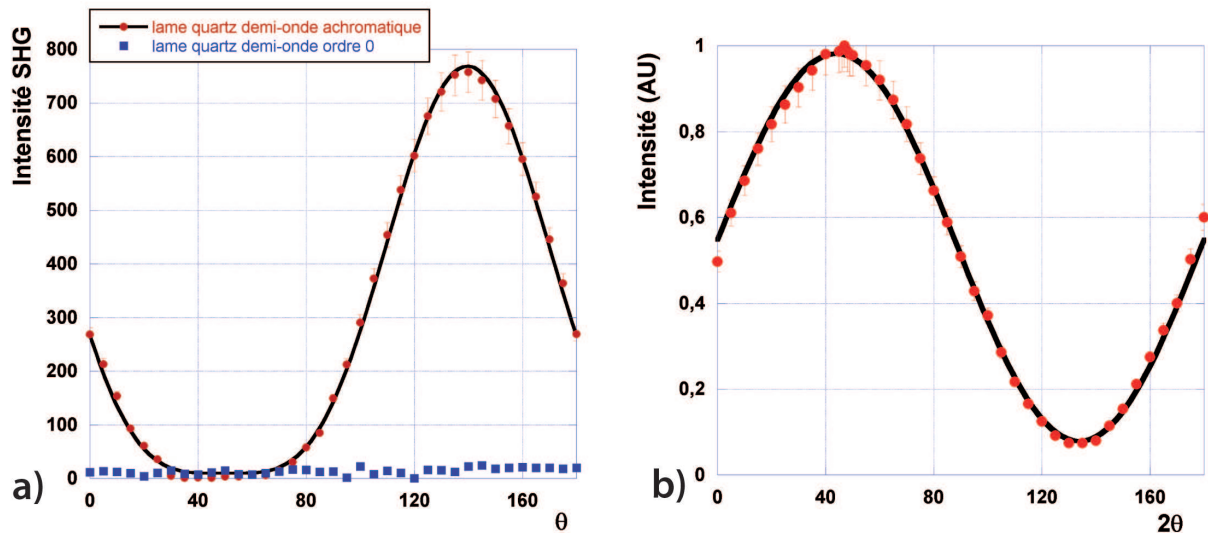


FIGURE 2.9 : Caractérisation de lames demi-ondes : **a)** Intensités SHG générées par les lames demi-ondes achromatique et d'ordre 0. L'ajustement (ligne pleine) des points de mesures correspondants à la génération de seconde harmonique de la lame achromatique est réalisée à partir d'une équation en \sin^4 : $I = I_0 \sin^4(\theta - \theta_0)$; **b)** Caractérisation de la lame $\lambda/2$ d'ordre 0 à la longueur d'onde laser ($\lambda = 810nm$), avec analyseur à la détection. L'ajustement (en trait plein) des points de mesure est réalisé à partir de la loi de Malus ($I = a + I_0 \cos^2 \theta$), a une constante.

Nous avons donc opté pour une lame $\lambda/2$ d'ordre 0 à 830nm (réf. F46-413, Edmund Optics, UK) dont l'épaisseur est la plus faible possible pour une telle lame ($e = \frac{\lambda}{2\Delta n} \approx \frac{0.830}{2.9 \cdot 10^{-3}} \approx \frac{10^3}{20} \approx 50\mu\text{m}$). La réponse SHG de cette lame est donnée figure 2.9a) (mesures représentées par des carrés). Cette fois la dépendance en polarisation est noyée dans le bruit de fond des image ; le signal SHG parasite de la lame est donc négligeable. Cette lame est en outre spécifiée par le constructeur comme quasi-achromatique dans un domaine spectral de $\pm 2\%$ autour de la longueur d'onde centrale, c'est-à-dire ici dans le domaine $814 - 846\text{nm}$. Elle peut donc *a priori* être utilisée à notre longueur d'onde de travail de 810nm . Nous avons néanmoins vérifié que la polarisation du laser en sortie de la lame conservait son caractère linéaire en mesurant l'intensité à travers un analyseur (loi de Malus, figure 2.9b)). Cette méthode permet en outre de connaître précisément l'orientation des lignes neutres de la lame $\lambda/2$, afin de déterminer l'angle ψ de la polarisation du laser incident (figure 2.8a)).

2.4.3 Automatisation de la méthode

L'interprétation de phénomènes biologiques observables en microscopie optique nécessite généralement l'acquisition d'une série d'images en fonction d'un paramètre extérieur. Que ce soit la température, le déplacement ou la rotation d'une platine ou plus généralement une action extérieure, la synchronisation d'un événement contrôlé avec l'acquisition d'images par un microscope peut s'avérer très utile. La plupart des logiciels qui pilotent un microscope pour l'acquisition d'images en série, fournissent des signaux de synchronisation qui peuvent être utilisés pour déclencher des opérations externes. Au lieu d'acquérir une carte d'interfaçage dédiée à cette synchronisation, nous proposons d'utiliser l'entrée audio de la carte son d'un PC fixe ou portable. Nous présentons dans la suite une technique utilisant LabVIEW pour synchroniser l'acquisition d'une série d'images avec la rotation d'une platine tournante motorisée.

La méthode OF-SHM étant basée sur la mesure de l'intensité SHG en fonction de l'état de polarisation du faisceau laser incident, l'élément extérieur à contrôler est une platine de rotation (PR50, Newport) entraînant la lame demi-onde (Edmund Optics, UK). L'angle de référence de la platine est défini dans la description du dispositif expérimental, plus haut dans ce chapitre. Cette platine est pilotée par un logiciel fourni par le constructeur (SMC-MOTION, Newport), et communique *via* le protocole RS232/V24. Notons ici que depuis la fin des années 90, les PC commercialisés ne disposent plus d'interface série (ou port COM), indispensable pour communiquer en RS232. Il existe cependant une alternative qui consiste à installer un émulateur de port série (par exemple <http://www.ftdichip.com/Drivers/VCP.htm>). En informatique, une émulation consiste à substituer un élément matériel par un logiciel. La mise en place d'un tel logiciel permet de dialoguer avec la platine RC50 *via* un port USB en utilisant un câble USB vers RS232 (SMC-USB, Newport). Il est alors possible d'envoyer les instructions et d'acquérir les données utiles grâce au logiciel de pilotage dédié fourni par le constructeur, mais également à partir d'un programme écrit sur la base de la bibliothèque d'instructions également livrée avec la platine. Ainsi, le développement d'un programme personnalisé est possible, en utilisant le logiciel

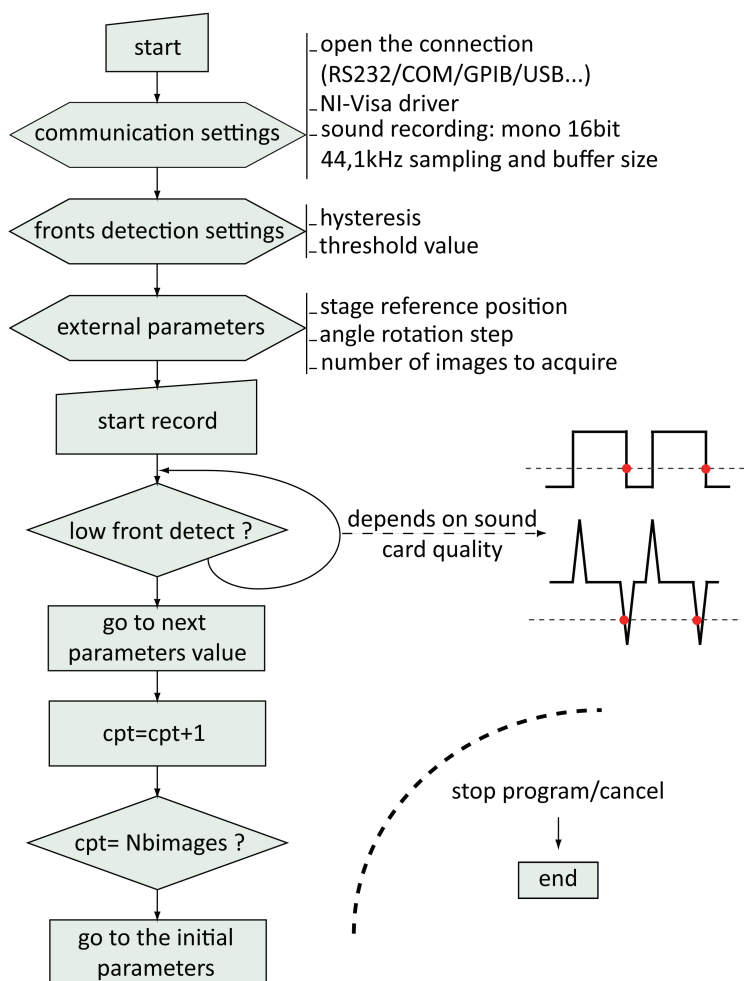


FIGURE 2.10 : Organigramme du programme LabVIEW.

de programmation LabVIEW, qui a pour principal avantage d'être dédié à l'interfaçage.

Pour mettre en place l'automatisation, un signal normalisé TTL (0 – 5V) est prélevé sur l'un des ports du boîtier Olympus FV5-PSU contrôlant le module confocal du microscope. Ce signal est synchrone de l'acquisition d'une image par le logiciel Fluoview. Il prend la valeur 0V hors activité des scanners, et passe à 5V au moment où l'acquisition de l'image commence. A la fin du balayage de l'image, Ext-Trig repasse à 0V. Ce signal est appliquée à l'entrée audio (mini jack) *via* un diviseur de tension (montage potentiométrique). Le logiciel d'interfaçage LabVIEW permet, entre autre, de retranscrire le signal qui arrive sur cette entrée.

L'organigramme du programme développé est présenté figure 2.10. L'entrée micro d'une carte son est équipé d'un filtre passe-bande (40Hz à 15kHz pour la carte que nous utilisons, Realtek ALC850 AC'97). Le programme LabVIEW développé pour cette application est à l'écoute de l'entrée micro de la carte son du PC sur laquelle est injecté le signal TTL atténué. L'acquisition

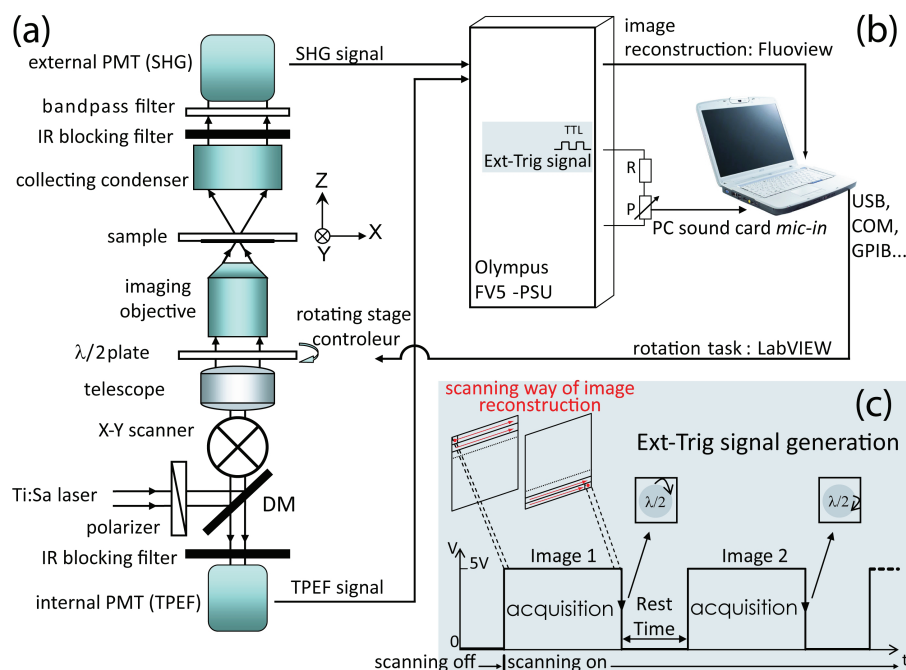


FIGURE 2.11 : Automatisation de la méthode OF-SHM. **(a)** Schéma du dispositif expérimental mis en place pour la microscopie multiphotonique polarimétrique. DM = miroir dichroïque ; PMT = tube photomultiplicateur. **(b)** Configuration matérielle : R et P représentent respectivement les résistances fixe et variables utilisées pour adapter le signal TTL à l'entrée de la carte son du PC. **(c)** Correspondance entre le signal TTL Ext-Trig délivré par le microscope, et les différentes tâches accomplies : l'acquisition d'image et la rotation de la platine. Le temps Rest Time entre l'acquisition de deux images successives est calculé pour permettre la rotation de la platine.

du signal Ext-Trig se fait en temps réel en 16 bits mono échantillonné à 44.1KHz . La fréquence de coupure basse du filtre audio a un effet dérivateur sur le signal TTL, en produisant un pic d'impulsion positif pour un changement d'état de 0 à 5V et un pic négatif pour un changement d'état de 5 à 0V. Quoi qu'il en soit, notre programme gère les deux situations. Il suffit donc d'indiquer au programme le niveau de détection de ce qui sera considéré comme le passage d'un état haut vers un état bas (hystérésis), dans les limites des valeurs acceptées par LabVIEW.

Dans le cas général, la détection d'un front montant est synonyme du début de l'acquisition d'une image par le microscope. A la fin de cette acquisition, le programme attend le front bas, information nécessaire pour déclencher la rotation de la platine Newport. Le principe de fonctionnement général de cette méthode d'automatisation est donné figure 2.11.

La rotation de la platine n'étant pas instantanée, nous devons prévoir un temps d'attente (Rest Time) entre l'acquisition de deux images successives sous Fluoview. Ce temps d'attente est calculé empiriquement à partir de la vitesse de rotation moyenne de la platine (20°s^{-1}) donnée par le constructeur. A ce temps de base, on ajoute un temps supplémentaire, dit "temps mort", pour tenir compte du démarrage et de l'arrêt de la rotation. Par exemple, une rotation de 7.5° ne

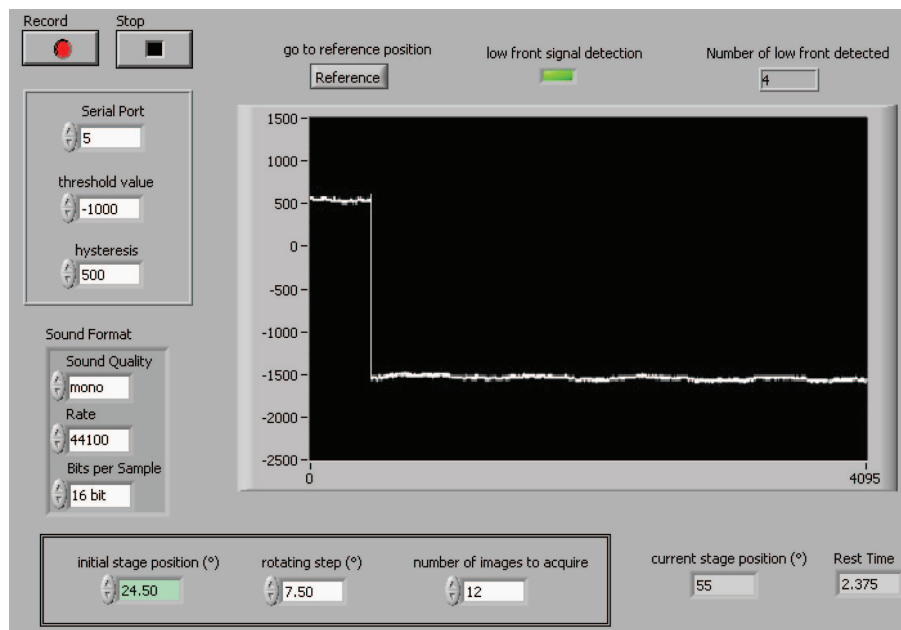


FIGURE 2.12 : Face avant du programme LabVIEW utilisé pour effectuer l'analyse en polarisation de la microscopie SHG. Tous les paramètres sont ajustables directement par cette voie. Un oscilloscope virtuel permet également de visualiser le signal délivré par la carte son.

doit prendre en principe que $0.4s$, mais nous rajoutons $2s$ de temps mort en imposant un Rest Time de $2.4s$ sur Fluoview. Plus concrètement, l'acquisition d'une série d'images avec 12 polarisations, de résolution 512×512 et 1024×1024 pixels, prend 1 et 2.5 minutes respectivement. La méthode OF-SHM ne nécessitant que 4 polarisations, ce temps d'acquisition est réduit à 32 et 49s respectivement. On voit par là l'intérêt de l'automatisation de la méthode : la rapidité d'acquisition alliée à la précision de la platine (0.01°) permet de mettre en place la méthode OF-SHM rapidement et simplement. Pour mieux comprendre le principe de ce programme, l'organigramme d'exécution est présenté figure 2.10, ainsi que la face avant de pilotage du logiciel, figure 2.12.

Les paramètres à indiquer au programme sont donc :

- le numéro de port série émulé par le PC ;
- la valeur du seuil à atteindre pour détecter un front, ainsi que l'hystérésis qui lui est associé ;
- le format audio à détecter (par défaut mono, 16 bits, $44.1KHz$) ;
- la position initiale de la platine ;
- le pas de rotation de la platine ;
- le nombre d'images à acquérir
- le temps d'attente (Rest Time) nécessaire au déplacement complet d'un pas de rotation de la platine

Une fois que tous ces paramètres sont affectés au programme, un clic sur l'icône "enregistrement" déclenche l'écoute de l'entrée micro de la carte son. dès que le signal de synchronisation dépasse les limites indiquées et traverse l'hystérésis, le front est détecté et la platine tourne du pas d'angle indiqué par l'utilisateur. Une fois que le nombre d'images à acquérir est atteint, la

platine retourne automatiquement à sa position initiale et est prête à commencer un nouveau cycle.

Ce programme a été testé et validé sur un PC portable (IBM Intel Celeron CPU 2GHz, 256Mo RAM) extérieur au dispositif expérimental de microscopie multiphotonique, pour des raisons pratiques. Il est important de noter cependant que ce logiciel peut être implémenté directement sur le PC pilotant le logiciel du microscope, en utilisant sa propre carte son. Dans notre cas, il s'agit d'un PC fixe Intel Pentium 4 CPU 3GHz, 2GO RAM. L'automatisation de la méthode OF-SHM fonctionne parfaitement dans les deux configurations.

2.4.4 Application de la méthode OF-SHM au collagène et à la myosine

Après avoir présenté le dispositif expérimental permettant l'acquisition d'images de TPEF et SHG ainsi que l'automatisation de la méthode OF-SHM, nous donnons dans cette partie quelques exemples d'application de cette méthode.

Les images SHG sont acquises plein champ, avec 512×512 pixels, codées en 12bit, et enregistrées au format TIFF, *via* le logiciel Fluoview. La vitesse de balayage a été fixée à la plus faible valeur, à savoir 2.68s par image, soit un temps de résidence par pixel de $10.2\mu s$. L'analyse d'image est effectuée en routine par un programme Matlab [The MathWorks, Natick, MA, USA] développé à cet effet, ainsi que par le logiciel ImageJ [W. Rasband, National Institute of Health, USA]. Avant de traiter et de combiner les n images $I_n(\phi)$, trois opérations sont réalisées :

1. Les pixels détectés comme saturés (valeur maximale 4095 correspondant à 12 bit) ou égaux à 0 sur au moins une des n images du stack, ne sont pas pris en compte dans la suite du traitement d'image. En effet, ces pixels ne sont porteurs d'aucune information d'intensité.
2. Le bruit typique apparaissant lors d'une acquisition d'une image SHG, de type "sel et poivre", est atténué en appliquant un filtrage gaussien ou uniforme 3×3 . Ces deux filtres donnent le même résultat.
3. Comme à l'étape (1), les pixels dont les intensités I_{02} ou I_{31} sont nulles ou saturées, sont ignorés.

OF-SHM du collagène

Le tendon d'agneau est un très bon modèle pour illustrer le fonctionnement de la méthode OF-SHM. En effet, le collagène de type I compte pour 65 à 80% de la masse sèche du tendon d'agneau et produit un fort signal SHG. De plus, le tendon a une structure avec des fibrilles bien orientées macroscopiquement, structure qui se retrouve également au niveau microscopique. Cette architecture de fibrilles et microfibrilles bien orientées fournit ainsi un modèle très intéressant pour la mesure d'orientations fibrillaires.

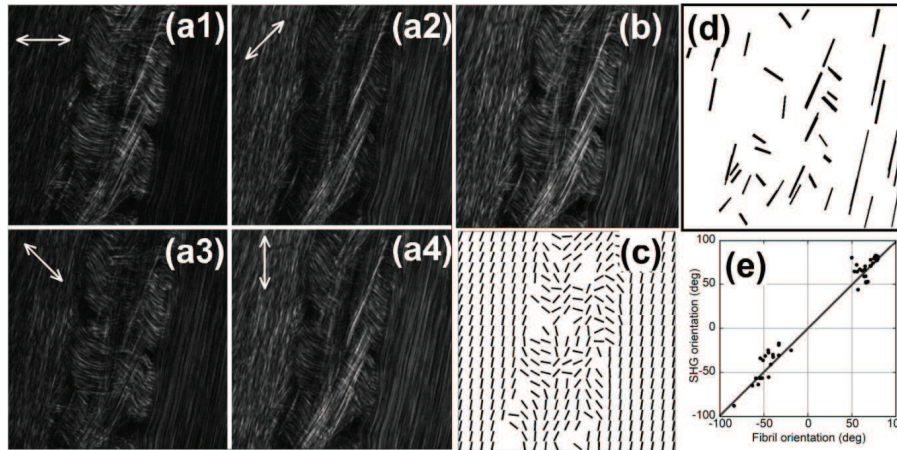


FIGURE 2.13 : Image SHG du collagène de tendon d'agneau (objectif 60x à eau $NA=1.2$, images (512×512) , pleine échelle : $235\mu m$). (a1-a4) Images SHG avec les 4 polarisations incidentes indiquées par les doubles flèches blanches. (b) Image isotrope. (c) Champ d'orientation représenté par les barres noire correspondant à l'axe de symétrie de la susceptibilité non linéaire (reconstruit par bloc de (16×16) pixels) (d) Sélection de différents masques le long de fibres bien orientées. (e) Corrélacion entre l'orientation apparente de la fibre (en abscisse) et l'orientation de l'axe principal de la susceptibilité non linéaire SHG contenue dans le masque (en ordonnée).

Les échantillons de tendons d'agneau ont été pris directement chez le boucher le matin même de l'expérience. Des coupes fines de 100 à $200\mu m$ ont été effectuées et placées entre une lame de microscope et une lame couvre objet de $170\mu m$ d'épaisseur. Pour éviter une déshydratation trop rapide des échantillons, le couvre objet est scellé à la lame de microscope au moyen de vernis à ongles.

La figure 2.13a1-4) présente 4 images SHG, générées par le collagène de type I du tendon d'agneau, et acquises avec les 4 polarisations incidentes $\psi = 0, 45, 90$ et 135° . Nous avons choisi cette zone parce qu'elle comporte deux parties avec des fibres d'orientations très différentes, et des degrés de désordre différents. La variation de contraste d'une image à l'autre apparait clairement, et montre de manière évidente que la réponse SHG du collagène est très anisotrope. L'image indépendante de la polarisation, obtenue par moyenne des 4 images, est présentée figure 2.13(b). Sur cette image, le contraste dépend principalement de la concentration en harmonophores dans le volume focal du microscope et des valeurs de χ_{zzz} et χ_{zxx} . La reconstruction du champ d'orientation est présentée figure 2.13c), où chaque barre représente l'orientation moyenne de l'axe principal du tenseur de susceptibilité non linéaire, obtenue par la moyenne circulaire de blocs de 16×16 pixels. Cette orientation est fortement corrélée à l'orientation de la fibrille elle-même, ces résultats ayant été publiés par notre équipe, [Odin, 2007] ; [Odin, 2008] ; [Odin, 2009]. La quantification de cette corrélation entre l'orientation du PAS (*Principal Axis System*) et des fibres est effectuée en sélectionnant manuellement des zones d'intérêts (*ROI* : region of interest) rectangulaires le long de fibres bien orientées, comme sur la figure 2.13d) pour en faire des masques binaires. Il est alors possible de mesurer l'orientation des masques ainsi sélectionnés, ainsi que l'orientation moyenne ϕ_M de l'angle de l'axe principal de la susceptibilité non linéaire

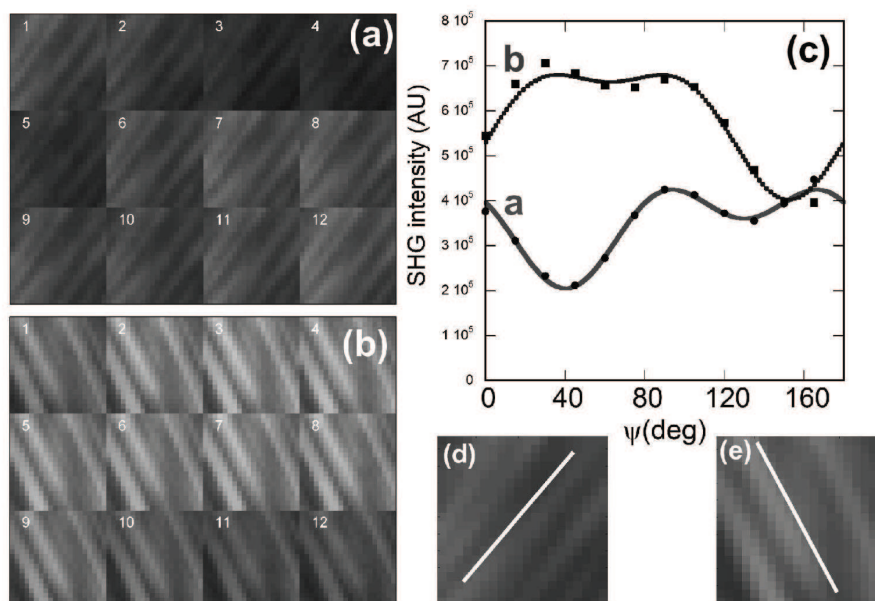


FIGURE 2.14 : Image SHG du collagène contenu dans du tendon d’agneau (objectif 60x à eau NA=1.2, images 20×20), pleines échelles, $18 \mu\text{m}$) à 12 polarisations différentes $n\pi/12$, avec $n = 0-11$. (a-b) Images SHG de 2 ROIs en fonction des différentes polarisations. (c) Intensités SHG moyennes en fonction de la polarisation. La ligne continue est l’ajustement avec l’équation 2.2 (d-e) Images isotropes des deux ROIs. Les barres superposées aux ROIs correspondent aux orientations correspondantes aux valeurs trouvées par les différents ajustements.

SHG contenue dans ce même masque. L’angle moyen ϕ_M est calculé en utilisant les méthodes de statistiques circulaires [Mardia, 2000], en particulier l’expression suivante pour la moyenne angulaire :

$$\phi_M = \frac{1}{2} \text{atan2} \left(\frac{\sum_{\alpha, \beta \in M} \sin(\phi_{\alpha\beta})}{\sum_{\alpha, \beta \in M} \cos(\phi_{\alpha\beta})} \right) \quad (2.10)$$

où les sommes sont effectuées sur tous les pixels contenus dans le masque, et $\phi_{\alpha\beta}$ sont les orientations du PAS pour ce pixel. Les résultats obtenus sont tracés sur un graphe de corrélation figure 2.13e). Les données sont bien alignées le long de la bissectrice, avec un coefficient de corrélation au carré $R^2 = 0.97$, indiquant que la direction du PAS se confond avec celui de la fibre et démontrant ainsi que la méthode OF-SHM permet d’obtenir l’orientation des fibrilles avec une bonne précision.

Des valeurs précises de ρ peuvent être obtenues en analysant le signal SHG moyen d’une ROI en fonction de l’angle de polarisation du faisceau laser incident, et en ajustant l’équation 2.2 pour estimer le ratio $r = |U|/V$. Pour ce faire, l’acquisition automatique de 12 images à différentes polarisations incidentes $n\pi/12$, où $n = 0, 1, \dots, 11$ a été effectuée. Ainsi, l’évolution du contraste en fonction de la polarisation incidente est illustrée figure 2.14a-b) sur deux ROI de 20×20 pixels. Ces deux ROI ont été choisies à l’œil, pour avoir deux orientations clairement différentes.

Echantillons	Obj	$\langle \rho \rangle \pm \sigma_\rho$	$\theta \pm \Delta\theta$ (deg)
Collagène tendon d'agneau (4 images)	60X-W-1.2	1.8 ± 0.3	46.7 ± 2.4
Collagène tendon d'agneau (12 images)	60X-W-1.2	1.4 ± 0.1	50.1 ± 0.1
Myosine muscle de veau	60X-W-1.2	0.6 ± 0.2	61.8 ± 4.1
Myosine muscle de veau	10X-0.25	0.6 ± 0.1	61.6 ± 3

TABLE 2.3 : Valeurs moyennes de ρ pour le collagène et la myosine. $\langle \rho \rangle$ et σ_ρ sont respectivement la valeur moyenne et la déviation standard de ρ calculées directement à partir des images SHG. Les angles polaires $\bar{\theta}$ et les incertitudes associées $\Delta\theta$ sont calculées à partir de l'équation 2.11 : $\theta_\pm = \text{atan}(\sqrt{2}/(\langle \rho \rangle \pm \sigma_\rho))$, où σ_ρ correspond à l'incertitude de mesure de ρ , d'où il vient $\bar{\theta} = (\theta_+ + \theta_-)/2$ et $\Delta\theta = (|\theta_+ - \theta_-|)/2$.

L'évolution des intensités moyennes SHG des différentes ROIs est tracée figure 2.14c) et est ajustée par l'équation 2.2. Les ajustements ont été réalisés en utilisant la méthode des moindres carrés linéaire avec les 5 paramètres U , $V \cos(2\phi)$, $V \sin(2\phi)$, $W \cos(2\phi)$ et $W \sin(2\phi)$. Les coefficients de corrélation correspondant aux deux ajustements sont supérieurs à 0.98. L'orientation fibrillaire moyenne ϕ est donnée figure 2.14d-e), représentée par une barre blanche superposée à l'image isotrope de chaque ROI. Comme on peut le remarquer à l'œil, les deux directions données par les barres blanche correspondent parfaitement à l'orientation réelle des fibres.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'inversion de la relation entre $r = |U|/V$ et ρ , et l'hypothèse stipulant que $\rho > 1$ pour le collagène, permet d'obtenir *via* l'équation 2.9, $\rho = 1.4 \pm 0.1$ pour l'expérience basée sur l'acquisition de 12 images SHG, et $\rho = 1.8 \pm 0.3$ dans celle à 4 images (table 2.4.4). Ces résultats sont pertinents par rapport à ceux que l'on peut trouver dans la littérature. Les valeurs mesurées pour ρ varient entre 0.8 pour des tendons immatures [Roth, 1979], à 2.6 pour des tendons adultes [Williams, 2005], en passant par des valeurs intermédiaires [Freund, 1986]; [Stoller, 2002]. Ces variations sont certainement dues aux différences entre les tissus, à leur age, mais également aux différents systèmes d'imagerie utilisés. En effet, en 1979, le système de Roth et Freund est incapable de résoudre les fibrilles individuelles, et moyenne donc la valeur de ρ sur de grandes zones où l'alignement des fibres n'est pas parfait.

Enfin, il est également possible de remonter à la mesure de l'angle de l'hélice de la molécule de collagène θ_{col} . Dans l'hypothèse où la susceptibilité non linéaire est issue de l'arrangement d'harmonophores avec une symétrie azimutale (figure 2.8(b)), et que le tenseur d'hyperpolarisabilité microscopique peut être correctement approximé par une composante axiale unique β_{zzz} , alors ρ est relié à l'angle polaire θ de l'axe principal lié à β_{zzz} conservant l'axe de symétrie axiale Z_χ :

$$\rho = 2/\tan^2\theta \tag{2.11}$$

On trouve alors, pour $\rho = 1.4 \pm 0.1$, $\theta \pm \Delta\theta = 50.1^\circ \pm 1$ et pour $\rho = 1.8 \pm 0.3$, $\theta \pm \Delta\theta = 46.7^\circ \pm 2.4$.

Ces résultats sont en bon accord avec ceux trouvés dans la littérature [Stoller, 2002] ; [Chu, 2004] ; [Plotnikov, 2006a] ; [Tiaho, 2007] ; [Han, 2008], en particulier pour la valeur de l'angle de l'hélice de la molécule de collagène qui est référencé à 45.3° .

OF-SHM de la myosine

Les muscles sont organisés en fagots de fibres bien orientées, les fibres elles-mêmes étant hiérarchisées en des centaines de myofibrilles organisées parallèlement les unes aux autres. Comme pour le collagène, nous avons cherché à corrélérer la mesure d'orientation du PAS du $\chi^{(2)}$ de la myosine à l'orientation des myofibrilles. La difficulté a été de trouver des échantillons de muscles où ces fibres peuvent être observées de manière isolée. En effet, les images SHG de la myosine, du muscle de veau par exemple pour les figures 2.3 et 2.4, montrent des structures formées par l'arrangement de bandes striées, sans résoudre les myofibrilles, le muscle apparaissant "lisse". En revanche, nous avons remarqué que nous pouvions résoudre les myofibrilles dans le muscle du dos d'embryon de poulet [Odin, 2008], comme l'indique la figure 2.15. En effet, les myofibrilles du dos d'embryon de poulet commencent à se former au 6^{ème} jour d'incubation. Après le 8^{ème} jour d'incubation, ces myofibrilles commencent à se regrouper entre elles pour former des cellules musculaires [Stromer, 1974].

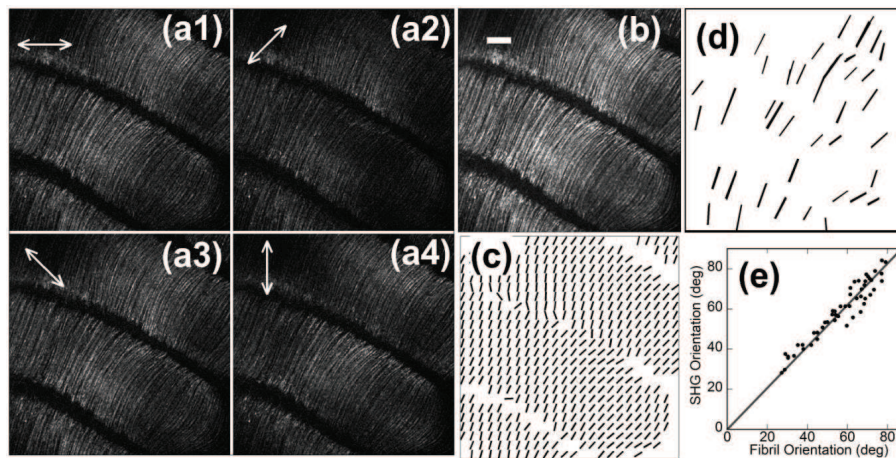


FIGURE 2.15 : Images SHG de la myosine du muscle du dos d'embryon poulet au 7^{me} jour d'incubation (objectif 10x-NA0.25, images 768×768 , pleine échelle : $938\mu m$). Barre d'échelle : $100\mu m$. (a1-a4) Images SHG avec les 4 polarisations incidentes indiquées par les doubles flèches blanches. (b) Image isotrope. (c) Champ d'orientation représenté par les barres noire correspondant à l'axe de symétrie de la susceptibilité non linéaire (reconstruit par bloc de (16×16) pixels) (d) Sélection de différents masques le long de fibres bien orientées. (e) Corrélation entre l'orientation apparente de la fibre (en abscisse) et l'orientation de l'axe principal de la susceptibilité non linéaire SHG contenue dans le masque (en ordonnée).

En isolant par traitement d'image des segments linéaires de myofibrilles, nous pouvons ainsi corrélérer l'orientation physique du segment à l'orientation du PAS, par une méthode similaire à celle utilisée pour le collagène. Comme l'indique la figure 2.15(e), les angles sont bien répartis sur la bissectrice, avec un coefficient de corrélation $R^2 \approx 0.93$. Ainsi, comme pour le collagène, nous

pouvons en déduire que l'orientation du PAS donne l'orientation des myofibrilles. Avec ce résultat, nous pouvons nous poser la question de l'orientation des myofibrilles dans le muscle de veau (escalope), où elles ne sont pas résolues. Les figures 2.16(a-b) montrent une image d'escalope de veau obtenue par microscopie multiphotonique avec un objectif $10X - NA0.25$, avec un contraste de fluorescence excitée à deux photons (figure 2.16(a) : TPEF), et un contraste SHG (figure 2.16(b)).

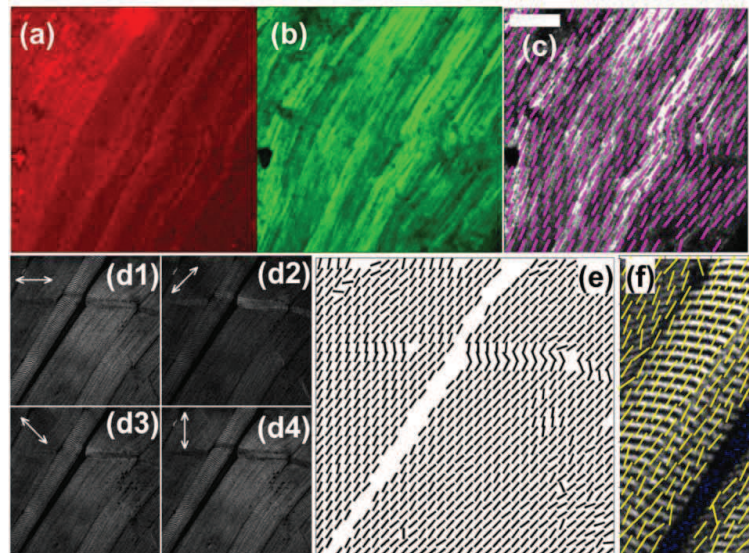


FIGURE 2.16 : 1ère série d'images : TPEF et SHG de myosine contenu dans du muscle de veau, et reconstructions de champs d'orientation (objectifs $10x - NA0.25$, images (400×400) , barre d'échelle $100\mu m$). (a) Image TPEF. (b) Image SHG. (c) Champs d'orientation superposé à l'image SHG isotrope. 2nde série d'images : SHG et reconstructions de champs d'orientation (objectif $60X$ à eau, $NA 1.2$, images (1024×1024) , pleine échelle $235\mu m$). (d1-4) Images acquises avec 4 polarisations différentes. (e) Champs d'orientation. (f) Détail du champ d'orientation reconstruit superposé à la ROI de l'image SHG isotrope.

En considérant maintenant les champs d'orientation obtenus par la méthode OF-SHM sur les images acquises au grossissement $10X - NA0.25$ et $60X - NA1.2$, on peut observer certaines différences. La reconstruction du champ d'orientation de la figure 2.16(c) au grossissement $10X$ suit bien l'orientation apparente des myofibrilles, comme observé sur les images TPEF et SHG. Un bon accord est également observé à plus fort grossissement ($60X$), comme le montre les figures 2.16(d-e-f). Cependant, la figure 2.16(f) montre un résultat intéressant. La direction mesurée des myofibrilles n'est pas perpendiculaire à la structure en bande striées (sarcomères) donnée par l'image isotrope SHG. Cela conduit naturellement au questionnement sur l'origine de ce décalage d'orientations. Une explication pourrait être la suivante. Si les myofibrilles formant la fibre de myosine avec sa direction principale ont toutes le même point de départ, alors la succession de bandes sombres et claires des sarcomères est en phase, et sera bien perpendiculaire à la direction principale des myofibrilles. En revanche, si les myofibrilles sont décalées de manière continue tout en restant alignées suivant la même direction, alors les bandes sombres et claires apparaîtront avec un angle par rapport à la direction d'alignement. Ainsi, nous avons montré

que l'hypothèse, parfois utilisée dans des articles pour donner une référence angulaire pour une étude SHG polarimétrique, suivant laquelle l'axe des myofibrilles est perpendiculaire aux bandes sombres et claires n'est pas toujours vérifiée. Rappelons que l'écart n'est pas négligeable, puisqu'il est de $\approx 30^\circ$ sur cet échantillon. On voit par là l'intérêt de la méthode OF-SHM pour interpréter les images de systèmes fibrillaires fournies par la microscopie SHG, où l'orientation réelle des fibres n'est pas toujours celle visible sur les images.

Les résultats obtenus pour les valeurs de ρ et $\bar{\theta}$ pour la myosine sont présentés dans la table 2.4.4 et correspondent bien à celles que l'on peut trouver dans la littérature [Plotnikov, 2006a].

La méthode OF-SHM permet donc, à partir de seulement 4 images SHG acquises pour 4 polarisations différentes du laser excitateur, de reconstruire le champ d'orientation de l'axe principal de la susceptibilité non linéaire de l'échantillon étudié, en supposant une symétrie de type cylindrique. Nous avons pu montrer, pour le collagène et la myosine, que cette orientation est en fait celle de la fibre. La méthode offre également la possibilité de remonter à une image des paramètres ξ et ρ . Dans l'hypothèse d'une structure cylindrique à partir d'harmonophores ayant une hyperpolarisabilité avec un β_{zzz} prépondérant, alors $\xi = 1$ et ρ contient une information sur l'angle polaire des harmonophores dans la fibre. Enfin, la combinaison des 4 images permet d'obtenir une image isotrope, dont le contraste dépend principalement de la concentration en harmonophore $c(r)$. L'automatisation de la technique permet d'utiliser la méthode OF-SHM en routine, sans intervention manuelle de l'utilisateur, apportant ainsi une reproductibilité et un gain de temps importants. Enfin, l'intérêt de n'utiliser que 4 images, outre la rapidité d'acquisition, est de limiter au maximum les photodommages causés à l'échantillon. Par exemple, les axonèmes sont détruits au bout de 6 à 8 balayages, rendant très difficile l'étude de ces objets nanoscopiques. La méthode OF-SHM a ainsi pu être appliquée pour la première fois aux axonèmes [Odin, 2009].

Imagerie multiphotonique du muscle squelettique

Le muscle peut être considéré comme un matériaux composite dont la structure, d'une très grande complexité, est directement reliée à sa fonction physiologique de génération et de transmission de forces, assurant posture et mobilité [Lepetit & Culioli, 1994]. Il est constitué à 85% de fibres musculaires qui transmettent les forces générées aux parties osseuses *via* une matrice de tissu conjonctif extrêmement résistante (15%) [McCormick, 1994]. Les fibres musculaires transforment l'énergie chimique créée par les molécules d'adénosine triphosphate (ATP), en énergie mécanique, lors du glissement des filaments fins sur les filaments épais. Cette structure contractile élémentaire compose un sarcomère.

Il existe un nombre limité de structures biologiques macromoléculaires ordonnées de telle sorte qu'elles émettent un signal de seconde harmonique. Deux d'entre elles sont les collagènes fibrillaires et la myosine, deux composants majeurs du muscle squelettique des animaux vertébrés. La microscopie SHG permet d'imager sans marquage ces structures, avec une résolution comparable aux techniques histologiques utilisées en routine par les biologistes. De plus, l'émission de fluorescence excitée à deux photons permet de visualiser en autofluorescence la matière biologique qui contient de nombreux fluorophores endogènes. La microscopie multiphotonique apparaît donc être un outil particulièrement bien adapté à l'étude endogène du muscle squelettique.

Les propriétés mécaniques du muscle squelettique régissent ses caractéristiques de texture, sa tendreté organoleptique. Ces propriétés sont directement dépendantes de chacune des structures conjonctive et myofibrillaire, ainsi que de leurs interactions. Ainsi, nous avons initié une série d'études préliminaires par microscopie multiphotonique afin de mettre en évidence certaines ca-

caractéristiques du muscle, et ainsi de déterminer l'éventuel lien avec la tendreté de la viande, ou encore de mieux caractériser certains stades clés du développement foetal . La mise en œuvre d'outils d'analyses a été une étape importante de ces études qui ont été menées en collaboration avec l'équipe Croissance et Métabolisme du Muscle (C2M) de l'unité de recherche sur les herbivores de l'INRA de Clermont Ferrand/Theix, qui nous a fourni les échantillons, que nous décrivons par la suite.

3.1 Structure et composition du tissu conjonctif du muscle squelettique

Le muscle squelettique est un tissu sous contrôle volontaire du système nerveux central qui recouvre le squelette osseux. Ce tissu musculaire, essentiel dans le métabolisme protéique et énergétique, représente le tissu noble des animaux domestiques élevés pour la production de viande. La composition chimique du muscle squelettique est caractérisée par une forte teneur en eau (75%) et en protéine (19%, dont 60% sont des protéines myofibrillaires et 10% des protéines du tissu conjonctif), et par une faible teneur en lipides (2.5%).

3.1.1 Structure tridimensionnelle

Le muscle squelettique est composé de fibres musculaires enveloppées d'une gaine de tissu conjonctif appelée *endomysium*. Ces fibres sont regroupées en faisceaux de fibres enveloppés par une autre gaine conjonctive appelée *périmysium*. Cette enveloppe de tissu conjonctif contient des vaisseaux sanguins qui irriguent le muscle, et qui se prolongent en capillaires pour atteindre les composantes internes du muscle. Enfin, le tissu conjonctif qui enveloppe le muscle squelettique est appelée *épimysium* [Schmitt, 1979] (figure 3.1).

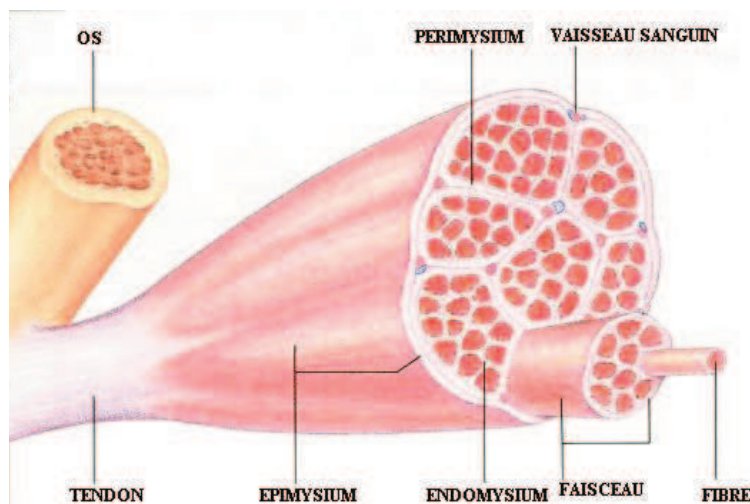


FIGURE 3.1 : Anatomie du muscle squelettique : organisation des différents niveaux de tissu conjonctif constituant le muscle squelettique. (figure tirée de <http://cours.cegep-st-jerome.qc.ca/101-nya-m.b/Organisationcellulaire/photomusclstrie.htm>)

Au sein de cette structure, l'endomysium est l'enveloppe la plus fine ($0.2\mu\text{m}$ d'épaisseur). Le périmysium ($10\mu\text{m}$ à $200\mu\text{m}$ d'épaisseur) présente plusieurs niveaux d'organisation, dont le niveau le plus grossier est appelé périmysium primaire. Cette trame se divise ensuite en périmysium secondaire puis tertiaire, de plus en plus fine, au fur et à mesure que l'on se rapproche de la fibre musculaire (figure 3.2).

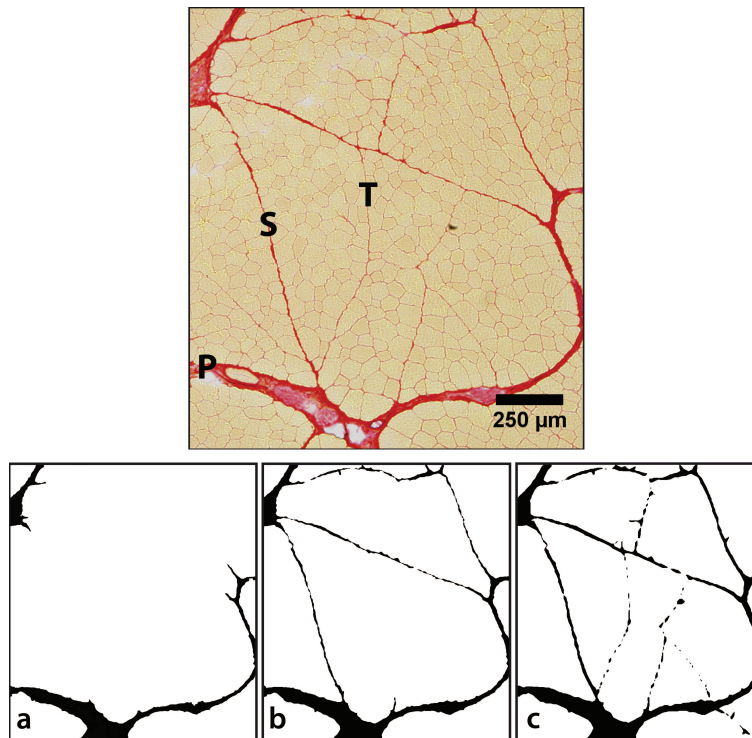


FIGURE 3.2 : En haut : Image d'une coupe histologique transverse de muscle bovin Angus marquée au rouge Sirius (objectif 4x); (**P**) correspond à une trame de pérимыsium primaire, (**S**) secondaire et (**T**) tertiaire. En bas : **a)** Mise en évidence de la trame primaire par traitement d'image; **b)** Trame primaire + secondaire; **c)** Trame primaire + secondaire + tertiaire.

La hiérarchie des faisceaux de fibres est généralement décrite en sens inverse de celle du pérимыsium. En effet, les faisceaux primaires sont le niveau élémentaire d'organisation des fibres. Ils sont regroupés en faisceaux secondaires puis tertiaires, et ainsi de suite jusqu'à l'épимыsium qui entoure le muscle squelettique [Dumont, 1986].

Le faisceau primaire contient entre 25 et 200 fibres musculaires. Les bordures de fibres à la périphérie du faisceau sont alignées de sorte que le pérимыsium forme une limite rectiligne au faisceau, comme le montre la figure 3.3.

Une fois le faisceau primaire définit, il devient possible de remonter aux ordres supérieurs secondaires, tertiaires, etc... La taille des faisceaux de fibres musculaires varie d'un muscle à l'autre : elle est probablement liée à la distribution des forces que le muscle développe *in vivo*.

3.1.2 Composition moléculaire

Le tissu qui entoure les fibres et les faisceaux musculaires est un tissu conjonctif lâche constitué de cellules et d'une matrice extra-cellulaire (MEC) composée de plusieurs grandes familles de molécules. Nous ne citerons ici que celles qui nous intéressent dans la suite de ce chapitre.

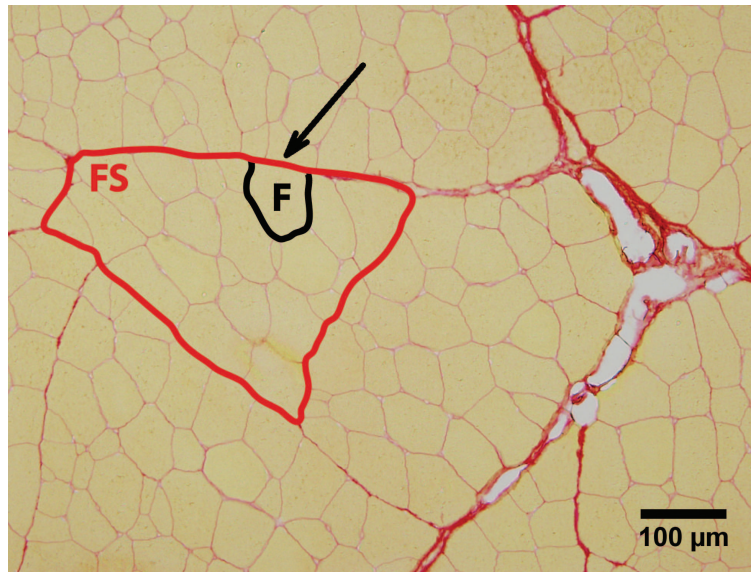


FIGURE 3.3 : Image d'une coupe histologique transverse de muscle bovin Angus marquée au rouge Sirius (objectif 10x); **F** : faisceau primaire; **FS** : faisceau secondaire; la flèche pointe sur la trame de périnysium, limite rectiligne au faisceau **F**.

Les collagènes La composition moléculaire de cette famille de glycoprotéines fibreuses est décrite dans la section 2.1 du chapitre 2 de ce manuscrit.

Dans le muscle on trouve : des collagènes formant des fibrilles (types I, III, V), telles que décrites précédemment ; des FACIT (2.1.1) de types XII et XIV, qui sont des collagènes non fibrillaires ayant la propriété de se lier à la surface des collagènes fibrillaires ; des collagènes formant des feuillets, dont le collagène de type IV ; un collagène dit en "filament perlé", le collagène VI. Les collagènes I, III, V et VI sont distribués dans l'endomysium et le périnysium, le type IV se trouvant exclusivement dans l'endomysium [Maunier-Sifre, 2005], comme l'illustre la figure 3.4.

Les protéoglycanes Un protéoglycane (PG) est une protéine liée par liaisons covalentes à plusieurs (40 à 100) chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs). Ils sont localisés majoritairement à la surface des cellules ou dans la MEC. Ce sont les composants majeurs de la substance amorphe dans laquelle baignent les fibres du tissu conjonctif [Nishiumi, 1999]. Ils forment de grands complexes, en se liant à d'autres PGs et aux protéines fibreuses de la matrice (telles que le collagène). Ils lient les cations (tels que le sodium, le potassium et le calcium) et l'eau, ils régulent le mouvement des molécules à l'intérieur de la matrice et peuvent affecter l'activité et la stabilité des protéines et des molécules de signalisation. Pour certains, il a été montré un rôle dans la fibrillogénèse [Nishimura, 2002]. Les principaux GAGs décrits dans le muscle squelettique sont l'acide hyaluronique ou appartiennent aux familles des chondroïtine sulfate/dermatane sulfate et de l'héparane sulfate [Carrino, 1999].

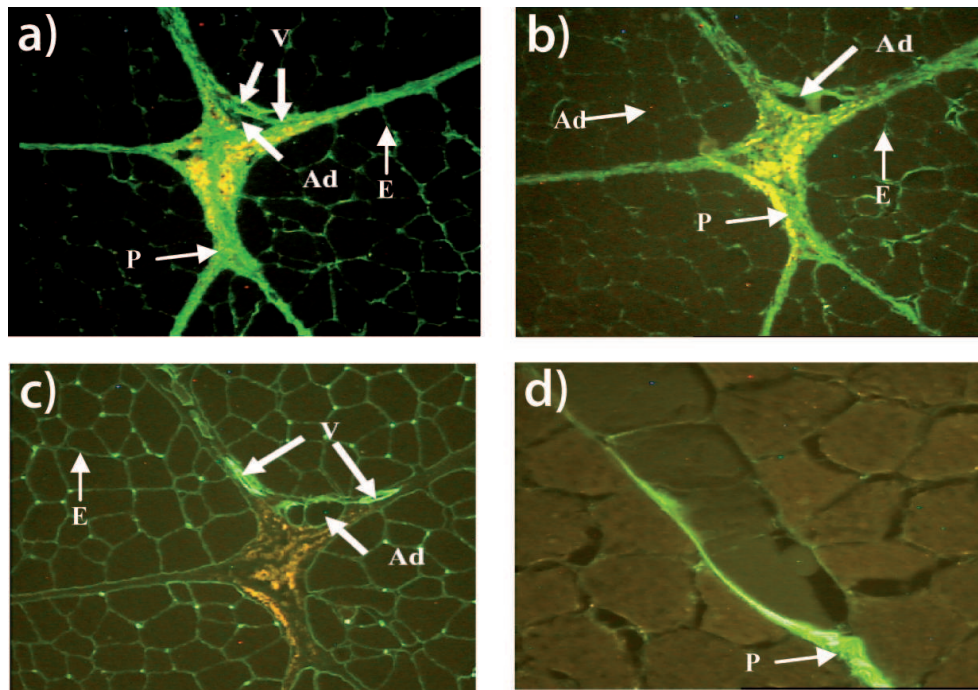


FIGURE 3.4 : Localisation des différents types de collagènes dans le muscle squelettique adulte. **a)-b)** Les collagènes fibrillaires et le collagène de type VI sont colocalisés dans l'endomysium (E) et le périmysium (P). **c)** Le collagène de type IV est localisé exclusivement dans l'endomysium (E). **d)** Les collagènes de types XII et XIV sont localisés dans le périmysium (P). L'ensemble de ces collagènes est également présent autour des adipocytes (Ad) et dans la paroi des vaisseaux sanguins (V) (d'après [Maunier-Sifre, 2005]).

3.2 Les fibres musculaires

Les fibres musculaires se composent de milliers de myofibrilles striées, comme décrit dans le chapitre 2 de ce manuscrit. Ces éléments contractiles élémentaires sont constitués de microfilaments d'actine couplés à des myofilaments de myosine. La myosine effectue un cycle de détachement/réattachement accompagné d'un mouvement transversal le long de l'actine quand la concentration de calcium intracellulaire augmente. Ce cycle aboutit à un raccourcissement de la fibre, qui est à la base de la contraction générale de la cellule. A l'échelle micrométrique, les fibres de myosine se décomposent en leurs éléments de base : les sarcomères. Ces sarcomères sont responsables du processus de contraction du muscle [Huxley & Niedergerke, 1954].

3.2.1 Typage

Les fibres musculaires se divisent en deux grandes familles :

- Fibres à contraction lente de type I : ces fibres sont de faible puissance mais de forte endurance. Elles ont un petit diamètre de section et une forte densité capillaire (dites "rouges") car elles sont adaptées aux efforts d'endurance et sollicitent le système cardiovasculaire. Elles captent l'oxygène venant directement des poumons et n'ont aucune réserve.

- Fibres à contraction rapide de type II : ces fibres sont de forte puissance mais de faible endurance. Elles ont un grand diamètre de section et une faible densité capillaire (dites "blanches") car elles sont adaptées aux efforts intenses à court terme.

En plus de ces fibres rouges et blanches, on compte deux types de fibres dites intermédiaires :

- fibres de type IIa : rapides et d'endurance moyenne ;
- fibres de type IIx : rapides et de faible endurance.

La répartition des fibres et donc la composition des muscles, est programmée génétiquement. Cependant, au cours de la vie d'un animal, cette répartition est appelée à évoluer.

3.2.2 Structure et composition

La taille des faisceaux de fibres musculaires varie d'un muscle à l'autre : elle est liée à la distribution des forces que le muscle développe. Qualitativement, il existe une relation entre la taille des faisceaux, l'épaisseur du périmysium, la longueur des faisceaux et les efforts en cisaillement que génèrent les myofibrilles et que subit la structure conjonctive. Par exemple, chez le bovin, le muscle *Pectoralis profundus*, soumis à de grands efforts en cisaillement, présente des faisceaux primaires de grande taille séparés par des trames épaisses de périmysium. Au contraire, un muscle long comme le *Sternocephalicus*, soumis à de faibles efforts de cisaillement, est constitué de petits faisceaux primaires et secondaires, séparés par un périmysium fin [Harris, 1976].

La composition et l'organisation des différents tissus que composent le muscle squelettique ont fait l'objet de très nombreuses études, en particulier pour mieux comprendre leur implication dans la tendreté de la viande. Il existe un lien très étroit entre ces tissus et la variable tendreté, qui n'a jamais vraiment été bien compris.

Les échantillons mis à notre disposition par l'équipe Croissance et Métabolisme du Muscle (C2M) de l'unité de recherche sur les herbivores de l'INRA de Clermont Ferrand/Theix sont de différentes natures. La première série d'échantillons est composée de coupes histologiques de muscle de différents bovins adultes présentant des différences de tendreté de leur viande. Cette série est destinée à mettre en évidence par microscopie multiphotonique, des différences observables au niveau structural. Différents échantillons ont pour but de caractériser des étapes particulières du développement fœtal de souris ou de bovin. Enfin, une dernière série a été mise à notre disposition pour caractériser les longueurs des sarcomères sur des coupes longitudinales de muscles qui ont préalablement été contractés, étirés ou laissés au repos.

3.3 Le muscle squelettique en microscopie multiphotonique

Une connaissance approfondie des caractéristiques de la structure à l'échelle micrométrique du muscle squelettique est de première importance pour la compréhension et l'aide à la production de viande de qualité. La microscopie conventionnelle a toujours été un outil indispensable dans le champ d'étude des sciences alimentaires. Ces dernières années, la microscopie de fluorescence, particulièrement la microscopie confocale de fluorescence à balayage laser, est devenue une technique de choix pour visualiser la position de molécules peu abondantes. Cependant, ces techniques nécessitent l'utilisation de marqueurs contrastants spécifiques déposés sur des coupes histologiques suivant un protocole bien défini, tel que le rouge Sirius qui se fixe sur les collagènes. Nous avons vu dans le chapitre 2 que certains collagènes fibrillaires et la myosine, deux composants majeurs du muscle squelettique des animaux vertébrés, génèrent un signal SHG sous excitation biphotonique. La microscopie SHG permet d'imager sans marquage ces structures, avec une résolution comparable aux techniques histologiques utilisées en routine par les biologistes. De plus, l'émission de fluorescence excitée à deux photons permet de visualiser en autofluorescence la matière biologique qui contient de nombreux fluorophores endogènes.

3.3.1 Imagerie du tissu conjonctif

Imagerie des trames conjonctives

La structure des différentes trames conjonctives (épimysium, pérимysium et endomysium) a été résolue en microscopie électronique à balayage [Nishimura, 1994] ; [Nishimura, 1996]. Ces travaux ont permis de mettre en évidence l'aspect compact du collagène dans le pérимysium, et l'organisation plus aléatoire du collagène dans l'endomysium (figure 3.5).

Il apparaît clairement lors de l'analyse des premières images de microscopie multiphotonique de coupes transverses de muscles squelettiques bovins adultes (différentes races), de fœtus de bovins à différents stades de développement ou encore de souris, que l'épimysium et le pérимysium produisent un signal SHG fort (figure 3.6).

Ce signal SHG provient essentiellement du collagène de type I, bien organisé en fagots épais, compacts, de sorte que le signal SHG produit soit intense. En revanche, l'endomysium n'en émet que très faiblement ou pas du tout (figure 3.7). En effet, l'endomysium est constitué majoritairement de collagène de type IV non fibrillaire [Listrat, 1998] ; [Listrat, 2000], qui n'émet donc pas de signal SHG, mais également de collagènes fibrillaires de type I et III. Cependant, dans l'endomysium, ces fibres de collagènes, d'un diamètre variant entre 20 et 100nm, sont orientées aléatoirement les unes par rapport aux autres et ne constituent donc pas de fagots organisés comme c'est le cas dans la trame de pérимysium, comme le montre la figure 3.5. Ceci peut expliquer l'absence de signal SHG fort.

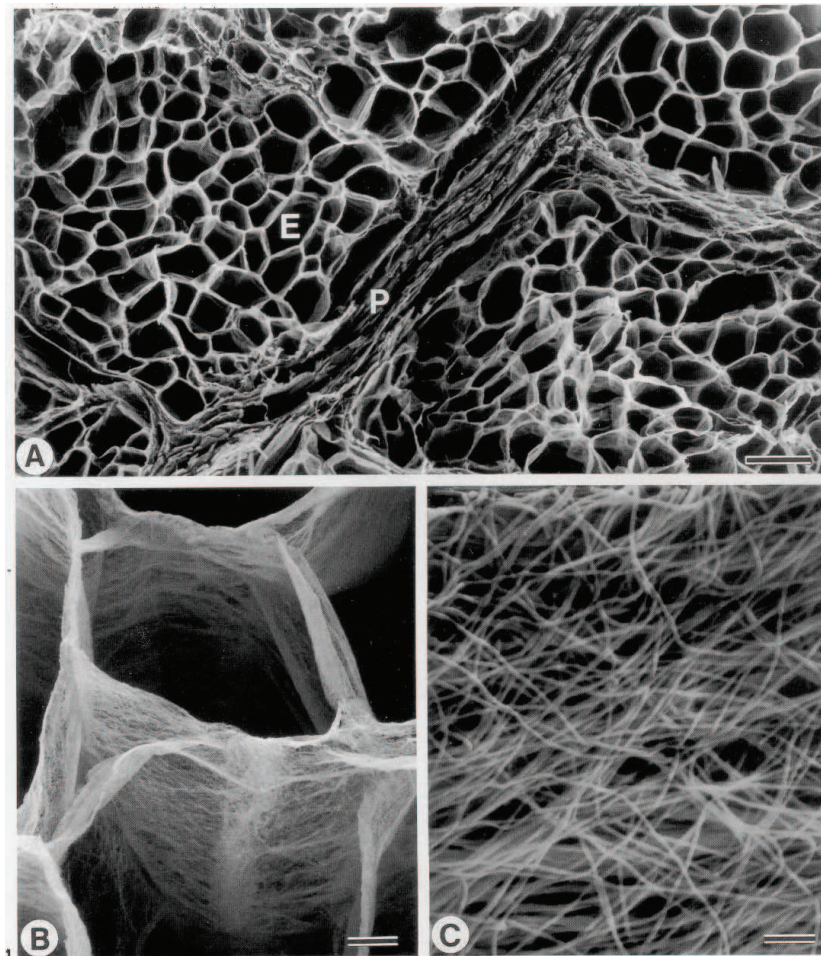


FIGURE 3.5 : Image de microscopie électronique à balayage du tissu conjonctif intramusculaire de muscle bovin de type *Semi tendinosus* après dissolution des fibres musculaires. **a)** L'endomysium (E) est une gaine cylindrique enveloppant une fibre musculaire unique. Le pérимysium (P) est composé de plusieurs couches de collagène organisées en feuillet. (grossissement 150 \times , barre d'échelle 100 μm). **b)** Paroi d'une gaine d'endomysium (grossissement 1.100 \times , barre d'échelle 10 μm). **c)** Détail de b) montrant l'organisation des fibrilles de collagène composant l'endomysium. (grossissement 21.500 \times , barre d'échelle 500nm) Cette figure est issue de [Nishimura, 1994]

Il est à noter que dans certains cas, on distingue de petites fibres semblant faire partie de l'endomysium. Des études d'immuno-marquages deviennent alors nécessaire pour comprendre ce que révèle exactement le signal SHG.

3.3.2 Imagerie de myofibres en coupe longitudinale

La myosine émet un signal de SHG fort et bien connu (cf chapitre 2). La microscopie SHG offre une technique d'imagerie à fort contraste des sarcomères sur fond noir. Il est possible d'obtenir des images hautes résolutions, acquises avec un objectif 60 \times -NA1.2 à immersion d'eau, de $235 \times 235 \mu\text{m}^2$ et ne présentant que des sarcomères.

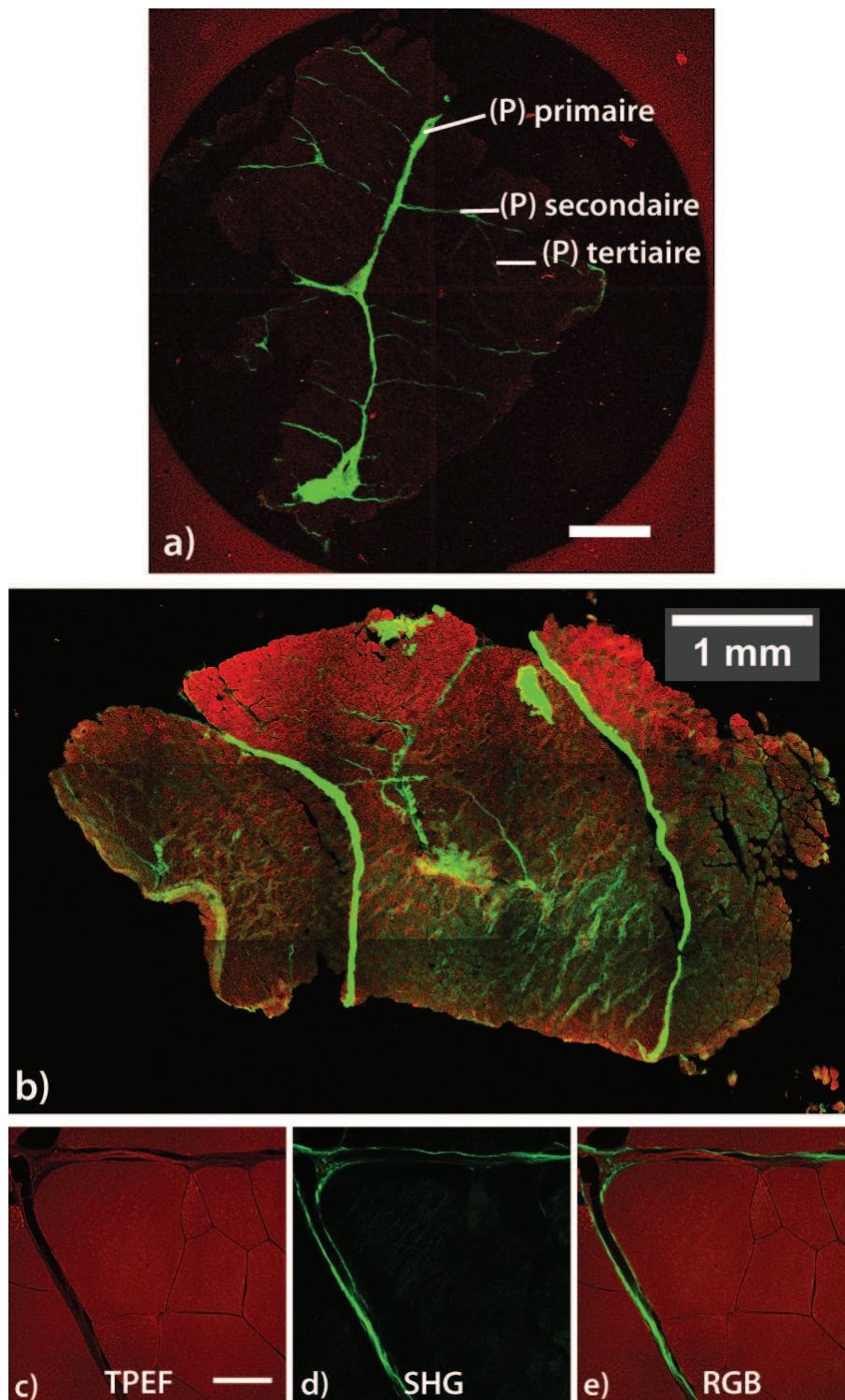


FIGURE 3.6 : **a)** Image RGB (SHG / TPEF) d'une coupe transverse de muscle *Semi tendinosus* de bovin adulte. La SHG révèle les différentes trames de pérимysium. Reconstruction à partir de 4 images acquises au 4× (le recouvrement des images laisse apparaître une croix). Barre d'échelle : 1mm. **b)** Image RGB (SHG / TPEF) d'une coupe transverse de muscle *gastrocnemius-soleus* de souris âgée de 11 mois. Reconstruction à partir d'images 10× ce qui donne à la reconstruction totale un effet de mosaïquage. **c)** Image TPEF d'une coupe transverse de muscle de bovin Blond d'Aquitaine à fort développement musculaire. Objectif 60×, barre d'échelle : 50μm. **d)** Image SHG, même ROI qu'en c). **e)** Image RGB : TPEF-c) / SHG-d).

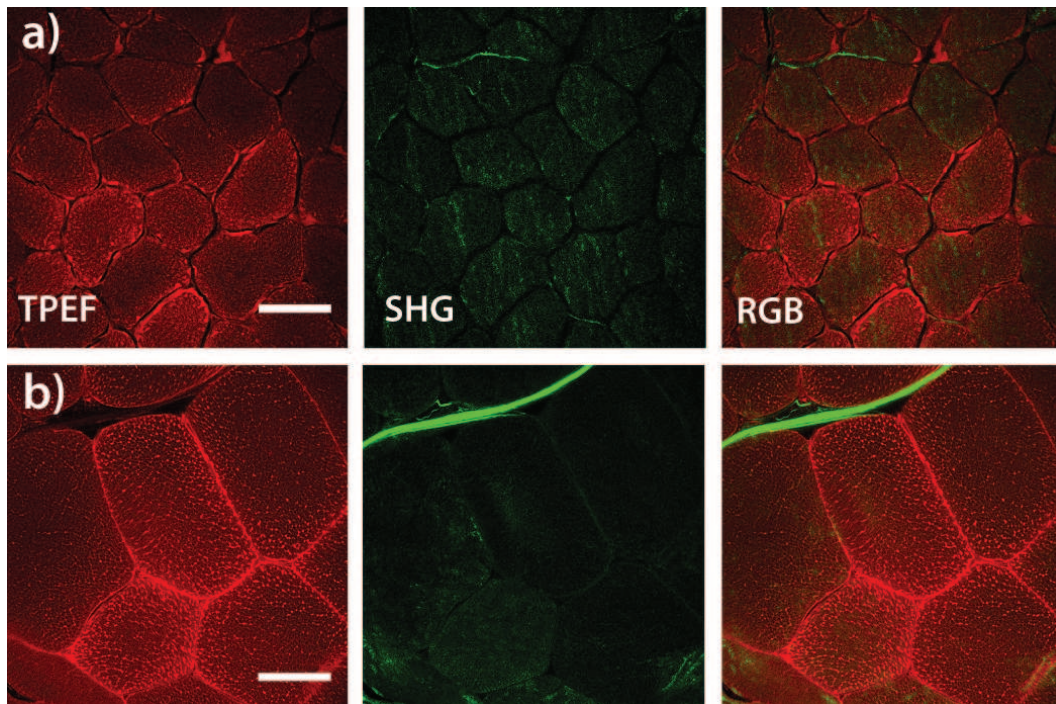


FIGURE 3.7 : **a)** De gauche à droite : images TPEF, SHG et RGB d'une coupe transverse de muscle gastrocnemius-soleus de souris âgée de 11 mois. Objectif 60 \times , barre d'échelle : 50 μ m. **b)** Images TPEF, SHG et RGB d'une coupe transverse de muscle Semi tendinosus de bovin adulte. Objectif 60 \times , barre d'échelle : 50 μ m.

Nous avons vu qu'à l'échelle micrométrique, les fibres de myosine se décomposent en leurs éléments de base : les sarcomères. La superposition des filaments d'actine et des filaments de myosine durant la contraction musculaire implique un changement de la longueur du sarcomère. En outre, la longueur de ces sarcomères varie en fonction de l'état du muscle : au repos, contracté ou étiré. Ce phénomène de contraction réside dans l'attraction entre les filaments d'actine et de myosine. La longueur de la bande A reste constante durant tout le processus de contraction, tandis que la bande I, plus courte au repos que la bande A, se raccourcit davantage en contraction (cf figure 2.6 du chapitre 2).

L'imagerie multiphotonique des muscles striés en coupes longitudinales permet de remonter à des informations d'ordre structurales et ce, directement à partir des images. Par exemple, la figure 3.8 présente des acquisitions simultanées TPEF/SHG de muscles en coupes longitudinales laissant apparaître la myosine et donc les sarcomères, mais également un réseau de collagène fibrillaire.

Le couplage de ces informations peut s'avérer utile dans la caractérisation de muscles, en particulier pour l'étude de la tendreté de la viande. En outre, il est possible de mesurer très précisément la longueur des sarcomères visibles sur une images SHG et ce, de plusieurs façons.

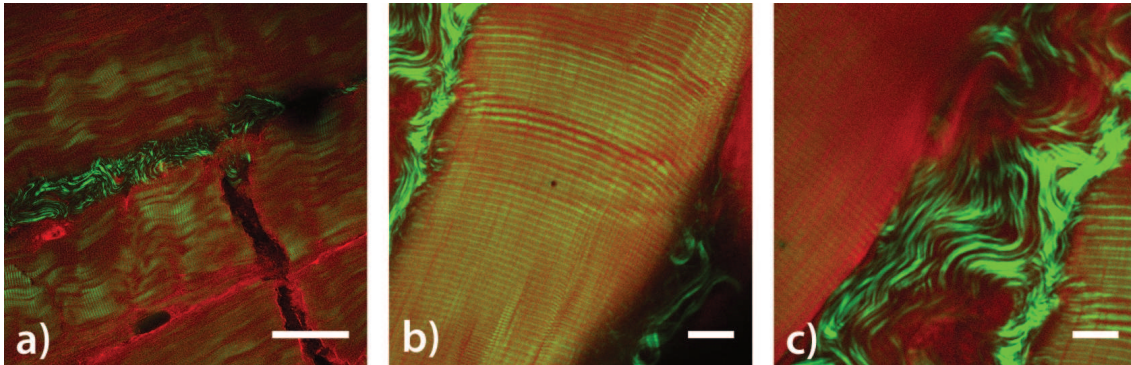


FIGURE 3.8 : **a)** Image RGB TPEF-SHG d'une coupe longitudinale de muscle *Semi tendinosus* de bovin adulte. Objectif 60 \times -NA1.2 à immersion d'eau, barre d'échelle : 50 μ m. **b)-c)** Image RGB TPEF-SHG d'une coupe longitudinale de muscle de souris âgée de 8 mois. Objectif 60 \times -NA1.2 à immersion d'eau, zoom 3 \times , barres d'échelles : 10 μ m.

3.3.3 Mesure de longueurs de sarcomères

De nombreuses méthodes existent pour mesurer la longueur des sarcomères. La technique la plus utilisée est la méthode de diffraction laser. En effet, chaque sarcomère étant composé alternativement de bandes A et I bien définies composant des zones claires et sombres, le gradient d'indice de réfraction répétitif créé des effets de diffraction quand une fine couche de muscle est éclairée par un faisceau de lumière puissant. D'après la théorie de la diffraction, on déduit que la distance entre l'ordre zéro et le maximum d'intensité du premier ordre, soit la fréquence spatiale, est directement reliée à la période du réseau de diffraction composé par les sarcomères. Les dimensions typiques des sarcomères, de 1.2 μ m à plus de 3 μ m, sont plusieurs fois supérieures aux longueurs d'ondes du visible, autorisant ainsi ces mesures [Kawai & Kuntz, 1973]; [van Heuningen, 1982]. Cependant cette méthode requiert de lourds traitements des échantillons de muscles pour obtenir une figure de diffraction nette, mise à part pour les muscles de certains poissons.

Longueur de sarcomères issue d'un profil 1D

Le profil d'intensité d'une ligne tirée le long d'une myofibrille bien orientée (figure 3.9) permet de remonter à la longueur moyenne des sarcomères de cette fibre. En effet, ce profil étant l'image de l'alternance entre les zones sombres et claires des sarcomères, le premier ordre de la transformée de Fourier de cette forme sinusoïdale correspond, dans l'espace des fréquences, à la période moyenne du profil, soit la longueur moyenne des sarcomères. En outre, il est envisageable d'utiliser une partie ou toute l'image acquise pour effectuer cette mesure.

Dans le cas où les fibres de myosine sont toutes orientées de la même manière, la transformée de Fourier à deux dimensions (TF2D) de cette image nous renseigne sur la longueur moyenne des sarcomères présents dans tout un champ de vue d'un objectif 60X, soit environ 235 \times 235 μ m².

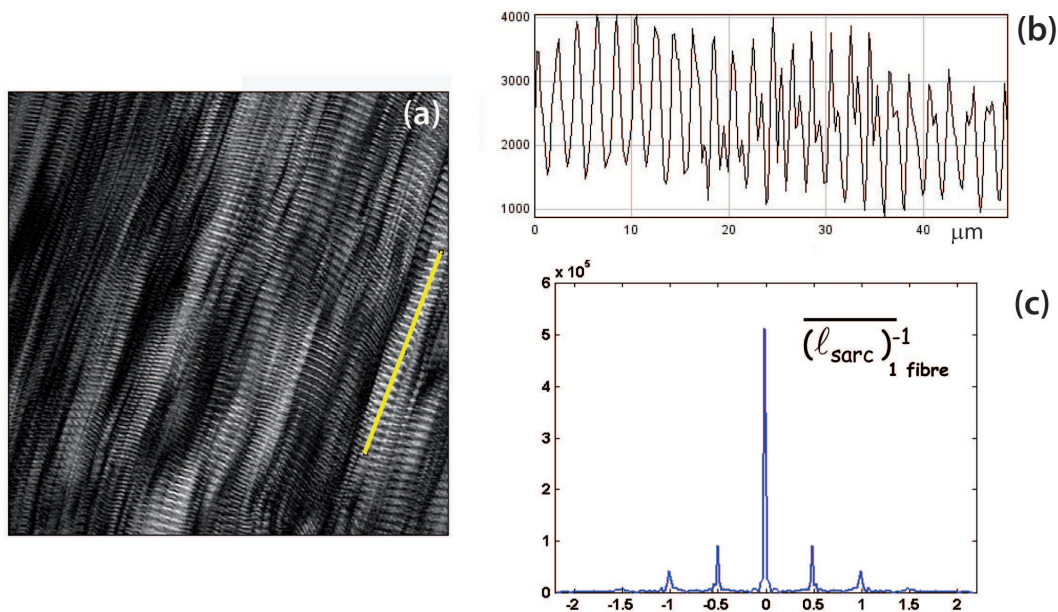


FIGURE 3.9 : **a)** Image SHG de muscle bovin adulte en coupe longitudinale ($100 \times 100 \mu\text{m}$); **b)** Profil 1D d'une fibre (trait jaune sur (a)); **c)** Transformée de Fourier 1D du profil d'intensité (b). Le premier pic, hors ordre zéro, correspond à la fréquence spatiale moyenne créée par les sarcomères. Sa valeur, à $0.48 \mu\text{m}^{-1}$ correspond à une longueur moyenne de $2.08 \mu\text{m}$.

Mesure de longueur de sarcomères d'une image SHG

L'interprétation de la transformée de Fourier (TF) d'une image offre de nombreuses informations.

Dans un premier temps, l'analyse des images contenant une texture artificielle simple permet d'éviter de voir des fréquences parasites interférer avec les fréquences de la texture d'étude. Si la texture possède une certaine structure (périodicité...), il en ira de même pour le module de la transformée de Fourier. En effet, si la texture est moins ordonnée, voire complètement aléatoire, le spectre du module de sa transformée de Fourier est également aléatoire, il est alors difficile d'en tirer des informations. Néanmoins, le spectre de la TF présente généralement certains pics. Ces pics et leurs amplitudes nous informent sur l'orientation de la structure et en particulier :

1. le pic dominant dans le spectre donne la direction principale de la texture.
2. la localisation des pics permet de déterminer la période spatiale fondamentale de la texture.
3. chaque pic représente une périodicité spatiale dans un sens particulier

Ainsi, les images qui sont de purs cosinus ou de purs sinus ont des transformées de Fourier particulièrement simples, soit un motif vertical qui se répète dans l'image. La transformée de Fourier d'un sinus horizontal présente trois points alignés horizontalement, c'est à dire dans la direction perpendiculaire à la périodicité du motif. Le point central (de coordonnées (0,0)) représente la moyenne de l'intensité de l'image initiale (l'ordre 0) tandis que les deux autres points représentent la fréquence (verticale ou horizontale) des sinus (1^{er} ordre). Plus la fréquence du signal est élevée, plus les points sont espacés. Pour une image à deux sinus avec deux fréquences

différant horizontalement et verticalement, les pics de la TF2D sont alors plus espacés horizontalement si la fréquence horizontale est plus élevée que la fréquence verticale.

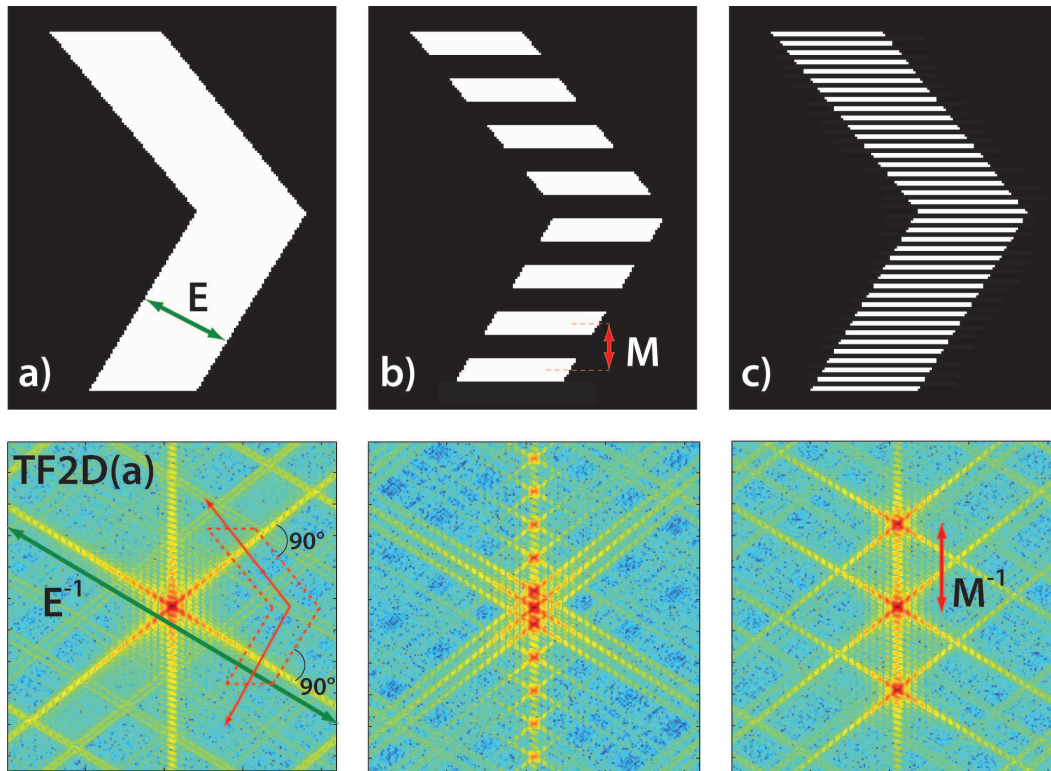


FIGURE 3.10 : *a)-b)-c) Patterns géométriques plus ou moins modulés, ainsi que les TF2D qui leurs sont associés (ligne du bas).*

Considérons maintenant un pattern géométrique modèle, dont la forme n'est pas choisie au hasard, car elle correspond aux différentes orientations que peut prendre les myofibrilles dans un muscle. La forme de ce pattern influence la TF2D de l'image, comme le montre la figure 3.10a) et la TF2D qui lui est associée. On peut noter sur cette TF la forme en croix centrée sur l'ordre 0. Les orientations principales des motifs de cette TF sont orientées à la perpendiculaire des orientations principales du pattern, comme le montre la figure 3.10TF2D(a). Si on module ce pattern avec une alternance de bandes blanches et noires à différentes fréquences, les TF2D qui en résultent contiennent l'information de cette modulation. La distance séparant l'ordre 0 du 1^{er} ordre est d'autant plus grande que la fréquence de modulation des bandes est élevée (figures 3.10b-c)). Cet exemple illustre la puissance de la transformée de Fourier d'une image, et des informations que l'on peut en tirer.

Appliquons maintenant la TF2D à une image SHG brute de myosine, périodisée par la présence de sarcomères. En fonction des orientations principales des myofibrilles, il est plus ou moins aisé de tirer des informations de la TF2D d'une image SHG. La figure 3.11a) présente une image SHG de muscle bovin adulte en coupe longitudinale. Les myofibrilles sont toutes orientées de

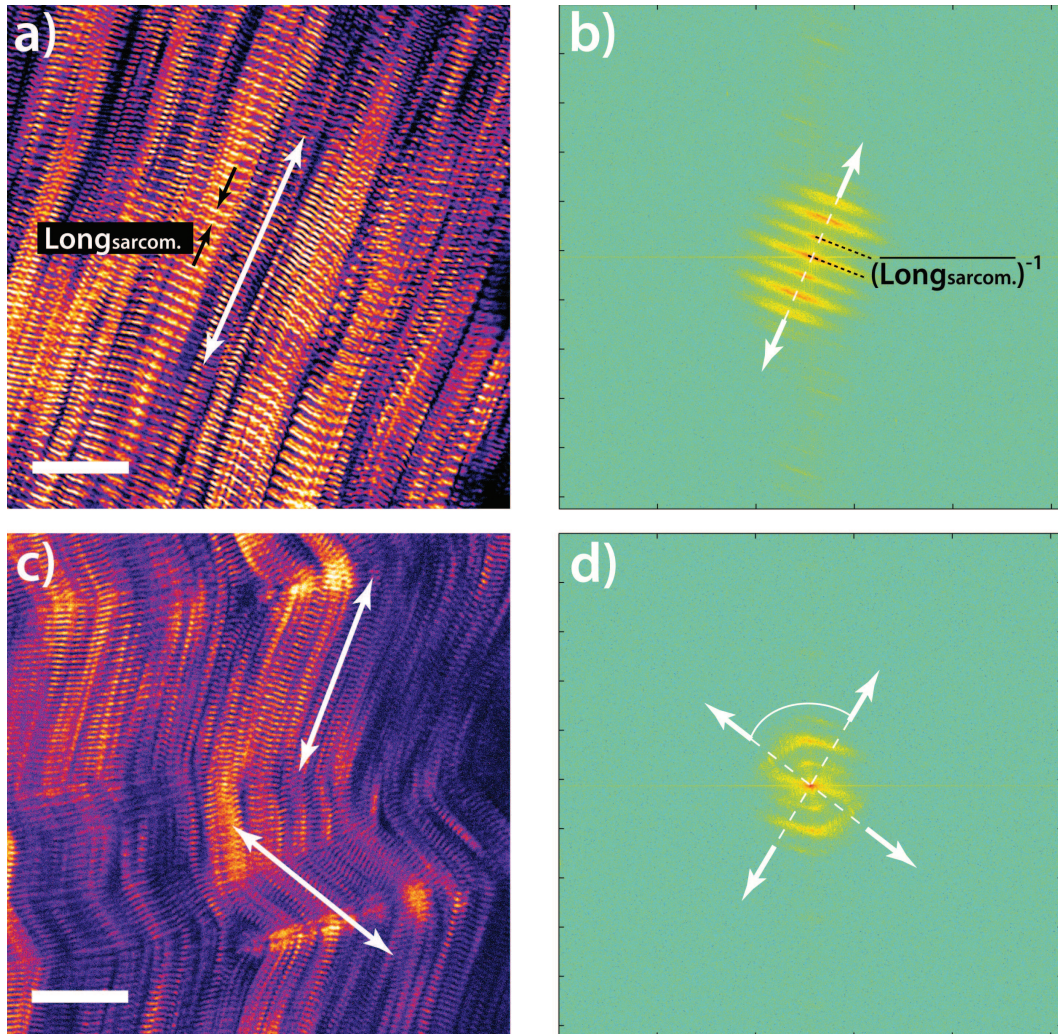


FIGURE 3.11 : **a)** Image SHG (fausses couleurs) d'une coupe histologique longitudinale de muscle bovin adulte. Les doubles flèches symbolisent l'orientation principale des myofibrilles. (barre d'échelle $10\mu\text{m}$). **b)** TF2D de a). L'échelle d'intensité est passée en log pour mieux percevoir les différents ordres. **c)** idem que a). **d)** idem que b).

la même manière, la TF2D qui est associée à cette image est facile à traiter, la distance entre le centre (ordre 0) et le premier maximum (tâche représentant le pic du premier ordre) est directement reliée à la longueur moyenne des sarcomères de l'image entière (figure 3.11b)). En revanche, si les myofibrilles présentent plusieurs orientations, comme c'est le cas figure 3.11c), alors la TF2D qui lui est associée est plus difficilement interprétable, la tâche du premier ordre étant largement étalée, sans pic principal distinct (figure 3.11d)).

Pour pallier ce problème d'interprétation, nous avons choisi de développer un programme à partir d'une "boîte à outils" disponible sur le logiciel de programmation Matlab, et dédiée au traitement d'image. Nous présentons à présent le principe de ce programme. Les seules variables d'entrée sont le lien d'arborescence vers l'image à traiter ainsi que le zoom utilisé le cas échéant (la mise à l'échelle est automatisée).

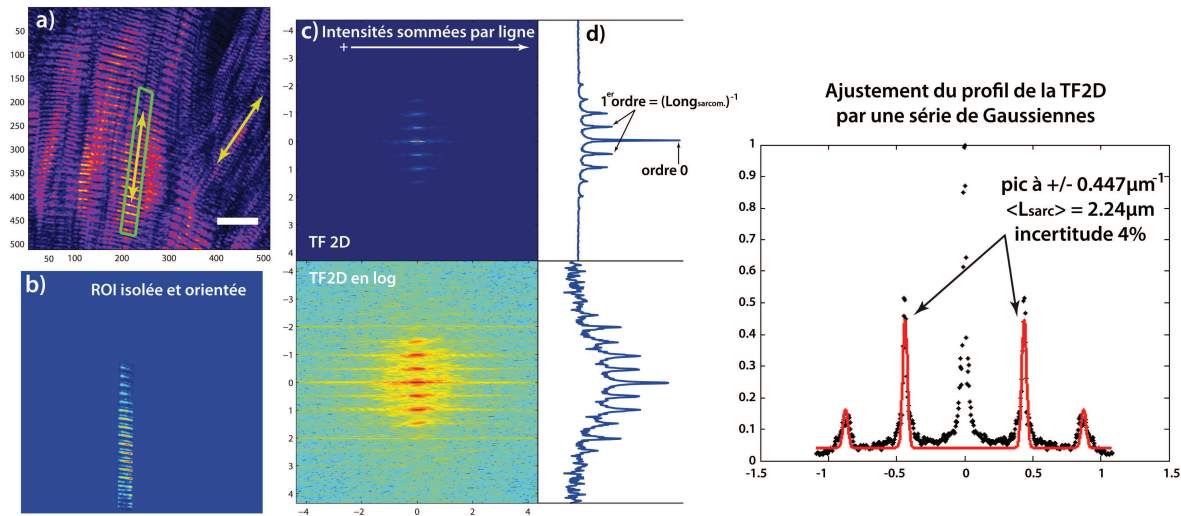


FIGURE 3.12 : **a)** Image SHG (512×512 pixels) d'une coupe longitudinale de muscle bovin adulte (fausses couleurs). Les doubles flèches symbolise l'orientation principale des myofibrilles. Barre d'échelle $10\mu\text{m}$. **b)** ROI issue de a) isolée et orientée pour que la forme du masque ait le minimum d'influence sur la TF2D. **c)** En haut : TF2D de b). En bas : TF2D de b), les intensités sont en échelle log. Les intensités de ces TF2D sont sommées par ligne dans le but d'obtenir les profils **d)**, où la position des 1^{er} pics hors ordre 0 est directement reliée à la longueur des sarcomères moyennée sur toute la ROI.

La figure 3.12a) présente une image SHG typique de myosine où les sarcomères sont bien visibles. A partir de cette image, il est possible d'effectuer directement la TF2D. Cependant, comme nous l'avons vu, si les fibres de myosine prennent des orientations diverses, comme c'est le cas sur cet exemple, alors la TF2D résultante sera difficilement interprétable. Pour éviter ce phénomène, la sélection de plusieurs zones où les sarcomères sont tous bien orientés, permet de créer des masques qui servent à traiter ces zones séparément (3.12b)). Ces masques permettent d'effectuer la TF2D uniquement sur les zones sélectionnées. Ces transformées de Fourier sont ensuite modifiées en fonction de l'orientation principale de la tâche formée par l'ordre zéro. L'intérêt d'une telle modification est de pouvoir sommer les intensités des pixels par ligne, afin d'obtenir un profil à deux dimensions aux pics les plus fins possibles (3.12d)). Une fois cette opération réalisée, la position du premier maximum en dehors de l'ordre zéro dans l'espace des fréquences, est directement reliée à la longueur moyenne des sarcomères de l'image SHG.

Avec cette méthode, il est possible d'étudier la variation de la longueur des sarcomères en fonction d'un paramètre extérieur. Par exemple, l'INRA de Clermont Ferrand/Theix nous a fourni une série d'échantillons présentant différentes tendretés. Cependant, aucune corrélation entre la tendreté des ces échantillons et les longueurs de sarcomères qui leur sont associées n'a pu être mise en évidence.

En revanche, nous avons envisagé de mettre en place une expérience où un échantillon de muscle (bovin ou autre) en coupe longitudinale serait placé entre deux mors pour pouvoir contracter et étirer l'échantillon à volonté, dans le but de visualiser en direct une dynamique de contrac-

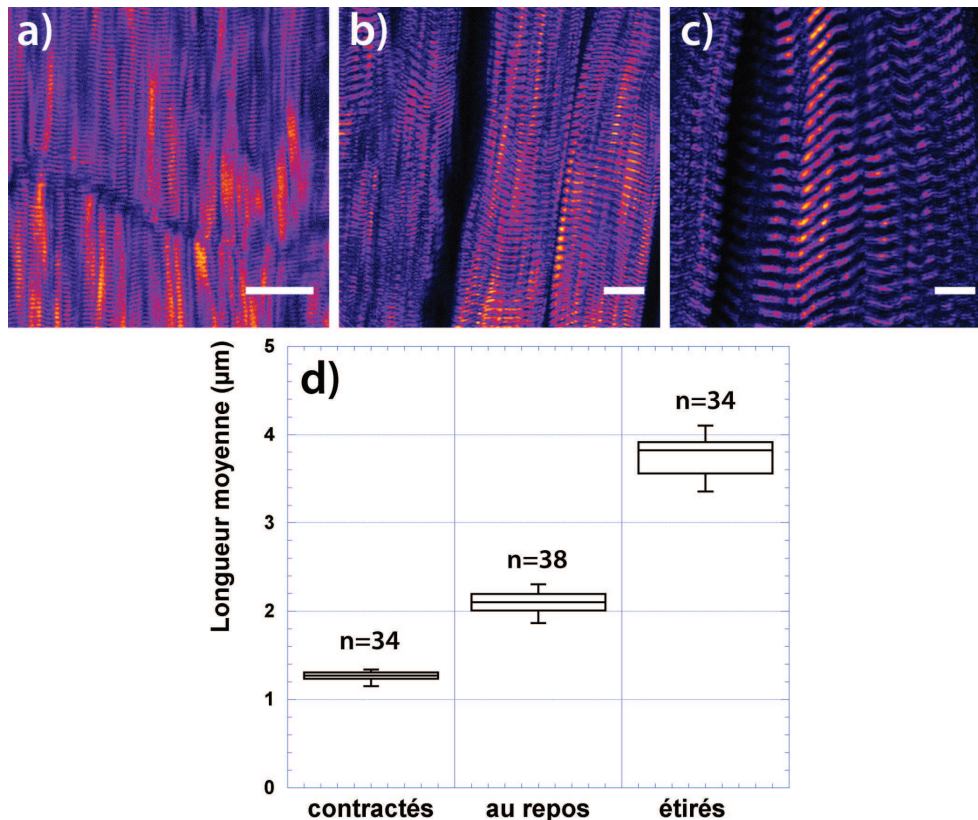


FIGURE 3.13 : **a)-b)-c)** Images SHG de muscles de bovins adultes en coupes longitudinales. Ces muscles sont respectivement contractés (a), au repos (b) et étirés (c). Barres d'échelle : $10\mu m$. **d)** Représentation du type "boîte à moustaches" de la dispersion des valeurs obtenues pour les longueurs moyennes de sarcomères pour chaque série (n est le nombre de mesures réalisées pour chaque série). La boîte contient 50% des valeurs et la barre centrale indique la valeur moyenne pour chaque série.

tion. Or, la mise en place d'une telle expérience est très difficile, du fait de l'état de *rigor mortis*, qui est un enraidissement progressif de la musculature intervenant environ 24 heures après l'abattage de l'animal. Jacques LEPETIT de l'INRA de Clermont Ferrand/Theix a donc mis à notre disposition trois séries d'échantillons réalisées avant le stade de *rigor mortis*, à savoir une série de coupes au repos, où le muscle à été conservé à température ambiante pendant 24 heures puis congelé pour pouvoir pratiquer les découpes. Une deuxième série concerne des échantillons de muscles étirés, qui ont été pincés entre deux mors puis étirés à plus de 50%. Enfin, la troisième série d'échantillons concerne des muscles contractés, qui ont été placés dans de l'eau avec de la glace, puis congelés et tranchés en coupes histologiques.

La figure 3.13 présente un exemple d'acquisition SHG pour chacune de ces séries, à savoir une image de muscle contracté (3.13a), une au repos (3.13b) et une étiré (3.13), avec pour résultats $\langle l_{contr.} \rangle = 1.26\mu m$; $\langle l_{repos.} \rangle = 2.51\mu m$; $\langle l_{etir.} \rangle = 3.80\mu m$.

3.3.4 Imagerie de cellules musculaires en coupe transverse

En microscopie confocale de fluorescence, il est possible de caractériser le type des fibres musculaires par immuno-histologie, leurs répartitions ayant une influence sur les propriétés de la viande, en particulier sur la tendreté. La caractérisation des fibres musculaires a également un intérêt médical, en particulier dans les maladies chroniques obstructives du poumon [Gosker, 2000] ; [Green, 2009]. L'immuno-histologie par simple et double marquage est un procédé coûteux en temps de procédure et en matière biologique. Il est en effet nécessaire d'avoir plusieurs coupes sériées pour effectuer les marquages correspondants aux différents types de fibres. Des méthodes d'analyse numérique permettent ensuite de cartographier les différents types de fibres.

La microscopie TPEF de coupes transverses de muscles permet d'observer naturellement une autofluorescence de têtes de myosine localisées sur certaines cellules musculaires et non sur d'autres, comme le montre la figure 3.14.

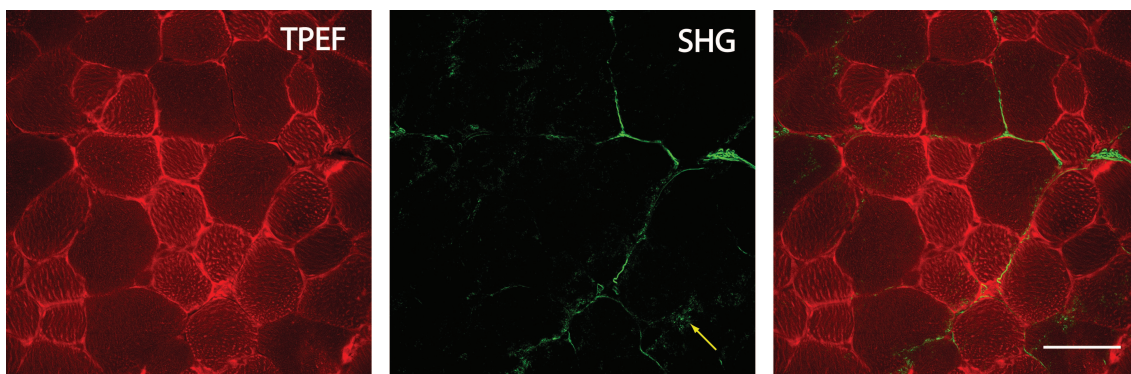


FIGURE 3.14 : Images TPEF/SHG et RGB de muscle de souris (1 mois) en coupe transverse. Objectif 60 \times , barre d'échelle 50 μ m.

Cette figure rend compte de la différence visible intuitivement entre les deux grandes familles de fibres. Il semblerait en effet que les fibres ayant le plus petit diamètre émettent un fort signal de fluorescence, tandis que les grosses fibres n'en génèrent quasiment pas. En outre, à l'intérieur des cellules musculaires, on remarque à certains endroits un signal SHG diffus, illustré par la flèche jaune sur l'image SHG. Ce signal est produit par des myofibrilles qui, lors de la découpe, ont vraisemblablement glissées pour venir s'orienter sur la coupe de telle manière qu'elles émettent un signal SHG. La SHG visible sur la figure 3.14 correspond au collagène fibrillaire de type I contenu dans le périnysium.

Cette étude étant encore au stade préliminaire, plusieurs étapes restent à franchir avant de pouvoir émettre des hypothèses reliant l'intensité de TPEF émise avec le type des différentes fibres. Un couplage entre l'imagerie multiphotonique et l'immuno-histologie en coupes sériées permettrait de valider une méthode de caractérisation du typage des cellules musculaires par microscopie TPEF, sans marquage.

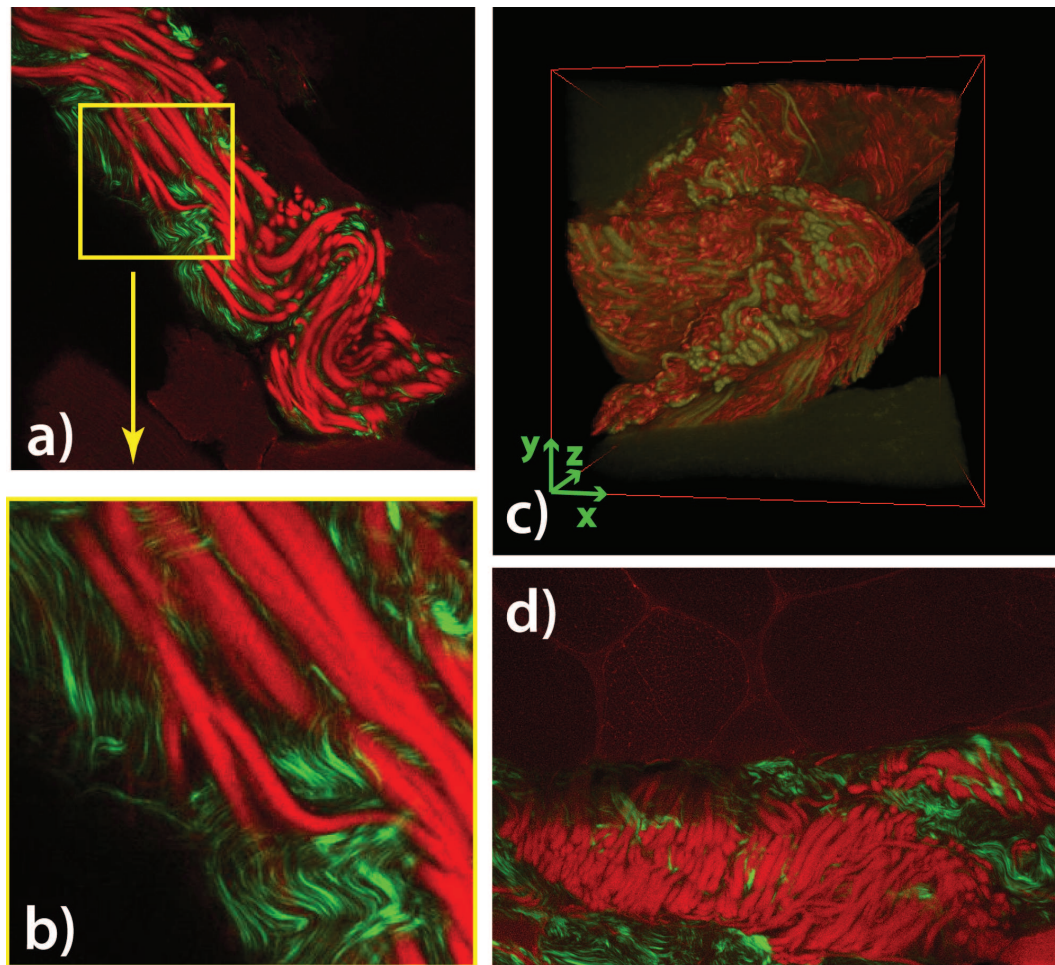


FIGURE 3.15 : **a)** Image RGB (TPEF en rouge et SHG en vert) d'une coupe transverse de muscle de bovin adulte. Echelle plein champ : $235\mu\text{m}$ de côté. **b)** Détail de a). **c)** Reconstruction 3D à partir d'une pile d'images acquises par pas de $2\mu\text{m}$ en z, du même échantillon que a)-b). **d)** Image RGB d'une coupe transverse de muscle bovin également (image de $235\mu\text{m}$ de large).

Singularité observée : l'élastine

Au cours de cette étude prospective, certaines particularités ont été retrouvées. Un passage systématique de chaque échantillon fournis par l'INRA de Clermont-Ferrand/Theix a été effectué, ce qui a permis de mettre à jour la fluorescence de la protéine élastine. L'élastine n'existe que chez les vertébrés et est disposée en fibres, mais surtout en lames discontinues, en particulier dans la peau, les poumons et les vaisseaux sanguins. Dans ces organes, elle confère des propriétés d'étirement et donc d'élasticité. L'élastine est sécrétée par les fibroblastes sous forme de tropoélastine qui la polymérise dans la substance fondamentale.

L'élastine a la particularité d'avoir une grande section efficace d'absorption à deux photons, elle fluoresce donc fortement sous excitation biphotonique. Sa structure est centrosymétrique, ce qui explique qu'elle ne génère pas de SHG. La figure 3.15a) montre la forte autofluorescence de

cette protéine fibrillaire. On peut également noter le fait que les fibres de collagène s'enroulent autour des fibres d'élastine (voir détail 3.15b)). La figure 3.15c) illustre la possibilité d'imager très finement la matière biologique avec un objectif à fort NA (ici 60×-NA1.2 à immersion d'eau). La reconstruction 3D est effectuée avec l'extension "ImageJ 3D Viewer" du logiciel ImageJ. Enfin, la figure 3.15d) montre en même temps l'autofluorescence de l'élastine avec les fibres musculaires (TPEF en rouge), et le collagène fibrillaire (SHG en vert) présent sur la même zone d'intérêt.

Cette étude prospective réalisée dans le cadre d'une collaboration avec Anne LISTRAT et Jacques LEPETIT de l'INRA de Clermont Ferrand/Theix montre l'étendue des possibilités offertes par l'imagerie multiphotonique du muscle squelettique. Du sarcomère à la cellule musculaire en passant par les tissus conjonctifs du muscle squelettique, l'imagerie couplée TPEF/SHG permet d'envisager une étude complète pour mettre en évidence certaines caractéristiques du muscle (liées entre autre à la tendreté) ainsi que pour tenter de mieux caractériser les stades clés du développement musculaire fœtal . Une telle étude devra prendre en compte différents paramètres extérieurs à la technique d'imagerie, comme le contrôle de la qualité des coupes histologiques, ou encore un couplage entre échantillons immuno-marqués et sans marquage, pour mieux comprendre ce qui est à l'origine des contrastes TPEF et SHG.

Deuxième partie

Application de la microscopie
biphotonique à l'étude du collagène
impliqué dans la fibrose hépatique chez
l'Homme

La fibrose hépatique

Fibrose hépatique et collagène

La fibrose hépatique est définie comme l'accumulation de matrice extra-cellulaire (MEC) (tissus cicatriciels) dans le foie, résultant d'une agression, le plus souvent chronique. La cirrhose est le stade le plus évolué de la fibrose, associant à l'accumulation de MEC des perturbations vasculaires et architecturales ayant pour conséquence la perte des fonctions hépatiques que sont la synthèse protéique, le stockage d'énergie, le contrôle des métabolismes lipidiques et glucidiques, la fabrication de bile et la détoxification (rendre inoffensifs les produits toxiques absorbés par les intestins).

Les causes de la fibrose sont diverses et nombreuses : de l'agression du foie par des toxiques (alcool notamment), par les surcharges (fer et lipides), mais aussi et particulièrement les maladies chroniques virales telles que les hépatites A, B ou C. Le nombre d'individus atteints d'hépatite chronique virale C (VHC) sur la planète est supérieur à 180 millions et pour l'hépatite B (VHB) à 350 millions. Ces deux hépatites chroniques virales sont responsables de 929 000 morts chaque année dans le monde [Perz, 2006] dont 446 000 en rapport avec les complications de la cirrhose (45% des décès sont en rapport avec le VHC, 53% avec le VHB) et 483 000 avec le carcinome hépatocellulaire (cancer primitif du foie : 32% secondaire au VHC et 68% au VHB).

Les cirrhoses d'origine virale sont responsables de l'augmentation actuelle de la fréquence des cancers du foie dans les pays industrialisés, avec un pic de prévalence prévu dans les années 2015 pour les hommes et 2020 pour les femmes pour le VHC (figure 3.16).

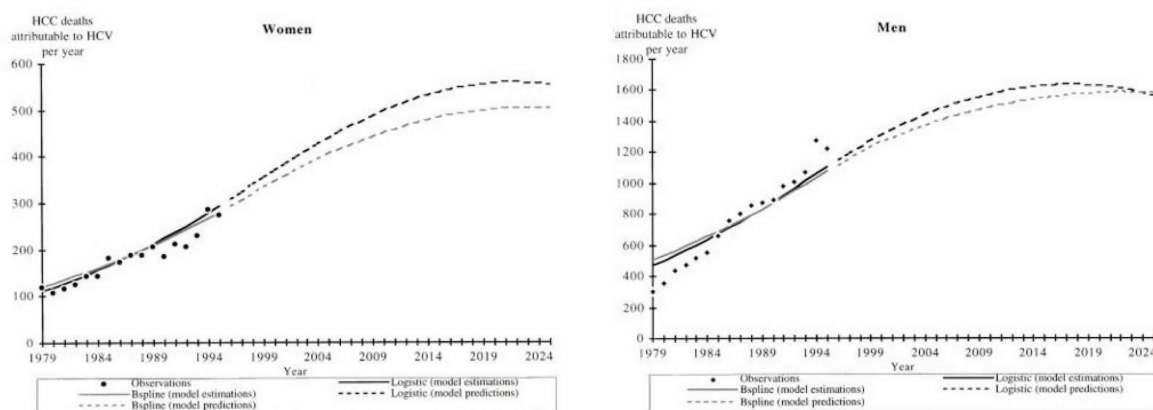


FIGURE 3.16 : Constat et prévision de l'évolution des décès attribués au virus VHC en France par an. Figure tirée de [Deuffic, 1999]

De plus, l'infection virale C devient l'une des causes les plus fréquentes de transplantation du foie.

Mécanismes de la fibrose hépatique : la fibrogenèse

Comme dans d'autres tissus, tels le rein ou le poumon, la fibrogenèse hépatique est un processus de réparation tissulaire exagéré suite à une inflammation chronique. Une agression chronique du foie (hépatites chroniques virales et alcoolisme chronique dans les pays occidentaux) entraîne la destruction des hépatocytes (cellules du foie assurant de nombreuses fonctions métaboliques), puis entraîne une réaction inflammatoire impliquant les macrophages (cellules de Kupffer) et les cellules étoilées du foie. Cette destruction parenchymateuse est responsable d'une régénération cellulaire et d'une synthèse de MEC. Ce processus permet la cicatrisation de la lésion en restaurant une architecture hépatique normale. En revanche, si la maladie se prolonge, le tissu cicatriciel ainsi formé devient excessif et une fibrose hépatique se développe. L'augmentation de la synthèse des composants de la MEC visant à limiter la propagation de l'inflammation d'une part, couplée à la défaillance des mécanismes de dégradation de cette matrice d'autre part, expliquent le développement de ce processus dynamique qu'est la fibrose [Bataller, 2005].

Diagnostic de la fibrose

Les tests et marqueurs les plus couramment utilisés dans le diagnostic de la fibrose hépatique sont de différentes natures. Cependant la majorité de ces tests utilisés indépendamment ne permettent pas une évaluation complète du degré d'avancement de la pathologie. A ce jour, une méthode de diagnostic efficace de la fibrose hépatique repose sur l'évaluation de plusieurs critères.

Tests non invasifs et sanguins

L'élastographe (Fibroscan) est un dispositif médical couramment utilisé pour le diagnostic non invasif de la fibrose du foie. Cet appareil mesure l'élasticité des tissus. L'élastographie impulsionnelle consiste à engendrer par vibration des ondes élastiques dans l'organe à étudier, ici le foie, et à en suivre la progression à l'aide d'ultrasons basses fréquences (50Hz). La vitesse de propagation de ces ondes dans le tissu hépatique est alors corrélée à l'élasticité du foie, elle-même corrélée au niveau de fibrose [Sandrin, 2003]. La sonde est placée au contact de la peau sur une zone intercostale en regard du lobe hépatique droit, correspondant généralement à la zone habituellement choisie pour réaliser une biopsie hépatique. Dix mesures, indolores, sont nécessaires pour évaluer au mieux l'élasticité du milieu traversé par l'onde. Cependant, le degré d'inflammation du tissu au cours des infections virales mais aussi la présence d'une stéatose (graisses) peuvent modifier la résistance du foie aux ultrasons et biaiser le diagnostic. L'imagerie par résonance magnétique a également été utilisée dans l'évaluation de la fibrose du foie chez les patients infectés par le virus hépatite C, offrant une bonne corrélation avec le score Métavir, bien qu'un nombre limité d'échantillon est été utilisés (54) [Lewin, 2007].

Les tests sanguins reposent pour la plupart sur une analyse multifactorielle des marqueurs sériques caractéristiques d'une fibrose hépatique. Les plus utilisés sont l'Hepascore [Adams, 2005],

le Fibromètre [Calès, 2005] et le Fibrotest [Poynard, 2003], ce dernier étant le plus couramment utilisé en France. Bien que ces techniques s'avèrent utiles pour la détection des stades avancés de la maladie (cirrhoses), ils sont peu adaptés à l'évaluation précise des stades intermédiaires de la fibrose peu à modérément évoluée.

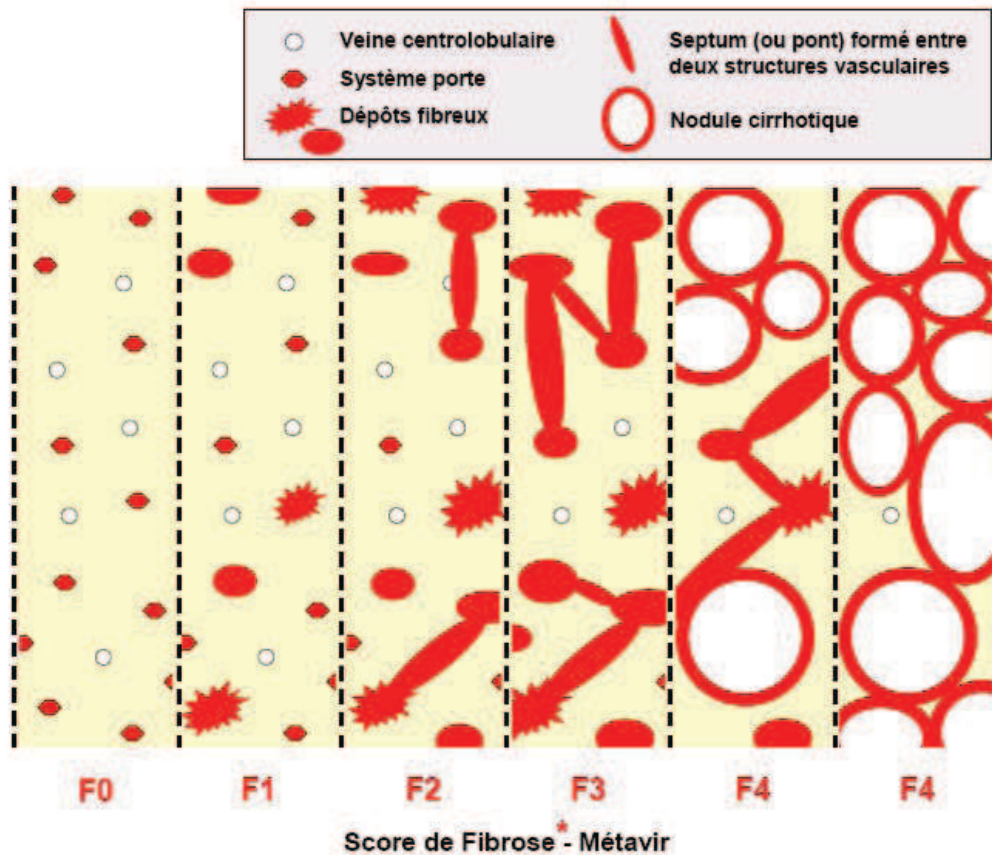
Analyse histologique

L'utilisation des tests sériques et non invasifs dans le diagnostic de la fibrose du foie n'est souvent pas suffisant pour une évaluation fine du degré de fibrose chez un patient, en particulier pour les stades intermédiaires de la maladie. La biopsie du foie et son analyse anatomopathologique deviennent alors indispensables et présentent deux avantages. Tout d'abord, ils permettent d'établir ou de confirmer le diagnostic de la pathologie. De plus, il s'agit de la seule technique réellement efficace pour permettre l'évaluation précise de l'étendue et donc de la gravité d'une fibrose [Goodman, 2007]. L'examen anatomopathologique du foie reste donc actuellement l'examen de référence (*Gold Standard*) pour apprécier le degré, la distribution des principales lésions hépatiques et pour évaluer le stade d'évolution de la maladie qualitativement. En outre, cet examen permet également une approche semi-quantitative dont la variabilité est importante et qui est parfois difficilement reproductible. Seul le score Métavir [The METAVIR cooperative group, 1993] admet une classification largement utilisée et bien connu des anatomopathologistes européens. Il est utilisé en routine au service d'anatomopathologie du CHU de Rennes. Le résultat du score est un des éléments qui sert à poser les indications thérapeutiques. La détermination du stade de fibrose par le pathologiste nécessite une coloration préalable des dépôts fibreux sur la coupe, notamment par l'utilisation du rouge Sirius [Gheyle, 1991]. Ce produit permet une coloration spécifique de la MEC (pas de coloration des autres composants tissulaires) et surtout les collagènes.

La classification Métavir associe deux composantes : tout d'abord, le grade d'activité de l'hépatite (inflammation et nécrose) qui s'échelonne de **A0** (pas d'activité) à **A3** (activité sévère) indiquant une estimation de la rapidité de l'évolution d'une fibrose. La deuxième composante du Métavir est le stade de fibrose. Elle permet de caractériser l'étendu des lésions fibreuses dans le foie. Elle est graduée de **F0** (pas de fibrose), **F1** (fibrose portale sans septa), **F2** (fibrose portale avec présence de quelques septa), **F3** (nombreux septa) à **F4** (stade cirrhotique). Ces différents stades sont schématisés morphologiquement figure 3.17.

Une fibrose est considérée comme significative à partir du stade **F2**-Métavir et demande à être prise en charge cliniquement.

La biopsie du foie reste une procédure invasive, potentiellement douloureuse pouvant présenter des complications plus ou moins importantes chez 0.5% des patients [Thampanitchawong, 1999]. De plus, le biais d'échantillonnage s'avère non négligeable en particulier pour les biopsies de petite taille. Les médecins estiment qu'un prélèvement d'au moins 25mm est nécessaire pour caractériser une fibrose et ne pas passer à côté d'une cirrhose si elle existe [Bedossa, 2003]. Une



Caractéristiques	Classification	Stade
Activité nécrotico-inflammatoire		
Hépatite chronique avec activité minimale	A -	A1
Hépatite chronique à activité modérée	A +	A2
Activité importante +/- nécrose du tissu	A++	A3
Degré de Fibrose *		
Foie normal	Pas de Fibrose	F0
Fibrose portale sans septa	Fibrose non significative	F1
Fibrose portale avec quelques septa	Fibrose modérée	F2
Fibrose portale avec de nombreux septa	Fibrose sévère	F3
Cirrhose	Fibrose avancée	F4

FIGURE 3.17 : Classification anatomopathologique de la fibrose hépatique par le système Metavir. L'échelle de la gradation associe deux composantes basées sur la caractérisation des lésions fibreuses (F-Métavir) et de l'activité nécrotico-inflammatoire (A-Métavir). [Gailhoute, 2009(thèse)]

étude menée sur des patients infectés par le VHC a également mis en évidence une variabilité d'au moins un grade de fibrose (dans 24% des cas) entre deux lectures réalisées par deux pathologistes différents [Regev, 2002]. Ces erreurs conduisent chaque année à une sous-évaluation de la cirrhose chez 14.5% des patients. Enfin, bien que cette technique soit la référence en matière d'évaluation

du degré de fibrose, elle ne permet pour l'instant pas de prédire précisément l'évolution d'une fibrose avancée ou son éventuelle régression.

Plusieurs méthodes d'analyses d'images permettent de déterminer un score, soit une aire de fibrose par rapport à l'aire totale de la biopsie. La meilleure manière de tester la validité d'un système d'analyse d'image ou de scores, est de corrélérer ses résultats avec ceux d'une technique différente [Feldmann, 1995]. Ainsi, de nombreuses techniques de traitement d'image ont vu le jour à partir de logiciels libres, de développements privés ou même commerciaux comme Photoshop [Dahab, 2004]. Ces techniques sont majoritairement basées sur la discrimination du collagène fibrillaire, responsable de la fibrose, présent dans la biopsie qui aura préalablement été marquée par un colorant (généralement du rouge Sirius). Le collagène ainsi marqué est alors visualisé par microscopie standard, en champ large. De manière générale, une technique idéale permettrait d'imager le collagène de façon spécifique, tout en faisant la distinction entre le fibrillaire et le non fibrillaire, dans le but d'obtenir un score quantitatif précis.

Réversibilité de la fibrose hépatique

En cas d'agression prolongée, la fibrose est généralement irréversible en raison de pontages intra et intermoléculaires touchant les gros faisceaux de collagène [Ricard-Blum, 1992]. Ces pontages forment des noyaux de pyridinoline reliant trois fibres de collagène entre elles (cross-link). Nous venons de voir que la fibrogenèse n'est pas un processus linéaire vers son aggravation mais un équilibre instable entre le dépôt de matrice (fibrogenèse) et sa dégradation (fibrolyse). Moins la fibrose est développée, plus elle a de chances d'être réversible. En effet, pendant une certaine période, la fibrose peut régresser si la cause primaire à l'origine de la maladie est supprimée [Issa, 2004].

Il est aujourd'hui bien admis que les cirrhoses faiblement évoluées peuvent être réversibles [Arthur, 2002]. A titre d'exemple, dans les modèles de fibroses induites expérimentalement, l'élimination de l'agent causal s'accompagne généralement d'une régression des fibroses non avancées [Issa, 2004]. Chez l'homme, des cas de régressions ont également été rapportés après élimination ou traitement de la pathologie, notamment chez des patients infectés par le VHC ou B (Virus de l'Hépatite B ou C), présentant une stéatose hépatique d'origine non alcoolique ou encore une hépatite auto-immune [Czaja, 2004]; [Arthur, 2002]; [Kweon, 2001]. La durée nécessaire à la régression complète d'une fibrose est très variable et fortement dépendante des facteurs pathogènes. Il est encore difficile d'expliquer pourquoi certains patients répondent mieux que d'autres aux traitements. Les mécanismes conditionnant la réversibilité de la fibrose hépatique sont, en effet, encore peu connus. Toutefois, la réversibilité n'est possible que si le traitement mis en route (traitement anti-viral, déplétion en fer, etc...) est efficace (efficacité jugée sur les critères usuels de la maladie). Les différences de régression pourraient s'expliquer par la présence plus ou moins importante de pontages (cross-link) entre les molécules de collagène. Il existerait donc un continuum entre une fibrose sans cross-link - réversibilité importante - et une fibrose avec de nombreux

cross-link - régressivité faible. Ces pontages plus ou moins importants ont une influence directe sur la réticulation du collagène et donc à son accès par les composés anti-fibrosants. Il n'existe encore que très peu de données cliniques ou expérimentales sur le sujet. Le développement de marqueurs fiables permettra d'évaluer beaucoup plus efficacement les différents essais et protocoles thérapeutiques afin d'identifier les facteurs conditionnant la réversibilité d'une fibrose. L'application de la méthode OF-SHM développée au sein de notre équipe en reconstruction de champs d'orientation permettrait d'évaluer une forme de réticulation du collagène au sein du foie hépatique, application qui semble très prometteuse. En effet, cette technique d'imagerie pourrait donner accès à des informations structurales du développement de la fibrose, détecter la présence de pontages ou encore échelonner la réticulation du collagène fibrillaire dans le foie hépatique.

Dans ce contexte, l'étude des collagènes fibrillaires impliqués dans la fibrose hépatique par la microscopie de seconde harmonique apparaît très prometteuse.

Scoring du collagène impliqué dans la fibrose hépatique par microscopie SHG

Le collagène, protéine majoritaire chez l'être humain et dans tous les organismes vivants, est une protéine de consistance fibreuse, peu élastique, constituant la majeure partie de la trame conjonctive. Les fibres de collagène et du tissu élastique forment la charpente fibrillaire du tissu conjonctif de nombreux organes et a un rôle majeur au cœur des mécanismes de cicatrisations interstitiels. Comme il a été décrit dans l'introduction de cette seconde partie, la fibrose hépatique se caractérise par l'accumulation exagérée et progressive dans le foie d'une matrice extra-cellulaire (*MEC*), réponse cicatricielle à une agression chronique du foie.

Dès 1986 l'existence d'un signal SHG du collagène (type I) a été mise en évidence sur des tendons de queue de rat [Freund, 1986], ce qui a donné suite à une grande variété d'études sur différents tissus (tendons, muscles, artères...). Il a ainsi été observé que seuls les collagènes fibrillaires, tel le collagène de type I et III, produisent un fort signal SHG, ce qui n'est pas vrai pour les collagènes non fibrillaires (type IV...) [Zipfel, 2003b] ; [Brown, 2003] ; [Gailhouste, 2010]. Nous présentons dans ce chapitre une méthode de scoring SHG du collagène fibrillaire pour la quantification de la fibrose du foie humain à partir de biopsies chirurgicales en coupes histologiques. Cette méthode de scoring SHG a été développée en suivant un cahier des charges dont la perspective d'évolution est tournée vers des techniques non invasives de type endoscopie.

4.1 Score de collagène fibrillaire par microscopie de seconde harmonique

La prolifération du collagène fibrillaire au sein d'organes tels que le foie, le poumon ou le rein est intimement liée à la progression de la fibrose. Ainsi, la quantification et la caractérisation du collagène dans ces organes sont essentielles pour diagnostiquer et comprendre l'évolution des fibroses, et éventuellement en appréhender certains mécanismes.

Nous avons vu que l'imagerie SHG permet de détecter de manière endogène et relativement spécifique, le collagène de type I voire de type III, celui-ci étant intimement lié au premier 2.1.1. Dans ce contexte, il apparaît intéressant d'utiliser le signal intrinsèque et endogène de génération de seconde harmonique de ce tissu cicatriciel au sein du foie hépatique pour l'étude des agrégats de collagène présent dans l'organe ou les tissus étudiés 2.3.3.

Ainsi, diverses applications sont apparues, pour quantifier les fibroses expérimentales sur modèle rénal [Strupler, 2007] ; [Strupler, 2008(a)] et pulmonaire [Pena, 2007]. Ces travaux ont permis de proposer différents scores basés sur la quantification des signaux SHG. [Tai, 2009] ont développé une méthode de quantification de la fibrose hépatique sur modèle animal, basée sur l'étude morphologique de l'évolution de la maladie. Une étude préliminaire réalisée par un laboratoire de Singapour a également utilisé ce type d'imagerie pour l'analyse quantitative de la fibrose dans le foie [Sun, 2008]. Les données SHG recueillies dans cette étude ont mis en évidence une redistribution importante du collagène fibrillaire lors des stades précoces de fibrose. Cette redistribution se traduirait par une augmentation significative des quantités de matrice au niveau des systèmes portes corrélée à une diminution du collagène diffus normalement présent dans le parenchyme hépatique.

Dans cette partie, nous présentons une méthode de scoring SHG du collagène pour la quantification de la fibrose du foie humain à partir de biopsies en coupes histologiques. Ces travaux, commencés lors de la thèse de Luc Gailhouste [Gailhouste, 2009(thèse)], ont consisté à évaluer de manière méthodique les différents points permettant d'établir un score de collagène à partir d'images SHG. Tout d'abord, il faut préciser que ce score a été développé de manière à établir une mesure pseudo-quantitative du collagène, et ce avec des méthodes les plus simples possibles, dans la perspective d'une évolution soit vers des mesures rapides et peu coûteuses établies à partir de biopsies, soit vers des méthodes non invasives de type endoscopique. Ce cahier des charges explique en particulier pourquoi nous avons peu étudié les échantillons à notre disposition à forte résolution spatiale. Nous avons donc abouti à un score établi à partir d'une image SHG basse résolution d'un échantillon, acquise dans des conditions bien précises permettant de fixer le gain de la chaîne de mesure à partir d'un échantillon de référence. Une particularité de ce choix, nécessaire pour distinguer les zones saines des zones fibrosées, est qu'il abouti à des images saturées, et dont le degré de saturation dépend de l'état de fibrose de l'échantillon. Nous avons ensuite optimisé un seuil pour binariser l'image. Le score du collagène est alors simplement le nombre moyen de pixels au dessus de ce seuil.

Nous avons montré [Gailhouste, 2010] que ce score était bien corrélé au score Métavir, la méthode de diagnostic *Gold Standard* en Europe [The METAVIR cooperative group, 1993]. Il faut noter néanmoins que le score Métavir n'est pas quantitatif, sans quantification spécifique du collagène puisqu'il ne prend pas en compte la fibrose sinusoïdale, mais pseudo-quantitatif, car des critères morphologiques interviennent dans son établissement. Ce score est défini par un médecin spécialiste anatomopathologiste qui visualise une coupe histologique marquée au rouge-Sirius pour déterminer la gravité de la progression du collagène fibrillaire. Or, il a été montré que le passage en deux temps différents d'un même échantillon peut donner deux évaluations différentes [Regev, 2002]. La variabilité intra et inter opérateur de cette méthode n'est pas négligeable. Ainsi, la possibilité de présenter un score indépendant de l'opérateur, et quantitatif (nous verrons dans la suite ce que ce terme recouvre), est un atout conséquent pour les méthodes SHG.

4.1.1 Présentation de la méthode de Score SHG

Nous présentons dans ce chapitre, une étude de cette méthode de scoring. La robustesse de cette méthode est démontrée point par point, en validant tout d'abord l'estimation de l'intensité SHG détectée en fonction de la concentration en collagène. Puis, nous montrons comment calibrer un système imageur pour pouvoir détecter avec une sensibilité constante la présence de collagène dans un échantillon sain ou cirrhotique et ce, à puissance laser constante. Cette méthode est testée pour deux objectifs différents, et les scores ainsi obtenus sont comparés. Les deux types d'échantillons utilisés pour le développement de cette technique sont des pièces opératoires de foie ainsi que des coupes histologiques issues de biopsies.

Présentation

Le score SHG de collagène se base sur l'utilisation d'un échantillon de référence pour calibrer le gain de la détection (PMT) du système imageur, pour définir l'intensité SHG moyenne émise par une zone non fibrosée de la biopsie. Ensuite, tous les échantillons, pour une épaisseur donnée, sont imagés dans les mêmes conditions, à savoir avec une puissance laser fixe et le gain du PMT ajusté sur un échantillon de référence. L'image SHG correspondante est binarisée en utilisant un seuil en intensité t . En pratique, le score d'une image en intensité SHG est obtenu en remplaçant chacun des pixels d'intensité $I < t$ par un pixel à 0 et chacun des pixels d'intensité $I \geq t$ par un pixel à 1, puis en faisant le ratio du nombre de pixels égaux à 1 sur le nombre pixels total de l'image. Mathématiquement, ce score peut être écrit comme :

$$\bar{S}(t) = \frac{1}{N} \sum_{I_{ij} \geq t} 1 \quad (4.1)$$

où I_{ij} est l'intensité mesurée sur le pixel ij , N est le nombre total de pixels de l'image et t est la valeur du seuil. On se base donc sur l'hypothèse que l'intensité du pixel est la variable qui définira, selon le seuil, les deux populations binaires d'intérêt. La figure 4.1 illustre la binarisation d'une image de dégradés en niveaux de gris codée en intensité sur 8-bit (soit une gamme

d'intensité de 0 à $2^8 = 255$) et seuillée à $t = 25, 50$ et 75% de la valeur maximale de l'image. L'image binaire résultante ne contient que deux valeurs, avec tous les pixels en dessous du seuil à 0, et tous les pixels au dessus du seuil à 1.

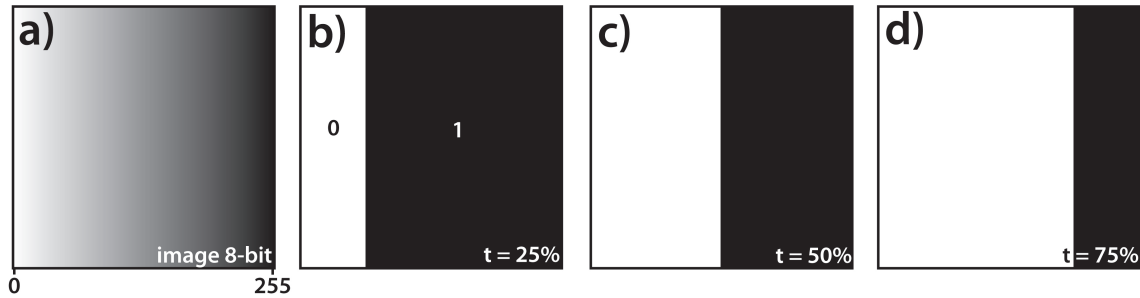


FIGURE 4.1 : *Illustration du seuillage d'une image : a) Image de référence à 256 niveaux de gris (8-bits) ; b) Seuillage de a) avec un seuil t fixé à 25% ; c) Seuillage de a) avec un seuil t fixé à 50% ; d) Seuillage de a) avec un seuil t fixé à 75%.*

En fixant l'intensité SHG de référence émise par une zone non fibrotique, la majeure partie des images obtenues contient des zones saturées ($I_{sat} = 2^{12} - 1$) qui correspondent typiquement à des zones de forte concentration en collagène fibrillaire. De fait, les zones non saturées ($I < I_{sat}$) correspondent typiquement à des zones de foie non fibrosées. Une image SHG de foie humain fibrosé est en réalité presque déjà binarisée par la procédure d'acquisition, ce qui est illustré figure 4.2 pour une biopsie de patient évalué au stade Métavir-F1 (fibrose sans septa). Pour la figure 4.2a), le gain du PMT est ajusté à une valeur g_1 qui conduit à n'avoir quasiment pas de saturation du système imageur, comme le montre l'histogramme d'intensité de la figure 4.2d). On remarque que cet histogramme ne contient pas de structure particulière, aucun pic d'intensité ne se dégage. Pour simuler le phénomène de saturation, l'image de base a été multipliée par 4.7 et les pixels d'intensité $I > I_{sat}$ ont été ramenés à $I = I_{sat}$. Le contraste de l'image 4.2b) est comparable à une image de saturation réelle obtenue en augmentant le gain du PMT à $4.7 \times g_1$ (figure 4.2c). Les histogrammes de la figure 4.2c) se superposent quasiment parfaitement avec l'histogramme de l'image a) très peu saturée, tout comme l'histogramme d'une image acquise avec un gain à $2.15 \times g_1$, indiquant ainsi que le phénomène de saturation n'affecte pas les basses valeurs de l'histogramme d'intensité.

Pour réaliser une méthode de score SHG répétable et valide quelque soit l'échantillon imagé, il est très difficile de trouver un dispositif expérimental ne permettant d'acquérir que des images non saturées. Comme le montre la figure 4.2d), l'absence de pic d'intensité dans l'histogramme d'intensité ne permet pas d'obtenir d'information spécifique sur les zones fibrosées ou non de la biopsie. De plus, nous avons noté que pour obtenir des images sans saturation pour des échantillons cirrhotiques, et des échantillons sains, le gain du PMT doit varier dans une gamme de 1 à 20. Cette grande variation de gains, couplée à la difficulté d'ajuster précisément sa valeur pour obtenir une image sans saturation, est un point critique pour la mise en place de toute méthode

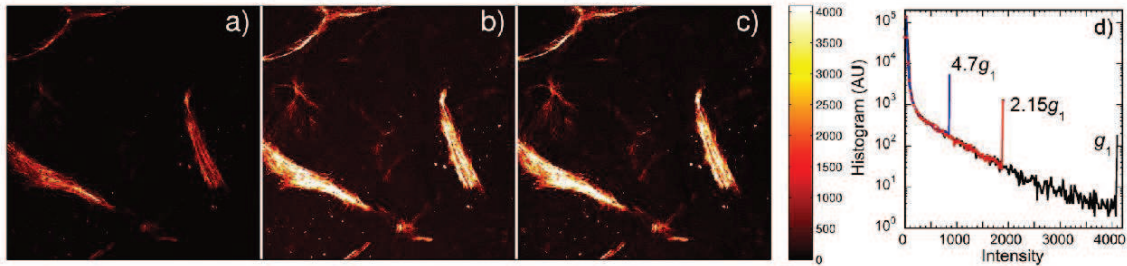


FIGURE 4.2 : Images SHG d'un échantillon de foie au stade F1, acquises avec un objectif $4 \times -NA0.1$. a) Le gain du PM est fixé à g_1 pour obtenir une image quasiment pas saturée ($3.5 \times 3.5 mm^2$); b) Même image que a) multipliée par 4.7 et ramenée à l'échelle d'intensité 12-bit [0 – 4095]; c) Même zone d'intérêt que a), le gain du PM est fixé à $4.7 \times g_1$; d) Comparaison entre les histogrammes d'intensités pour trois gains du PM g_1 , $2.15 \times g_1$ et $4.7 \times g_1$.

qui exploiterait l'intensité. En effet, le seuil d'intensité nécessaire pour calculer le score défini en 4.1 est sensé être modifié pour chaque expérience dès que le niveau d'intensité change, pour pouvoir effectuer une discrimination entre les régions fibrosées et saines avec la même précision, quelque soit le niveau de fibrose de l'échantillon imagé. Par conséquent, la difficulté de trouver un seuil d'intensité de référence pour être en mesure de comparer différents scores nous incite à développer une méthode utilisant des images saturées. Bien que cela représente une perte d'information importante, en particulier pour les zones à fortes concentrations en collagène, c'est le prix à payer pour pouvoir imposer un seuil d'intensité de référence unique, quelque soit l'échantillon imagé, et ainsi pouvoir effectuer directement des comparaisons entre scores.

La description complète de notre méthode de scoring est développée par la suite, et commence par la présentation d'un modèle simple pour décrire l'intensité SHG en fonction des différents paramètres expérimentaux ainsi que de la quantité de collagène présent dans le foie humain. Ce modèle est ensuite validé par des mesures expérimentales. Nous montrons enfin que l'intensité générée par le collagène fibrillaire dans le foie humain est quantifiable assez précisément, et est comparée d'un objectif à un autre pour des petites valeurs d'ouverture numérique ($4 \times -NA0.1$; $10 \times -NA0.25$).

Préparation des échantillons

Dans le cas d'une pièce opératoire, autrement dit un volume important de prélèvement de matière biologique, les médecins analysent à l'œil nu et déterminent les zones d'intérêt. Ils redécoupent la pièce pour en sortir de plus petits échantillons d'une taille adaptée à des "cassettes" standardisées. Ces fragments vont constituer le bloc de paraffine contenant l'échantillon tissulaire à partir duquel des coupes de tissus seront réalisées. Dans le cas de prélèvement de biopsies, il n'est pas nécessaire de les redécouper.

Les cassettes sont des petites boîtes en plastique percées de multiples trous de telle sorte qu'on puisse imprégner efficacement les échantillons en les plongeant dans les différents bains de produits. Les prélèvements sont orientés et placés dans la cassette, de sorte que la zone d'intérêt

médical à observer soit face contre le fond de la cassette.

Les étapes suivantes de la préparation des prélèvements sont la déshydratation des échantillons par un bain d'alcool, un bain de toluène pour remplacer l'alcool imprégnant l'échantillon, puis un bain de paraffine qui permettra de chasser le toluène. La température de ces bains avoisine les 40°C . Les échantillons ainsi déshydratés et paraffinés sont sortis de la cassette pour être placés dans une petite cuve en métal préchauffée à 40°C . Un technicien remplit alors la cuve de paraffine liquide chauffée à 52°C puis la pose directement sur une plaque refroidissante, à -3°C environ. Avant que la paraffine ne se fige complètement, c'est-à-dire au bout d'une dizaine de minutes, le technicien prendra soin de déposer à la surface de la cuve, un couvercle qui s'emboîtera parfaitement avec le haut de la cuve tout en étant plan avec le fond. Une fois que la paraffine est durcie, le bloc se démoule facilement, sans perte. On a donc, l'échantillon bien orienté inclus dans le bloc qui affleure en surface d'un côté, le bloc de paraffine puis le fond de cassette qui permettra de positionner le bloc sur un microtome. Une fois que l'échantillon est en place sur le microtome, l'état de surface du bloc est retravaillé pour enlever la paraffine en surplus, puis on opère la coupe d'une fine coupe d'épaisseur constante et bien maîtrisée (3 ou $5\mu\text{m}$ en routine). Le technicien place alors cette fine coupe fragile sur une lame de microscope qui aura préalablement été recouverte d'une solution d'eau et d'albumine, laquelle sera ensuite posée sur une plaque chauffante à 37°C . A cette étape s'opère un recuit de la paraffine qui perd en épaisseur dans les zones hors de la biopsie. A l'aide d'un pinceau, la tranche de paraffine contenant la coupe d'échantillon à analyser est délicatement étalée, puis le surplus d'eau est enlevé. Une fois que la paraffine colle suffisamment à la lame, on la place dans une étuve à 50°C pour finir de la sécher complètement.

Les échantillons préparés et mis à notre disposition par l'équipe de Bruno TURLIN (Département d'Anatomie Pathologique, Hôpital Pontchaillou, RENNES) sont des coupes tissulaires, provenant de pièces opératoires, de 1cm^2 pour $50\mu\text{m}$ d'épaisseur et sont issus de 12 patients à des stades de fibroses variés. Les biopsies en coupes histologiques ont une épaisseur standard de $5\mu\text{m}$ et sont issues de 41 patients, présentant également une fibrose hépatique à des stades divers. Des coupes de $15\mu\text{m}$ et $50\mu\text{m}$ d'épaisseur ont également été réalisées pour les besoins de notre étude. Tous les prélèvements mis à notre disposition sont issus de patients présentant une fibrose du foie chronique, à différents degrés de sévérité, liée aux virus des hépatites B ou C, ou à une consommation d'alcool excessive. Le seul critère discriminant imposé pour nos études est un niveau de stéatose faible ($< 5\%$) et une absence de marquage aux colorants utilisés habituellement pour évaluer le stade d'avancement de la fibrose. L'imagerie multiphotonique SHG/TPEF a été réalisée sans déparaffinage, marquage ou utilisation de lame couvre-objet. La détermination des stades de fibroses-Metavir pour ces échantillons est réalisée par un médecin spécialisé sur des coupes sériées.

4.1.2 Conditions d'imagerie

Notre système imageur est celui décrit dans le chapitre 2 de ce manuscrit. Le laser est accordé à la longueur d'onde de 810nm pour toutes les acquisitions. Les impulsions de 200fs avec un

Objectifs	$w_{xy}(\mu m)^{(1)}$	$w_z(\mu m)^{(1)}$	$w_z(\mu m)^{(2)}$	FOV (μm)
10× Plan C-NA 0.25	0.73	9.7	13.5 ± 0.3	1410
4× Plan CN-NA 0.1	1.83	60.8	65 ± 5	3525

TABLE 4.1 : *Propriétés des objectifs utilisés.* ⁽¹⁾ : estimation latérale et axiale $1/e$ de la PSF^2 sous hypothèse que sa forme soit Gaussienne (cf 1); ⁽²⁾ : données expérimentales; FOV = champ de vue de l'objectif (Field Of View).

taux de répétition de $76MHz$, sont polarisées circulairement par une lame quart d'onde située avant la roue porte-objectifs. Après stabilisation du laser, la puissance est constante, à $620mW$, et le faisceau laser est envoyé vers l'objectif sélectionné (tableau 4.1).

Le signal SHG est collecté en transmission par un condenseur d'ouverture numérique 0.3 (IX-ULWCD, Olympus). La longueur d'onde d'excitation est bloquée par un filtre *BG39* de $2mm$ d'épaisseur (Lambda Research Optics, CA), et la SHG est collectée à travers un filtre passe-bande à $405nm$ ($10nm$ de largeur à mi-hauteur, Edmund Optics, York, UK) par un photomultiplicateur (PMT) à refroidissement thermoélectrique (Hamamatsu H7844). L'acquisition des images SHG est réalisée en codage de 12-bit. Les images sont enregistrées au format *tiff*, sans compression, directement via le logiciel de contrôle du microscope (Fluoview 4.3c, Olympus). La vitesse de balayage utilisée est la plus lente disponible, correspondant à un temps de résidence du laser sur l'échantillon par pixel d'environ $10\mu s$, soit $2.62s$ pour une image plein champ de 512×512 pixels. Dans le but de couvrir le même champ qu'un objectif 4×, avec un objectif 10×, 9 images 512×512 sont acquises automatiquement avec une platine de déplacement en $X - Y$ (Märzhäuser, Westlar, Allemagne). Un montage composite des images est ensuite effectué, et tronqué par la région d'intérêt correspondant au champ du 4× pour permettre la comparaison des acquisitions.

Le gain g du PMT a été attentivement mesuré en fonction de la tension appliquée au contrôleur dans le but de vérifier l'équation $g_{PMT} \propto (V_{PMT})^\alpha$ avec l'exposant $\alpha = 8$, en accord avec la valeur déduite de la courbe du constructeur présentée dans la notice technique du PMT. Signalons ici que la reproductibilité du paramètre gain est très bonne.

Nous avons donc choisi de contrôler le niveau d'intensité de l'image acquise en jouant sur le gain du PMT, en gardant une puissance laser constante, ce qui a pour avantage de permettre la comparaison directe des valeurs d'intensités SHG. Nous ne faisons varier que le niveau de détection, autorisant ainsi une comparaison quantitative de l'intensité obtenue. Pour les acquisitions avec les objectifs 4× et 10×, la puissance laser d'excitation est filtrée respectivement à 0% et 50%, ce qui donne comme puissances mesurées à la sortie des objectifs, $106.6mW$ et $51.2mW$.

Pour connaître précisément le volume focal sondé par les objectifs, nous avons mesuré le profil axial w_z de la PSF (défini dans le chapitre 2) des deux objectifs par TPEF en utilisant une couche mince de solution $10^{-4}mol/l$ de *kiton-red620* (Exciton, Dayton, OH) dans de l'eau. Ces profils axiaux w_z ont été estimés en ajustant les données d'intensité de la TPEF en fonction du pas de

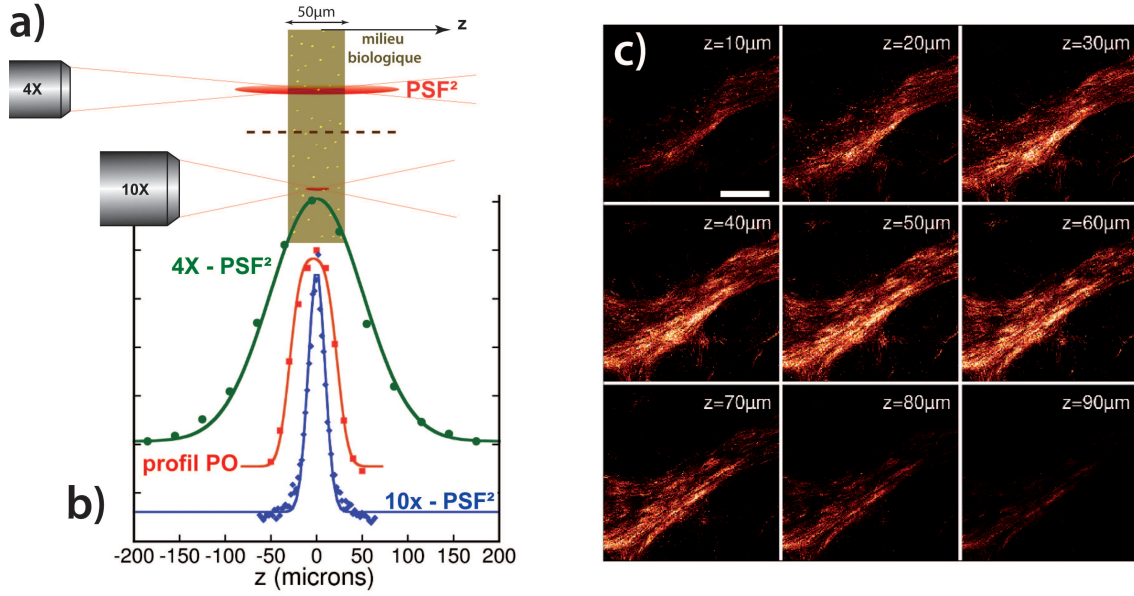


FIGURE 4.3 : **a)** Représentation schématique des PSF^2 des deux objectifs utilisés comparées à l'épaisseur d'un échantillon de $50\mu m$. **b)** Profils expérimentaux en z des objectifs $4\times$ (●) et $10\times$ (◆), et profil d'intensité en z (■) d'une pièce opératoire (PO) de $50\mu m$ d'épaisseur reconstruit à l'objectif $10\times$. Les lignes continues correspondent aux ajustements effectués et explicités dans le texte. **c)** Images typiques d'une pile en z acquise avec l'objectif $10\times$. Barre d'échelle : $400\mu m$.

déplacement en z , sous l'hypothèse d'une variation de forme Gaussienne, et ce par la méthode des moindres carrés [Zipfel, 2003a]. L'épaisseur des pièces opératoires de foie humain imagées a pu être précisément estimée en acquérant une pile d'image à différentes profondeurs (z -stack) avec l'objectif $10\times$ d'ouverture numérique 0.25. La variation d'intensité est là aussi ajustée par la méthode des moindres carrés par la formule

$$p(z) = \frac{1}{2}A \left[\operatorname{erf} \left(\frac{z - z_i}{w_z} \right) + \operatorname{erf} \left(\frac{z_f - z}{w_z} \right) \right] \quad (4.2)$$

Cette formule est valable pour une couche mince uniforme d'épaisseur e à la profondeur z et pour un profil de PSF Gaussien. A est une valeur d'uniformisation de l'intensité, z_i et z_f correspondent respectivement à la valeur initiale et finale de la profondeur d'imagerie, ce qui amène $z_f = e + z_i$. Nous avons choisi d'utiliser la valeur trouvée expérimentalement pour w_z . La fonction erreur (*Error Function*) est définie comme

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-u^2} du \quad (4.3)$$

La figure 4.3a) montre les profils typiques en z d'une pièce opératoire d'environ $50\mu m$ d'épaisseur ainsi que les PSF^2 des objectifs utilisés (cf valeurs dans le tableau 4.1). Pour l'objectif $4\times$, la position de l'échantillon a dû être ajusté avec précaution au centre de la PSF de l'objectif. Tous les traitements d'images et les analyses (seuillages, scores SHG) ont été effectués avec des scripts MATLAB développés au sein de l'équipe.

4.1.3 Validation de la méthode de Scores SHG

Après avoir présenté les principes de notre méthode de scoring SHG, nous développons dans cette partie une approche plus quantitative, avec la présentation d'un modèle simple permettant de relier l'intensité SHG émise, aux différents paramètres expérimentaux. Ce modèle est validé par comparaison avec différentes expériences.

Intensité SHG et concentration en collagène

La SHG étant un processus non linéaire et cohérent de diffusion, l'influence des différents paramètres des objectifs (NA,...) et de la concentration en harmonophores sur l'intensité SHG émise est difficile à estimer à cause de la cohérence. Cependant, nous pouvons tenter un calcul approximatif qui sera validé *a posteriori*. En effet, toutes les images de foie montrent un fort désordre d'orientation et de concentration des ramifications de collagène fibrillaire. En outre, la PSF des objectifs à faible ouverture numérique couvre une extension axiale et longitudinale bien plus grande que les longueurs d'onde d'excitation typiques. Par conséquent, on peut s'attendre à ce que l'intensité émise résulte d'une somme incohérente de signaux cohérents générés par de petit amas de collagène fibrillaire. Cette intensité serait donc proportionnelle à mN^2 , avec N le nombre d'harmonophores présent dans un amas de collagène offrant une contribution cohérente et $m \approx C\Omega$, le nombre d'amas présent dans le volume focal. Sous une telle hypothèse, l'intensité globale est proportionnelle au volume Ω de la PSF, et doit se comporter en fonction de l'ouverture numérique comme l'intensité générée en fluorescence excitée à deux photons. Nous vérifierons cette hypothèse *a posteriori* en comparant les prédictions de cette hypothèse avec nos résultats expérimentaux. L'intensité SHG peut s'écrire comme

$$I_{SHG} \propto g_{PM} T^2 I_0^2 \int d^3x P(x) \bar{C} \quad (4.4)$$

où g_{PM} est le gain du PM, T est la transmission globale du dispositif optique imageur, \bar{C} la concentration effective en harmonophores,

$$P(x) = \exp(-(x^2 + y^2)/w_{xy}^2) \exp(-z^2/w_z^2)$$

est le carré de la PSF, sous approximation Gaussienne valide pour l'excitation à deux photons [Zipfel, Williams, Webb, 2003], et I_0 l'intensité dans le plan focal.

Dans l'approximation paraxiale (faible divergence du faisceau par rapport à son axe de propagation), $w_{xy} \approx NA^{-1}$ et $w_z \approx NA^{-2}$. En supposant dans un premier temps que l'épaisseur de l'échantillon est grande devant le profil axial de la PSF^2 , le volume de la PSF^2 est donné par $\Omega \approx w_{xy}^2 w_z \approx NA^{-4}$, et $I_0 \approx NA^2$ pour l'intensité. Par conséquent, $\langle I \rangle \propto NA^{-4} (NA^2)^2$ est indépendant de l'ouverture numérique de l'objectif considéré, comme c'est le cas pour la TPEF.

Ceci est valide pour l'objectif 10× par exemple, mais pour le 4×, l'épaisseur e de l'échantillon devient petite devant l'étendue axiale de la PSF^2 ($e \ll w_z$), et seulement une partie du volume de la PSF^2 contribue au signal. Le volume effectif $f\Omega$ sondé devient alors

$$f\Omega \approx NA^{-2} \int_{-e/2}^{e/2} \exp\left(\frac{-z^2}{w_z^2}\right) dz \approx NA^{-4} \operatorname{erf}\left(\frac{e}{2w_z}\right) \quad (4.5)$$

avec $f = \operatorname{erf}\left(\frac{e}{2w_z}\right)$ un facteur géométrique. Notons que $\operatorname{erf}(x) \rightarrow 1$ quand $x \rightarrow \infty$, ce qui est valide quand $e \gg w_z$.

Par conséquent, pour chaque objectif, l'intensité peut s'écrire comme

$$I_{SHG} \propto g_{PM} T^2 f \bar{C} \quad (4.6)$$

Sous de telles hypothèses, l'intensité SHG générée ne dépend du NA des objectifs qu'au travers du facteur géométrique f , et est proportionnelle à une concentration effective. Nous pouvons donc espérer comparer les intensités entre elles.

En utilisant un échantillon de *contrôle*, typiquement un échantillon de foie sain F0, on choisit de régler le gain g_{PM} du PM de manière à avoir une intensité moyenne $\langle I \rangle = r I_{sat}$, r permettant de fixer une intensité de référence, sur toute une zone d'intérêt ou ROI (Region Of Interest), cette région d'intérêt ne comportant que des zones saines. Alors, $\langle I \rangle = r I_{sat} \approx g_r T^2 f \bar{C}_{ref}$, et l'intensité obtenue avec ce gain g_r de référence, pour une autre concentration en collagène donne

$$\frac{I_{SHG}}{r I_{sat}} = \frac{\bar{C}}{C_{ref}} \quad (4.7)$$

L'intensité normalisée est alors proportionnelle à la concentration effective en collagène \bar{C} , et à la valeur d'intensité de référence r .

Définition de r , basée sur de la MEC saine

Nous avons noté que le signal SHG généré par la contribution basale de la matrice extra-cellulaire du foie est toujours la même hors des zones portales, et ce, indépendamment du stade Métavir [Gailhouste, 2010]. Cette propriété des régions non fibrotiques peut alors être exploitée en tant que référence interne pour calibrer le microscope. La figure 4.4a) présente des ROI de matrice extra-cellulaire saine sur un échantillon fortement fibrosé (stade F4 Métavir).

Le gain de référence du PM est fixé à partir d'un échantillon non fibrosé (F0 Métavir), dans le but d'obtenir une intensité moyenne équivalent à $r = 4\%$ de toute la gamme d'intensité, 4% de 4095, soit 164. Ce gain de référence du PM étant désormais fixé, nous avons passé les échantillons de pièces opératoires de foie humain, des différents stades F1-F4 Métavir. Pour chaque échantillon, une sélection de 6 ROI (de $80 \times 80 \text{pix}$) de MEC est effectuée, et leurs intensités moyennes sont calculées. La dispersion de ces intensités moyennes est présentée sous la forme de "boîtes

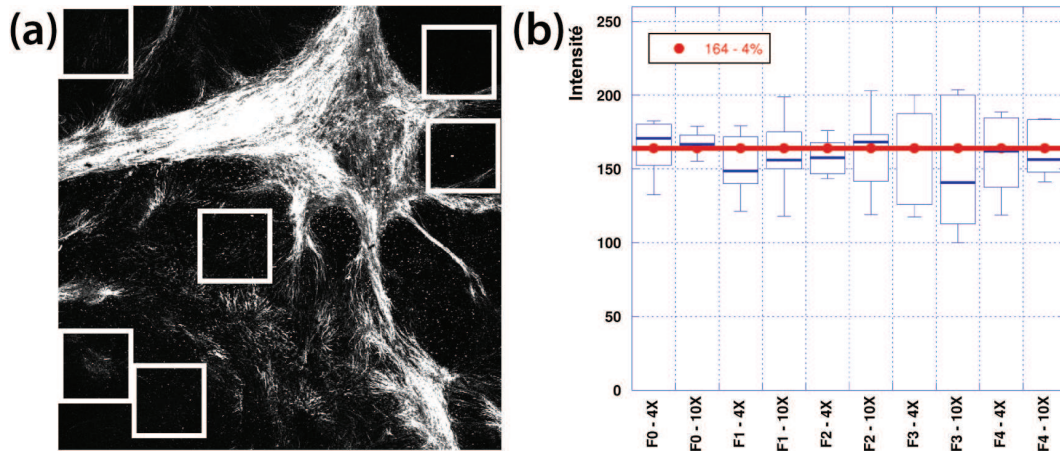


FIGURE 4.4 : a) Exemple de sélection de 6 ROIs (80×80 pixels) de MEC saine sur une image SHG $4\times$ (F4 ici). b) Dispersion de l'intensité moyenne des différentes ROIs de MEC sélectionnées sur différentes images à tous les stades F-Métavir. Le gain du PM est le même pour tous les échantillons à un grossissement donné, et a été ajusté pour obtenir $r = 4\%$ (soit $\langle I_{SHG} \rangle = 164$, représenté par la ligne horizontale) sur un échantillon F0.

à moustache" figure 4.4b). La valeur moyenne, ou la médiane de ces intensités, pour chaque échantillon et pour les deux objectifs $10\times$ et $4\times$, sont toujours très proches de la valeur $r = 164$ attendue. Ce résultat est une forte indication que la MEC non fibrosée a une distribution en collagène quasiment uniforme.

Il vient d'être montré que la MEC d'un échantillon, qu'importe son stade de fibrose, peut-être utilisée pour définir le gain g_r de référence. Cependant, il est préférable d'effectuer ce calibrage avec un échantillon sain F0. Dans la suite de ce chapitre, notre microscope est implicitement calibré de cette manière, sauf mention contraire. Ce calibrage doit être effectué à chaque fois que les échantillons diffèrent soit par leurs types (pièces opératoires chirurgicales ou biopsies), soit par leurs épaisseurs.

Comparaison des intensités $4\times$ et $10\times$ sur de la MEC saine

Il est maintenant possible de vérifier la validité des équations 4.6 et 4.7. En ne sélectionnant que des régions d'intérêt de matrice extra-cellulaire saine, la valeur du PM (V) a été ajustée pour obtenir une suite d'images d'intensités moyennes à 2, 3, 4 et 5% de la gamme d'intensité totale. Les images menant à des intensités moyennes supérieures ou égales à 6% n'ont pas été retenues car le gain du PM correspondant introduisait un niveau de saturation trop élevé. Le gain du PM en fonction de la tension d'alimentation est donné dans la documentation constructeur par $g_{PM} \approx (V_{PM}/1000)^8$. Nous avons vérifié expérimentalement la validité de l'exposant 8.

Les images typiques de ces acquisitions sont données figure 4.5a) et b).

En supposant que l'équation 4.7 est valide et que la concentration effective \bar{C}_{ref} en collagène dans la MEC soit indépendant du stade d'évolution de la fibrose des échantillons comme l'indique

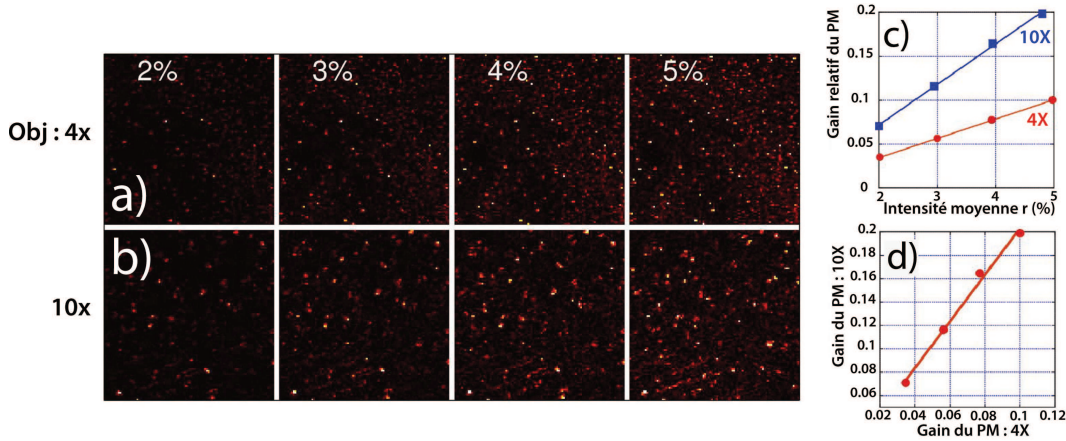


FIGURE 4.5 : Images SHG de la MEC basale pour différents gains du PM correspondant à $r = 2, 3, 4$ et 5% : a) objectif $4\times -NA0.1$; b) objectif $10\times -NA0.25$; c) Gains du PM correspondant ; d) Corrélations entre les gains du PM pour les objectifs $4\times$ et $10\times$.

la figure 4.4b), on peut s'attendre à ce que le gain du PM soit une fonction linéaire de r . Ceci est vérifié, comme le montre la figure 4.5c), où les deux séries de gains $g_r^{4\times}$ et $g_r^{10\times}$, varient linéairement avec le niveau d'intensité moyenne r (corrélation linéaire avec $R^2 = 0.998$).

De manière plus générale, pour chaque valeur de r , les histogrammes d'intensités des objectifs $4\times$ et $10\times$ sont comparables. Cela indique que sur ces régions d'ECM non fibrotiques, le collagène est distribué uniformément aux deux échelles sondées par les deux objectifs.

De plus, en utilisant l'équation 4.6, les gains du PM mesurés sont sensés suivre la relation suivante :

$$g_r^{10\times} = \left(\frac{T_{4\times}}{T_{10\times}} \right)^2 f_{4\times} g_r^{4\times} \quad (4.8)$$

Le facteur géométrique $f = \text{erf}\left(\frac{e}{2w_z}\right)$ de l'objectif $4\times$ est ≈ 0.41 , et $\left(\frac{T_{4\times}}{T_{10\times}}\right)^2 \approx 4.33$. Notre modèle prédit donc $g_r^{10\times} \approx 1.8g_r^{4\times}$. Comme le montre la figure 4.5d), la corrélation entre les gains ajustés pour les objectifs $4\times$ et $10\times$ est linéaire ($R^2 = 0.992$), avec une pente ≈ 1.95 . Cette valeur est légèrement supérieure à celle prédite par notre modèle. Plusieurs raisons peuvent expliquer cet écart : [i] la concentration en collagène des zones de MEC sélectionnées peut légèrement varier, les objectifs $4\times$ et $10\times$ ne sondant pas le même volume ; [ii] la collection du signal SHG peut être différente d'un objectif à l'autre, leurs ouvertures numériques étant différentes ; [iii] la correction géométrique dans l'hypothèse du profil Gaussien est seulement une approximation ; [iv] les effets de cohérence, négligés dans notre modèle, peuvent introduire une dépendance en NA .

Bien qu'il y ait un petit écart entre notre modèle et l'expérience, les données sont fortement corrélées linéairement, allant ainsi dans le sens des hypothèses émises pour développer notre modèle.

Suivant la même méthodologie, l'influence du facteur géométrique f (apparaissant dans l'équation 4.5) est à présent vérifiée. Cette étude est basée sur une série de trois coupes histologiques sériées d'épaisseurs $5, 15$ et $50\mu\text{m}$ respectivement, issue de coupes histologiques de

biopsies de patients à deux stades Métavir différents, F3 et F4. Un exemple d'acquisition de ces échantillons est donné figure 4.6a-c) pour un patient au stade F4.

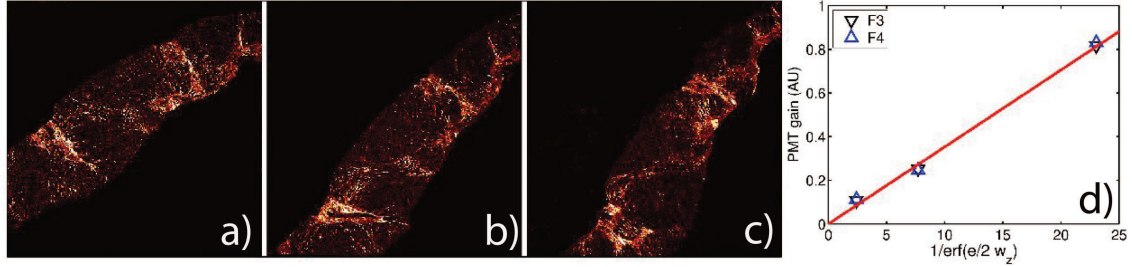


FIGURE 4.6 : Images SHG de coupes histologiques s eries d'une biopsie de patient au stade F4 Métavir : a) 5 μ m ; b) 15 μ m ; c) 50 μ m ; d) Corrélation entre le gain du PM et l'inverse du facteur géométrique f (4.5).

Comme les trois échantillons ont une épaisseur différentes, la calibration du gain du PM pour obtenir $I_{MEC} \approx 164$ est effectuée à chaque fois. On s'attend, via l'équation 4.6, à ce que le gain du PM soit proportionnel à $1/f$, soit $g_{PM} \propto 1/f$. Comme l'indique la figure 4.6d), ceci est vérifié pour les deux séries d'échantillons F3 et F4 puisque les différents gains du PM montrent une bonne corrélation linéaire avec le facteur géométrique $1/f$ ($R^2 = 0.997$ et 0.994 , respectivement). Ces résultats démontrent la pertinence de l'équation 4.6 pour évaluer l'intensité du signal SHG  mit par le foie humain.

Comparaison des scores 4 \times et 10 \times

Il a été montré dans la partie précédente que notre modèle pour décrire l'intensité SHG généré par le foie humain ( quations 4.6 et 4.7) traduit bien les résultats expérimentaux issus de biopsies en coupes histologiques, sans marquage préalable. La dernière étape est de comparer les valeurs de scores SHG définis par l'équation 4.1 pour les mêmes zones d'intérêts de différents échantillons, à différentes intensités de référence et pour les objectifs 4 \times –NA0.1 et 10 \times –NA0.25.

Pour définir les scores $\bar{S}(t_r)$, les pixels conservés sont ceux ayant une valeur d'intensité $I > t_r$, où t_r est un seuil lié à la valeur d'intensité de référence r . A partir de l'équation 4.7, on s'attend à ce que si la valeur d'intensité de référence est modifiée à une valeur r' , alors le nouveau score $\bar{S}(t_{r'})$ obtenu à partir du nouveau seuil $t' = t_r r' / r$ soit identique à $\bar{S}(t_r)$. En effet, une conséquence directe issue de l'équation 4.7 est que le score défini comme 4.1 est seulement fonction de t_r / r . Dans le but de vérifier cette relation, des images SHG de pièces opératoires à notre disposition ont été acquises avec les deux objectifs, pour des intensités de référence fixées à $r = 2, 3, 4$ et 5%. Avec l'objectif 4 \times , une seule acquisition suffit à intégrer toute l'épaisseur de l'échantillon. Pour chaque ROIs imagées à l'objectif 10 \times , une pile d'images en fonction de z est acquise (par pas de 10 μ m), et l'image correspondant au centre de l'échantillon est conservée. En règle générale, cette dernière correspond à un maximum d'intensité moyenne sur toute l'image. Pour couvrir avec l'objectif 10 \times la même aire qu'une acquisition au 4 \times , 9 images contigües en x, y sont réalisées

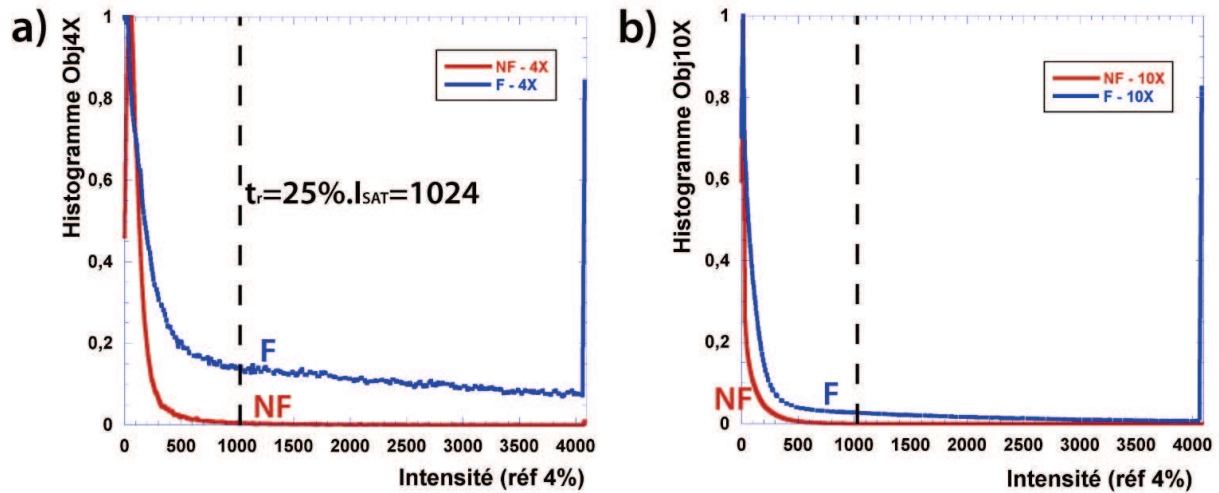


FIGURE 4.7 : **a)** Histogrammes d'intensité de zones F et NF acquises à l'objectif 4× avec un gain fixé pour une intensité de référence sur MEC saine de 4% ; **b)** Histogrammes d'intensité de zones F et NF acquises à l'objectif 10× dans les mêmes conditions que a).

au centre de l'échantillon, puis une reconstruction est effectuée.

Ces deux étapes (réalisation d'images contiguës et reconstruction) sont entièrement automatisées, via LabVIEW pour l'acquisition des piles d'images avec le contrôle de la platine de déplacement (x, y) Märzhäuser, et via Matlab pour la reconstruction des images 10× avec pour rendu, une image de la même aire qu'au 4×.

Il est à présent nécessaire d'optimiser la valeur de seuil $t_{4\%}$ pour pouvoir différencier le mieux possible les zones saines et fibrosées. Ainsi, sur des images 4× et 10× de biopsies chirurgicales fibrosées acquises dans les conditions d'imagerie prédéfinies, avec le gain du détecteur permettant de fixer l'intensité moyenne générée par la MEC saine à 4% de l'intensité maximale saturée, nous avons sélectionné des zones non fibrosées (NF) et fibrosées (F). Les histogrammes de ces zones d'intérêts sont présentés figure 4.7.

Pour éliminer au maximum la contribution des zones saines, nous avons choisi de fixer la valeur de seuillage des images à 25% de l'intensité maximale, soit un seuil de 1024. En effet, on constate sur les histogrammes d'intensité de la zone NF (figure 4.7), donc saine, que la grande majorité des contributions en intensité se trouve sous la barre de 1024, que ce soit pour une image acquise au 4× ou au 10×. De plus, même en éliminant les intensités en dessous de 25% de T_{sat} , une forte contribution des zones fibrosées est conservée.

Des images SHG typiques, pour deux échantillons F1 et F4, sont présentées figure 4.8a) (en colonne). Bien qu'au niveau spatial, l'échantillonnage soit différent (512^2 et 1300^2 pixels pour les images 4× et 10× respectivement), les images semblent très similaires. Cela indique que les agrégats de collagène sont relativement homogènes à l'échelle de l'épaisseur de nos échantillons ($\approx 50\mu m$). Cette constatation est cohérente avec le fait que la taille typique d'une telle structure de collagène est de quelques centaines de microns. Par conséquent, il n'est pas étonnant qu'une aire projetée d'agrégats de collagène obtenue à partir de scores acquis aux objectifs 4× et 10×

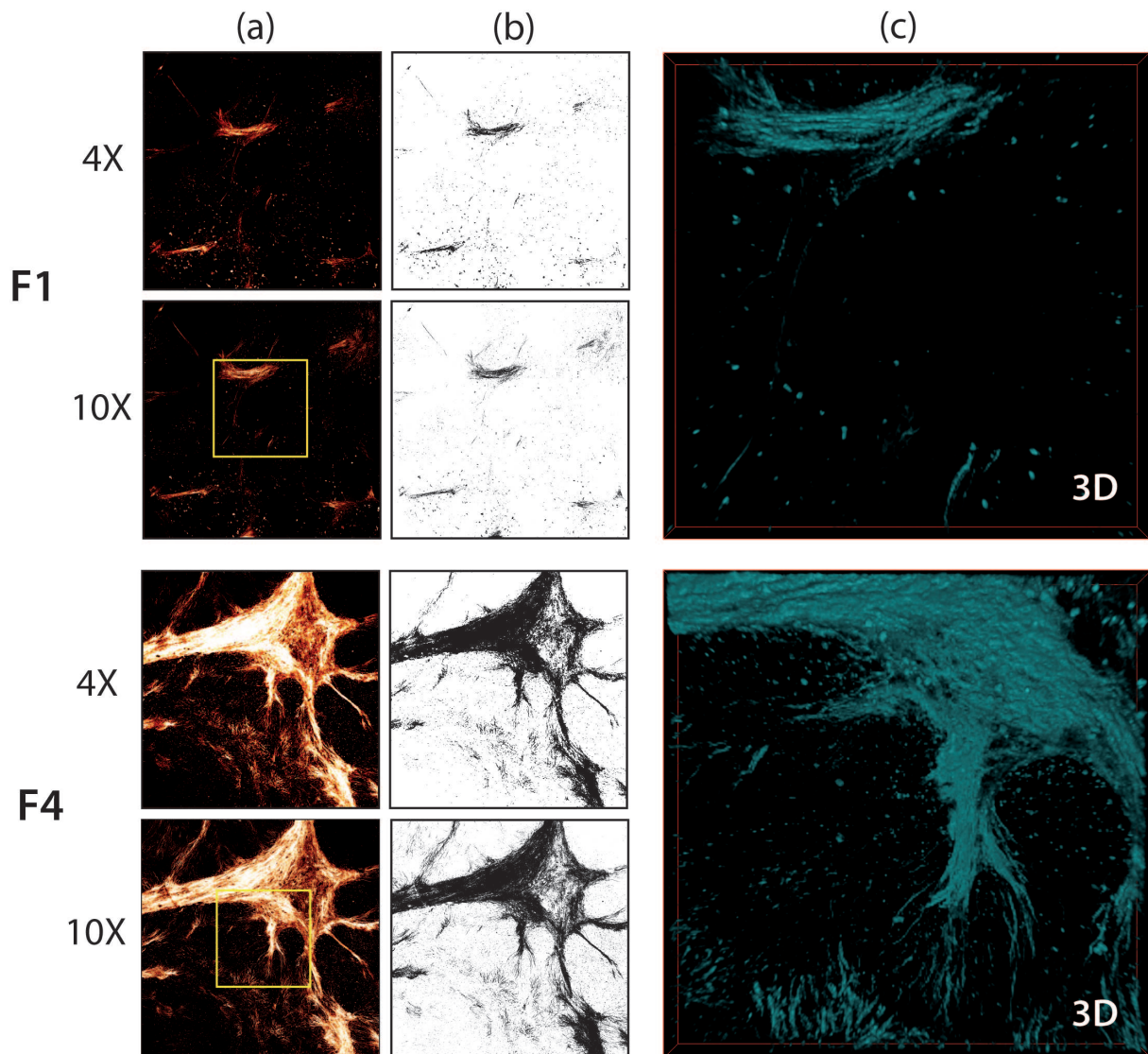


FIGURE 4.8 : Exemples d'images SHG aux grossissements $4\times$ et $10\times$ avec $r = 4\%$. Le champs $3.4 \times 3.4 \text{ mm}$ est le même pour les deux objectifs (une image $10\times$ étant une composition de 9 images). En colonne : **a)** Images brutes SHG avec $r = 4\%$; **b)** Images seuillées avec $t_r = 1024$; **c)** Reconstructions 3D $100 \times 100 \times 50 \mu\text{m}$ correspondants aux ROIs représentées en jaune sur les images SHG $10\times$.

soient si ressemblants. Ce constat est confirmé par la figure 4.8c), où les reconstructions des acquisitions au $10\times$ en volume montrent une forte ressemblance avec les projections 2D.

Une fois les reconstructions des images $10\times$ effectuées, les scores sont donc calculés en partant d'un seuil t_r/r , où $t_{4\%} = 1024$ est le seuil utilisé pour $r = 4\%$.

La corrélation entre les scores a été quantifiée à la fois par le coefficient de corrélation de Pearson et le coefficient de corrélation de concordance ρ_L de Lin [Lin, 1989]; [Lin, 2000]. Sans rentrer dans les détails, le coefficient de corrélation de Pearson R mesure comment deux quantités

X et Y sont linéairement corrélées ($Y = aX + b + \epsilon$ où ϵ représente un bruit). En fait, plus les quantités X et Y sont liées entre elles linéairement, plus le coefficient de Pearson $|R|$ sera proche de l'unité, quelle que soit la pente a ou l'ordonnée à l'origine b . Le coefficient de corrélation de concordance de Lin ρ_L mesure si $X = Y + \epsilon$; ce qui correspond à une corrélation linéaire avec une pente de 1 et une ordonnée à l'origine nulle. Par conséquent, ρ_L sera plus adapté pour évaluer si deux scores sont égaux. Il peut également être montré que $\rho_L \leq |R|$, résultat intuitif en partant du principe qu'un mode de corrélation linéaire général (Pearson) offre plus de flexibilité pour corrélérer deux espèces qu'une condition beaucoup plus stricte, cherchant à corrélérer des données le long de la bissectrice de pente 1 passant par l'origine (Lin).

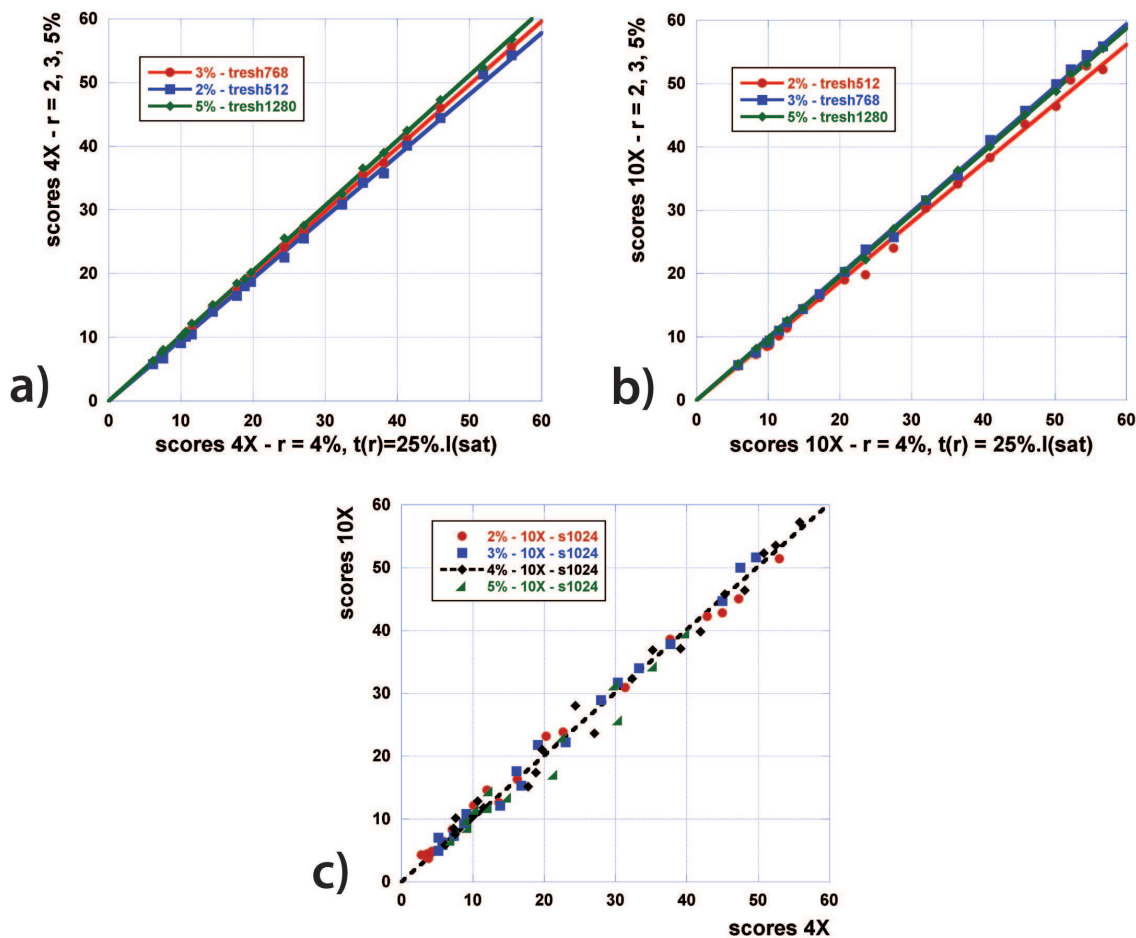


FIGURE 4.9 : Comparaison des scores obtenus à $r = 2, 3$ et 5% avec le score à 4% avec : a) l'objectif $4\times$; b) l'objectif $10\times$. c) Comparaison des scores $4\times$ et $10\times$ à 4%

Les figures 4.9a) et b) présentent les corrélations, pour un objectif donné, entre les scores obtenus pour $r = 4\%$ et ceux obtenus pour $r = 2, 3$ et 5% . Les valeurs expérimentales s'alignent bien le long de la bissectrice de pente 1 et passant par l'origine, indiquant clairement que les différents scores pour les couples r et t_r donnés sont très similaires. Les coefficients de R Pearson et ρ_L de Lin correspondants, donnés table 4.1.3, sont très proches de l'unité, indiquant une très

	r	2%	3%	4%	5%
	t_r	512	768	1024	1280
4×-4% vs 4×- r : a (pente)	.963	.994	-	1.02	
: R (Pearson)	.999	.999	-	.999	
: ρ_L (Lin)	.998	.999	-	.998	
10×-4% vs 10×- r : a	.936	.989	-	.980	
: R	.998	.999	-	.999	
: ρ_L	.990	.999	-	.999	
4×- r vs 10×- r : a	.990	.996	.992	.976	
: R	.997	.996	.993	.993	
: ρ_L	.997	.996	.993	.993	

TABLE 4.2 : Coefficients de corrélations entres scores suivants différentes méthodes : a est la pente donnée à partir d'un ajustement par régression linéaire $Y = a.X$; R est le coefficient de corrélation de Pearson ; ρ_L est le coefficient de corrélation de concordance de Lin [Lin, 1989].

forte concordance. Ces données confirment très clairement la validité du modèle de la méthode de score SHG.

La comparaison des données obtenues pour une valeur de r donnée avec les deux objectifs et pour une aire imagée identique (comme décrit précédemment) a également été effectuée, et la corrélation de ces données est montrée figure 4.9c). Encore une fois, les valeurs de scores obtenues à partir des objectifs $4 \times -NA0.1$ et $10 \times -NA0.25$ s'alignent le long de la bissectrice de pente 1 et passant par l'origine, et ce pour les quatre valeurs de r . Les coefficients de corrélation correspondant sont donnés table 4.1.3. Ce résultat montre que les scores sont identiques pour les deux objectifs, en dépit de la différence d'ouverture numérique, et donc des résolutions axiales ω_z et latérales ω_{xy} , aussi bien que du taux d'échantillonnage spatial respectivement (512 et 1300 pixels pour avoir la même échelle).

Nous avons ainsi démontré la légitimité et la robustesse de notre méthode de **Score SHG**. Nous pouvons désormais nous appliquer à déterminer les scores de biopsies à l'aiguille obtenues dans le cadre d'une collaboration avec le CHU de Ponchaillou à Rennes. Dans un premier temps, nous décrirons le protocole expérimental mis en place pour appliquer le scoring SHG à ces échantillons, puis le traitement d'image appliqué aux acquisitions TPEF et SHG sera décrit, les résultats obtenus seront comparés aux scores F-Métavir associés à chaque échantillon, puis nous les comparerons avec les différents tests et scores pré-existants.

Application de la méthode de score SHG à l'évaluation de la fibrose hépatique chez l'Homme

Il a été montré dans la partie précédente que la microscopie SHG permet d'obtenir un score répétable, fiable et robuste, du collagène fibrillaire dans le foie hépatique. Notre protocole expérimental d'imagerie est basé sur une combinaison bien choisie entre le niveau de gain g_r du détecteur, et un seuil t permettant de binariser l'image SHG issue de cette détection. Toutes les acquisitions réalisées pour cette étude respectent des conditions d'imagerie telles que l'intensité du signal de seconde harmonique émise par une zone saine de la MEC saine du foie égale 4% de la valeur maximale de la gamme d'intensité disponible. Avec cette sensibilité de détection, le seuil de binarisation des images SHG pour établir le score est de 25%. Cette combinaison acquisition/seuillage permet de s'affranchir de la contribution de la matrice extra-cellulaire "saine". Nous appliquons désormais cette méthode de scoring SHG en routine sur des coupes histologiques de biopsies hépatiques de $5\mu\text{m}$ d'épaisseur. Les différentes adaptations nécessaires à cette application sont discutées point par point. Enfin, cette méthode de scoring SHG est comparée avec un panel de méthodes pré-existantes, démontrant ainsi la validité et la pertinence de cette technique d'imagerie pour des applications biomédicales.

5.1 Scores SHG sur biopsies en coupes histologiques : application

Pour mettre en place notre méthode de scoring SHG en routine sur des biopsies hépatiques en vue d'une application biomédicale, nous avons développé un protocole d'acquisition puis de traitement d'images. Nous présentons dans cette partie la description de ce protocole et l'application de notre méthode de scoring SHG à l'étude d'une série de coupes histologiques de $5\mu m$, qui est l'épaisseur standard des coupes étudiées par les médecins anatomopathologistes lors de l'évaluation d'un stade de fibrose. Nous commençons par justifier le choix de l'objectif imageur utilisé pour cette application en termes de résolution et d'échantillonnage spatial. Nous présentons ensuite une étude de phototoxicité de l'excitation biphotonique au sein du foie humain en fonction de l'objectif utilisé. Les biopsies étant enrobées dans de la paraffine, et la paraffine émettant de la SHG, nous étudions son influence sur la méthode de scoring. Nous présentons enfin la méthode de traitement d'image qui nous permet de déterminer précisément les zones de l'image occupées par les biopsies, en utilisant l'acquisition TPEF pour ne finalement prendre en compte que la contribution du collagène fibrillaire au score SHG.

5.1.1 Protocole expérimental

Echantillons

La quarantaine d'échantillons de $5\mu m$ d'épaisseur mis à notre disposition par le département d'anatomie pathologique de l'hôpital Pontchaillou de RENNES ont tous une longueur de $20mm$ au minimum, cette longueur minimale étant recommandée pour être significative au niveau de l'échantillonnage en volume du foie. Cette série d'échantillons, vierge de tout marquage (rouge Sirius ou autre), provient de coupes histologiques sériées, c'est à dire que pour un seul prélèvement, plusieurs coupes sont réalisées, permettant d'effectuer plusieurs tests dans le but d'optimiser le diagnostic. Cette série de patients a été choisie car elle permettra de comparer les scores SHG avec toute une batterie d'autre mesures (Fibrotest, Fibroscan...). Précisons qu'il ne s'agit que d'une étude préliminaire qui devrait être complétée par l'étude d'une soixantaine d'autres patients, pour être plus significative du point de vue statistique.

Contrairement à l'étude ayant permis de valider notre méthode Score SHG sur des grandes pièces opératoires ($1cm^2$ environ), les biopsies en coupes histologiques sont bien plus petites, comme l'illustre la figure 5.1. Que l'on acquiert une image d'une biopsie à l'aiguille avec un objectif $4\times$ ou $10\times$, le champ de l'image ne couvre jamais tout l'échantillon. Ainsi, l'image SHG d'une biopsie en coupe histologique comporte une zone contenant une portion de biopsie, mais la majorité de l'image est occupée par de la paraffine, hors échantillon biologique.

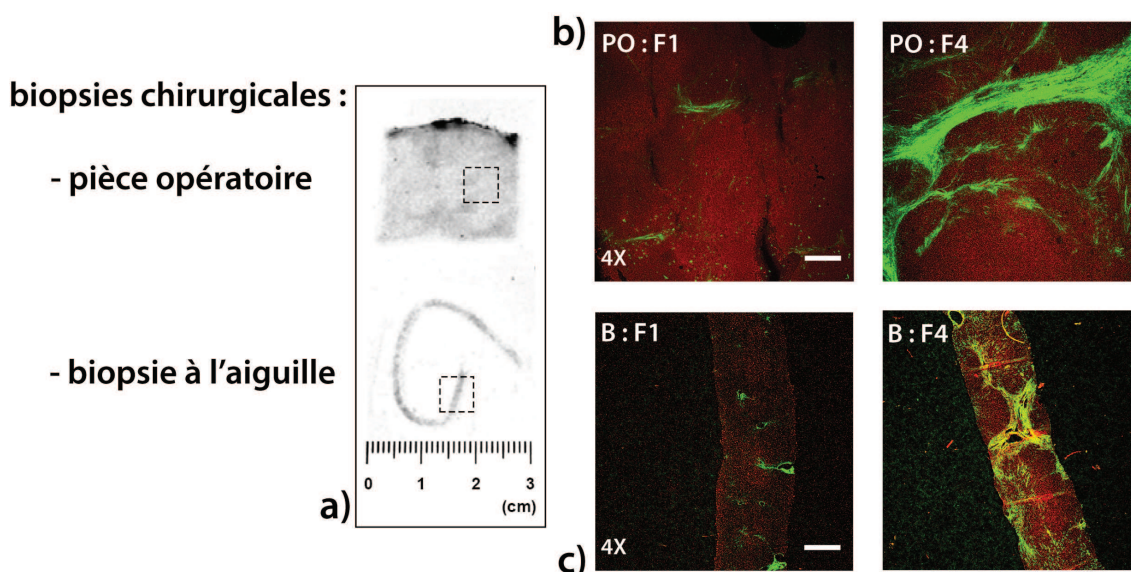


FIGURE 5.1 : a) Comparaison de biopsies chirurgicale et à l'aiguille. Les carrés en pointillés précise le champ imagé par un objectif $4\times$; b) Images RGB (TPEF en rouge et SHG en vert) de pièces opératoires (PO) aux stades F1 et F4 acquises avec un objectif $4\times$. c) Images RGB (TPEF en rouge et SHG en vert) de coupes histologiques de biopsies (B) à l'aiguille, stades F1 et F4 acquises avec un objectif $4\times$. Barres d'échelles b) et c) : $500\mu\text{m}$.

Choix de la résolution et de l'échantillonnage spatial pour le scoring SHG

Certaines équipes proposent d'effectuer un échantillonnage exhaustif de la matière biologique, en imageant le volume entier de l'échantillon avec une très forte résolution, c'est à dire avec des objectifs de fort NA ($NA > 1$). Le but est évidemment de collecter le maximum d'informations possible [Strupler, 2007] ; [Pena, 2007]. Ces approches très précises sont néanmoins coûteuses en temps d'acquisition, espace mémoire, temps de traitement d'image et d'exploitation des données. Si ces méthodes ont un potentiel pour apporter des réponses très fines aux problèmes, par exemple, de structuration du collagène dans la MEC et les agrégats fibrotiques à différents stades, il semble néanmoins qu'elles soient trop lourdes quand il ne s'agit que d'établir un score permettant de déterminer un volume de collagène dans une perspective de diagnostic. Evidemment, l'estimation du volume de collagène sera d'autant plus précise que l'échantillonnage sera précis, et ce volume sera précisément évalué que si l'on est capable de sonder tout l'organe. Or dans le cas de la biopsie du foie à l'aiguille, le volume de la biopsie est très faible par rapport à tout l'organe, et les fluctuations provenant de cet échantillonnage ont de toute façon de grandes chances d'être bien plus fortes que celles que l'on commettrait en utilisant une estimation un peu plus grossière de la quantité de collagène. Nous avons donc pris un parti résolument opposé à l'exhaustivité, en choisissant un sous échantillonnage spatial avec un objectif à faible NA , permettant d'une part d'intégrer sur l'épaisseur de la coupe histologique, et d'autre part d'avoir un large champ de vue. Nous avons ainsi souhaité avoir une procédure relativement simple, l'objectif étant d'être représentatif avec une incertitude raisonnable, sans pour autant être exhaustif.

Un calcul rapide permet de se rendre compte du gain de temps, et de place mémoire que permet l'utilisation d'un objectif à petite ouverture numérique. La simple comparaison des volumes sondés par trois objectifs $4\times$ NA=0.1, $10\times$ NA=0.25 et $60\times$ à immersion d'eau NA=1.2, permet de se faire une idée des facteurs multiplicatifs à appliquer pour comparer l'espace mémoire nécessaire, et le temps de réalisation des expériences pour l'échantillonnage d'un volume donné. Le calcul des volumes des PSF^2 des différents objectifs est réalisé à partir de la formule 1.2 présentée dans le chapitre 1 de ce manuscrit, et rappelée ici : $V_{obj} = \pi^{3/2} \omega_{xy}^2 \omega_z$. Le ratio $V_{4\times}/V_{10\times}$ est de l'ordre de 30, $V_{10\times}/V_{60\times}$ de l'ordre de 600 et enfin le ratio $V_{4\times}/V_{60\times}$ est de l'ordre de 15.000. Ces ordres de grandeur indiquent clairement que pour appliquer la méthode de scoring SHG, utiliser un objectif de grossissement supérieur à $4\times$ consiste en un travail exigeant en place mémoire et en temps. Dans notre application, les acquisitions d'images de biopsies en coupes histologiques sont donc réalisées avec l'objectif $4\times$. Nous rappelons qu'en plus de gain de temps et de place mémoire, nous pouvons ajouter le résultat obtenu dans le chapitre précédent, à savoir qu'un score réalisé avec l'objectif $4\times$ est absolument équivalent à un score obtenu au $10\times$.

Nous avons choisi d'utiliser l'objectif $4\times$ -NA 0.1, le champ de vue de cet objectif est suffisamment grand pour pouvoir couvrir toute une biopsie avec une dizaine d'images. De plus, cet objectif se caractérise par un profil axial $\omega_z \approx 60\mu m$ de la PSF qui intègre toute l'épaisseur des coupes histologiques. L'échantillonnage spatial est réalisé en 512×512 pixels par image. Ces dernières sont donc sous échantillonnées. En effet, pour exploiter au mieux la résolution du microscope, la taille d'un pixel, directement liée à l'échantillonnage spatial, doit être au maximum égale à la moitié du pouvoir de résolution conféré par l'ouverture numérique de l'objectif. Or, une image issue de l'objectif $4\times$ faisant $3.525mm$ de côté, pour 512 pixels on obtient une valeur de $6.88\mu m$ par pixel, ce qui est très supérieur au profil latéral de l'objectif $2\omega_{xy} \approx 4\mu m$. Nous avons fait ce choix en connaissance de cause, tout d'abord parce que la taille typique d'un agrégat de collagène est de l'ordre de quelques centaines de microns, mais aussi car nous souhaitons nous placer dans des conditions d'imagerie non idéale en vue d'extension des méthodes d'imagerie SHG à l'endoscopie, sachant que les endoscopes travaillent avec des images à faible résolution.

Maintenant que nous avons fixé nos conditions d'imagerie, il est intéressant de regarder comment se comportent nos échantillons soumis à une excitation biphotonique, en terme de photodégradation, en fonction des deux objectifs $4\times$ et $10\times$.

Photodégradation de l'excitation biphotonique sur le foie humain

Le dispositif mis en place pour vérifier la phototoxicité de l'excitation biphotonique en fonction de l'objectif utilisé est celui des conditions d'imagerie décrit précédemment. La stabilité de la puissance laser d'excitation ($620mW$ en sortie) est contrôlée tout au long de l'expérience par un puissance-mètre (Nova PD300, Ophir-Spiricon, UT, USA) relié à un ordinateur via le logiciel LabVIEW. La puissance en sortie des objectifs est de l'ordre de $100mW$ pour le $4\times$ NA0.1 et de $50mW$ pour le $10\times$ NA0.25. Dans l'approximation paraxiale, le volume sondé par les objectifs (pour $NA < 0.7$) et de l'ordre de $\Omega \approx NA^{-4}$, ce qui donne un ratio entre volumes

$\Omega_{4\times}/\Omega_{10\times} \approx 40$. Si on couple ce ratio à celui des puissances mesurées en sortie des objectifs, on constate que la puissance effective dans le volume sondé avec l'objectif 10 \times est environ 20 fois plus grande que celle dans le volume sondé par l'objectif 4 \times . Cette différence devrait se ressentir au niveau de la photodégradation induite par l'excitation biphotonique au travers de ces deux objectifs.

Le principe de cette expérience est d'observer l'évolution de l'intensité moyenne générée par le foie humain sur l'image globale (512 \times 512 pixels), ainsi que sur trois ROIs (80 \times 80 pixels) : deux zones de MEC saine (notées **MEC1** et **MEC2** sur la figure 5.2a)) et une zone fibrosée (notée **F** sur la figure 5.2a)). L'évolution de la valeur du score SHG pour ces quatre zones sondées est également contrôlée. Les acquisitions sont effectuées par série de 10, la dernière image de la série étant sauvegardée pour réaliser les différentes mesures. Les figures 5.2a)-b)-c) donnent les résultats de cette expérience.

On observe une décroissance générale de l'intensité TPEF, légèrement plus rapide pour l'objectif 10 \times que pour le 4 \times . Cette décroissance est très faible, atteignant $\approx 92\%$ de la valeur maximale pour l'objectif 10 \times et $\approx 95\%$ de la valeur maximale pour l'objectif 4 \times et ce, au bout de 300 passages du laser dans le plan image au sein de l'échantillon. Il ne se dégage pas de tendance particulière concernant le comportement de la décroissance de la TPEF générée par les zones saines ou fibrosées.

En ce qui concerne les intensités SHG moyennes, on ne constate pas de décroissance significative et ce, quelque soit la ROI considérée. Le phénomène de génération de seconde harmonique étant un processus de diffusion non linéaire, il est logique qu'il produise moins de changement au sein de l'échantillon que le processus d'émission de fluorescence excitée à deux photons qui lui, est produit par un phénomène d'absorption.

Enfin, les valeurs des scores SHG des différentes ROIs restent inchangées au cours des acquisitions d'images. Ce constat est en accord avec celui réalisé précédemment, concernant l'intensité moyenne SHG qui ne varie pas non plus.

Le protocole d'acquisition des images SHG/TPEF étant désormais bien défini et détaillé, nous présentons à présent l'étude sur la présence de paraffine dans nos échantillons, qui est couplée avec une étude sur l'influence de l'épaisseur des échantillons.

Contribution de la paraffine au scoring SHG

L'image SHG d'une biopsie en coupe histologique comporte une zone contenant une portion de biopsie, mais la majorité de l'image est occupée par de la paraffine, hors échantillon biologique. On peut alors se poser la question de la présence de la paraffine au sein même de l'échantillon, ce qui pourrait impliquer une contribution SHG parasite. Pour confirmer ou infirmer la présence de paraffine dans les échantillons, nous avons effectué une étude de spectroscopie Raman. De plus, l'influence de cette paraffine varie en fonction de son épaisseur de dépôt. Une étude de l'émission de SHG en fonction de l'épaisseur de la couche de paraffine a donc été menée.

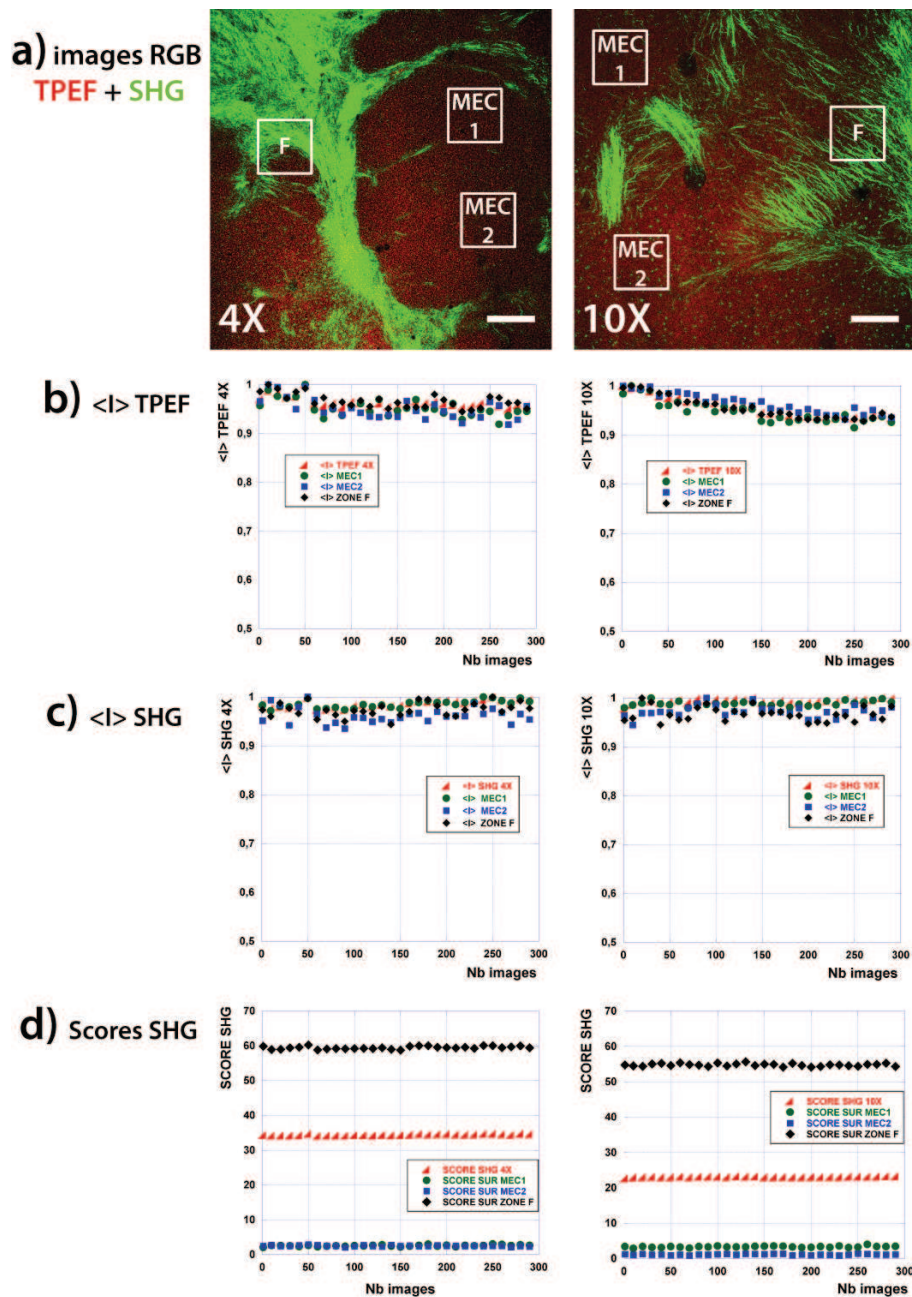


FIGURE 5.2 : Evolution des intensités TPEF/SHG générées par le foie humain en fonction du nombre d'acquisition. **a)** Images RGB 4 \times (en haut - barre d'échelle 500 μ m) et 10 \times (en bas - barre d'échelle 180 μ m) TPEF et SHG des différentes zones d'intérêts dont les intensités moyennes sont mesurées. **b)** évolution des intensités TPEF moyennes en fonction du nombre d'acquisition à l'objectif 4 \times en haut et à l'objectif 10 \times en bas. **c)** évolution des intensités SHG moyennes en fonction du nombre d'acquisition à l'objectif 4 \times en haut et à l'objectif 10 \times en bas. **d)** évolution de la valeur du score SHG des différentes ROI en fonction du nombre d'acquisition à l'objectif 4 \times en haut et à l'objectif 10 \times en bas. **NB :** l'ordonnée des courbes **b)** et **c)** varie entre 0.5 et 1, les intensités étant normalisée.

Spectroscopie Raman d'une biopsie chirurgicale de foie humain

La première étude de spectroscopie Raman concerne un simple dépôt de paraffine de $15\mu\text{m}$ d'épaisseur sur une lame de microscope. Une présentation très succincte de la spectroscopie Raman est donnée en annexe B.

Le spectre de la paraffine est obtenu par soustraction de la contribution du signal de la lame de microscope. Un premier spectre est acquis en focalisant le faisceau sur la lame (figure 5.3(A)), puis un second en focalisant sur la paraffine (figure 5.3(B)). La soustraction de la contribution de la lame à celle de la paraffine sur lame permet d'obtenir le spectre Raman de la paraffine (figure 5.3(C)).

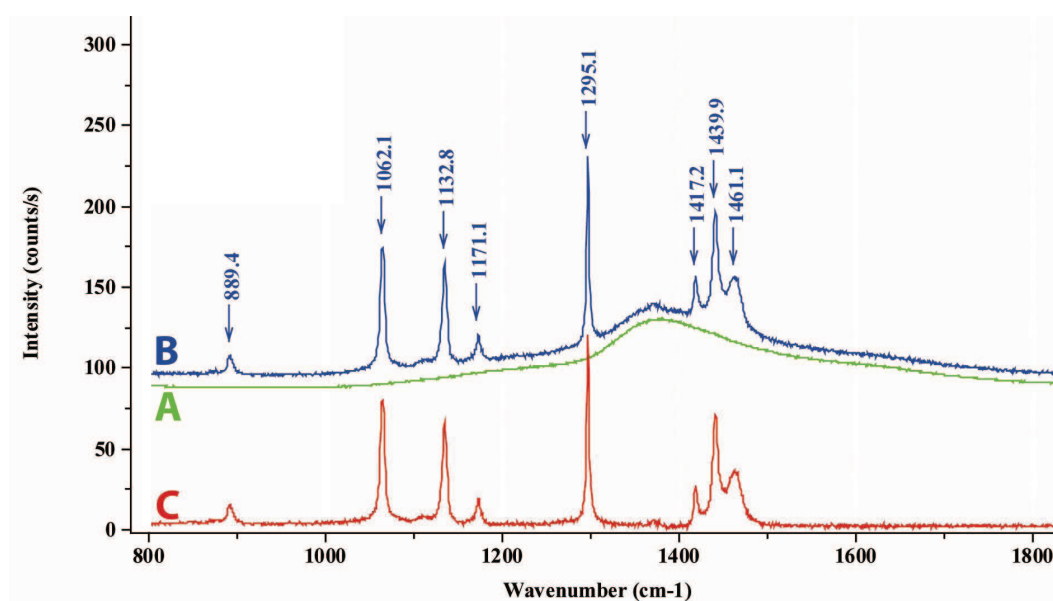


FIGURE 5.3 : Spectres Raman d'une lame de microscope (A), de la paraffine déposée sur une lame (B) et enfin, de la soustraction des deux pour ne garder que la signature de la paraffine (C). Objectif $100\times -NA0.75$.

Les raies observées sont en accord avec celles trouvées dans la littérature [Vrabie, 2007] ; [Gobinet, 2008].

Dans un second temps, une étude de spectroscopie Raman d'une coupe histologique de biopsie de foie humain de $50\mu\text{m}$ d'épaisseur a été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment, en prenant soin de focaliser l'excitation au milieu de l'échantillon. Le spectre résultant fait apparaître trois composantes distinctes (figure 5.4) : un fond de fluorescence, la signature de la paraffine, ainsi que des pics de plus faibles intensités ne correspondant pas à la signature Raman de la paraffine.

Ce spectre est représenté avec celui de la paraffine, offrant ainsi la possibilité de détecter des pics issus de la biopsie de foie (figure 5.4).

Les contributions observables à 1002cm^{-1} et 1657cm^{-1} , sont généralement attribuées à la phény-

lalanine (acide aminé) et aux groupements des amides *I* (dérivé d'un acide carboxylique) [Meade, 2005]. En regardant plus finement, on peut noter la présence de pics de plus faibles intensités à 1233cm^{-1} , 1339cm^{-1} et 1368cm^{-1} qui pourraient-étre attribués au groupement des amides *III*, à de l'adénine et au groupement CH_3 respectivement [Abubaker, 2008] ; [Lo, 2010]. De nombreux travaux portent sur l'étude par spectroscopie Raman de l'évolution de la matière biologique en fonction d'un paramètre extérieur (agent pathogène, etc...). [Vrabie, 2007] *et al.* ont montré qu'il est possible de remonter aux informations de signature de la matière biologique par des techniques de traitement numérique. Il n'est pas nécessaire d'aller aussi loin pour notre étude, le spectre 5.4 comportant suffisamment d'informations.

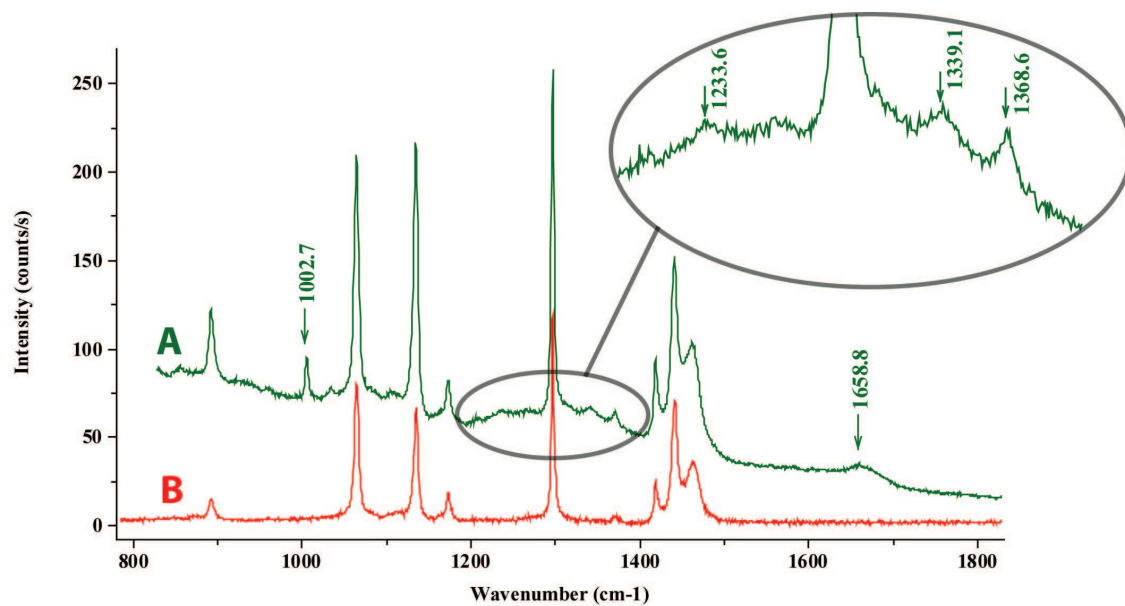


FIGURE 5.4 : Spectre Raman d'une coupe histologique de $50\mu\text{m}$ d'épaisseur issue d'une biopsie de foie, enrobée dans de la paraffine : spectre (A). Le spectre de la paraffine ne noie pas entièrement la signal émis par la matière biologique (raies pointées). Le spectre de référence de la paraffine est rappelé en (B).

Nous avons pu observer que la signature Raman d'une coupe histologique non marquée est fortement perturbée par la contribution de la paraffine, y compris en mode confocal, avec une résolution axiale de l'ordre de $2\mu\text{m}$. La paraffine est donc bien présente dans tout l'échantillon. La technique de score SHG développée doit donc tenir compte de cette contribution, et l'éliminer drastiquement.

La paraffine émet un signal SHG relativement faible comparé à celui émit par le collagène fibrillaire et ce, à puissances laser égales. Cependant, cette contribution peut varier en fonction de l'épaisseur de l'échantillon considéré. Il convient donc de quantifier ce signal pour pouvoir en tenir compte, ou au mieux, s'en affranchir, tout en gardant à l'esprit que cette contribution est appelée à évoluer selon l'épaisseur de l'échantillon.

SHG de la paraffine

En fonction de l'épaisseur de la biopsie, 5, 15 ou 50 μm , il faut en premier lieu adapter le gain g_r du PM pour toujours garder un niveau d'intensité de référence à $r = 4\%$ de signal SHG généré par la MEC saine.

Il convient ensuite de caractériser le signal SHG susceptible d'être généré par la paraffine. En effet, comme il est confirmé dans l'étude Raman présentée précédemment 5.1.1, il y a de la paraffine dans tout l'échantillon étudié. Or, les molécules de paraffine, après avoir été chauffées suffisamment, s'organisent de manière quasi-cristalline et cet arrangement est source de SHG sous excitation multiphotonique. Il convient donc de quantifier ce signal parasite pour le corriger ou mieux, s'en affranchir complètement, et ainsi ne considérer que le signal émis par le collagène fibrillaire.

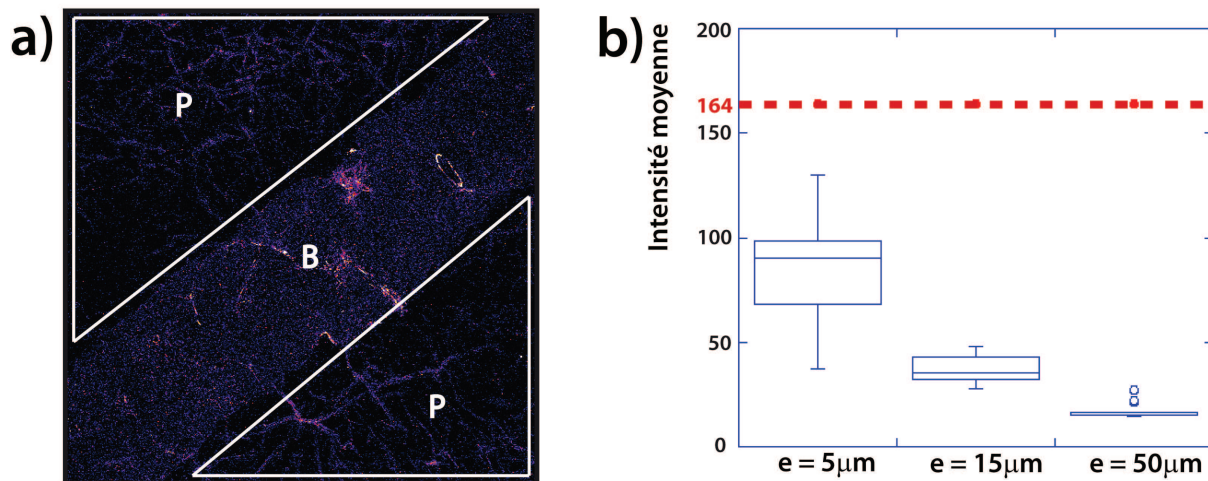


FIGURE 5.5 : **a)** Image SHG type d'une biopsie de 5 μm d'épaisseur. Les lettres P et B indiquent respectivement les zones où il n'y a que de la paraffine et celle où se situe la biopsie. **b)** Représentation de type boîtes à moustaches de la dispersion des valeurs d'intensité SHG moyenne générée par la paraffine selon l'épaisseur des coupes histologiques. La barre en pointillés à 164 représente le seuil à partir duquel les pixels sont comptés dans le score.

La figure 5.5b) montre la dispersion des intensités SHG moyennes générées par la paraffine, par ROIs de 50 \times 50 pixels, en fonction de l'épaisseur des coupes histologiques. Les différences observées entre les valeurs d'intensités SHG en fonction des épaisseur viennent du fait que la valeur de gain g augmente avec la diminution de l'épaisseur de l'échantillon, comme nous l'avons montré lors de l'étape de validation de la méthode de Scores SHG (en particulier figure 4.6). De ce fait, les échantillons fins sont les plus susceptibles de générer un signal SHG de type "bruit". Néanmoins, comme le montre la barre à 164 représentant le seuil à partir duquel les intensités sont considérées dans le score SHG (figure 5.5b)), les contributions de la paraffine (toujours en valeurs moyennes) seront seuillées et ne participeront que de manière marginale au score. En revanche, localement, la paraffine peut générer un signal SHG dont l'intensité se situe au dessus

du seuil. Une méthode équivalente à celle présentée précédemment a été mise en œuvre pour évaluer le score de cette paraffine seule, et ce pour des coupes histologiques de 5, 15 et 50 μm . Les conditions d'imagerie respectent le couple gain du PM g_r - intensité moyenne de la MEC de la biopsie à $r = 4\%$ de la gamme d'intensité totale. Ces résultats montrent que le score SHG moyen de la paraffine est proche de 2% pour une coupe de 5 μm , 1% pour une coupe de 15 μm et enfin 0.5% pour une coupe de 50 μm . Ces contributions sont négligeables, d'autant plus qu'elles ne concernent que la génération de seconde harmonique de la paraffine seule.

La paraffine génère un signal SHG qui n'est pas suffisamment important pour contribuer de manière significative au score SHG. Pour conclure cette partie sur la mise en œuvre du protocole expérimental nécessaire à l'adaptation d'une méthode de score SHG pour une application biomédicale, nous présentons à présent le traitement appliqué aux images SHG/TPEF permettant d'établir le score SHG.

5.1.2 Etablissement du score SHG

Comme nous l'avons évoqué plus tôt dans cette partie, une image acquise à l'objectif 4 \times d'une biopsie en coupe histologique comporte une partie d'image de matière biologique (la biopsie), mais la majorité de l'image est occupée par de la paraffine. Cette particularité est bien visible figure 5.5a). Il faut donc envisager un traitement d'image capable de sélectionner automatiquement et sans erreur la biopsie seule.

Pour cela, le double contraste TPEF/SHG disponible en microscopie multiphotonique est un atout majeur. En effet, le foie étant constitué de nombreux fluorophores endogènes, il est possible d'obtenir une image de fluorescence de la biopsie, couplée à une image SHG du collagène fibrillaire potentiellement présent dans la biopsie, comme on peut le voir sur la figure 5.1c). Ces deux images sont totalement découplées car, bien qu'elles collectent une information sur la même zone d'intérêt et en même temps, les deux modes de collection TPEF et SHG sont intrinsèquement séparés. Ainsi, en appliquant une forte sensibilité sur le détecteur de la voie TPEF, il est possible d'obtenir une image de fluorescence saturée du profil spatial de la biopsie, et l'utiliser ensuite pour réaliser un masque auquel il est possible de superposer une image SHG, comme l'illustre la figure 5.6.

L'objectif 4 \times -NA0.1 utilisé ayant une résolution axiale $\omega_z \approx 60\mu m$, le volume sondé augmente avec l'épaisseur de l'échantillon, donc plus il y a de fluorescence générée. Concrètement, les coupes histologiques de 15 et 50 μm d'épaisseur génèrent suffisamment de fluorescence pour pouvoir saturer la voie TPEF sans problème. Les coupes histologiques de 5 μm sont en revanche trop fines pour saturer la détection de la TPEF, c'est le traitement d'image, en particulier le seuillage de l'image, qu'il faut alors optimiser pour obtenir un masque TPEF.

Le traitement d'image permettant d'obtenir le score SHG correspondant à l'échantillon est réalisé avec ImageJ [W. Rasband, National Institute of Health, USA], à partir de couples d'images TPEF/SHG, sauvegardées au format *.tif, sans compression.

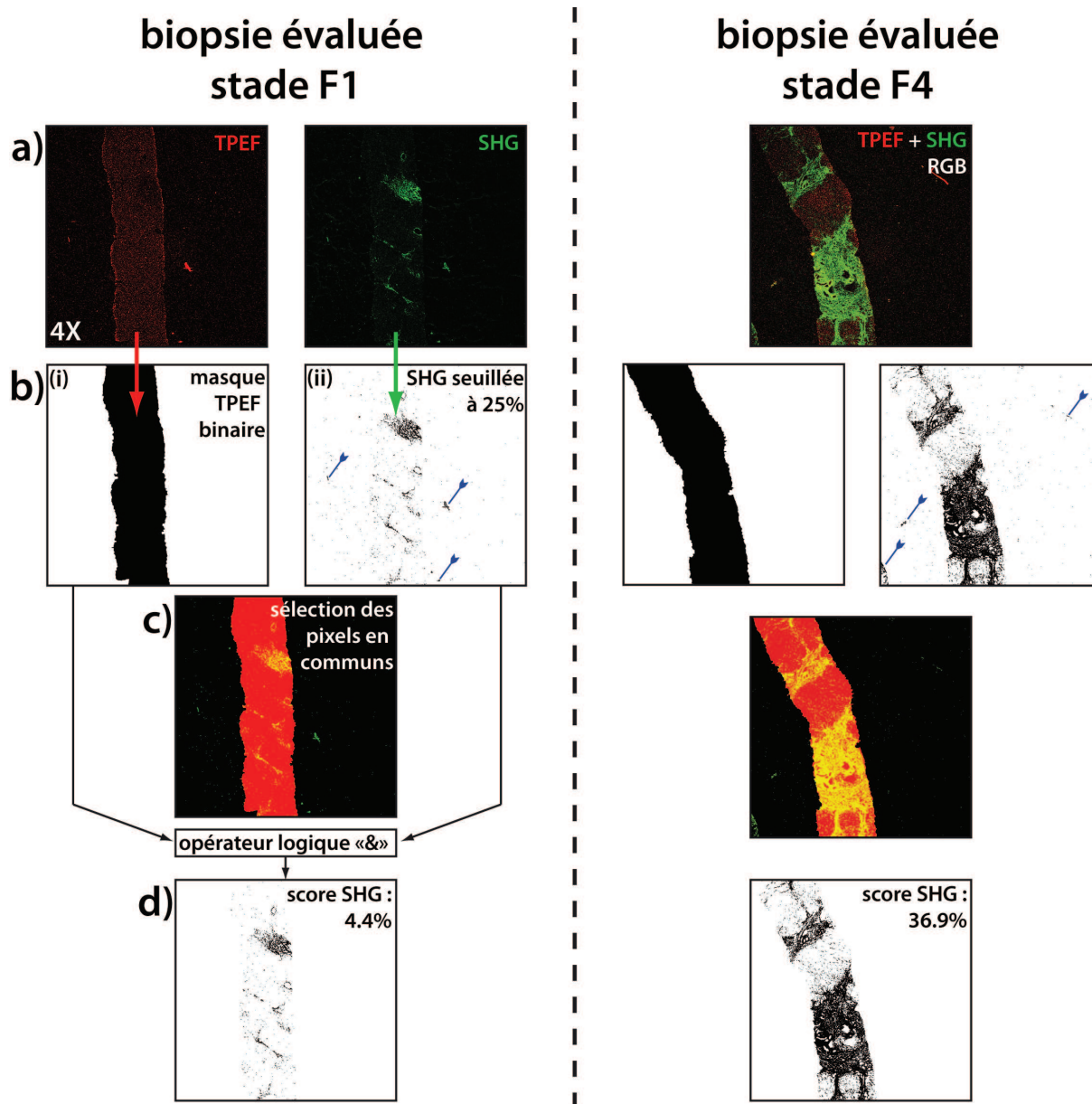


FIGURE 5.6 : Illustration étape par étape du traitement numérique réalisé sur les couples d'images TPEF/SHG de biopsies hépatique en coupes histologiques. **a)** Images TPEF et SHG (fausses couleurs), objectif 4×-NA0.1, échelle plein champ $\approx 3.5\text{mm}$. **b)(i)** : masque binaire obtenue à partir de l'image TPEF brute par filtrage, augmentation du contraste puis seuillage et binarisation ; **b)(ii)** : image SHG seuillée à 25% de la gamme totale d'intensité. Les flèches inversées indiquent les artefacts de signaux générés hors de la biopsie. **c)** Image RGB composée des deux images de b). Les pixels utiles au score SHG, communs aux deux images apparaissent en jaune. **d)** Image SHG seuillée et masquée par l'image b)-gauche. Le score SHG est calculé par le ratio entre le nombre de pixel SHG contenu dans le masque TPEF, dont l'intensité SHG est supérieure au seuil de 25%, sur le nombre total de pixels à 1 du masque TPEF.

La macro ainsi développée, et dont le code complet et commenté est donné en annexe C, se décompose en trois parties distinctes :

1. Dans un premier temps, l'image TPEF est traitée pour obtenir un masque binaire délimitant la biopsie de la paraffine. Pour cela, il faut jouer sur le couple contraste/seuil de l'image, pour distinguer le mieux possible la biopsie pour pouvoir binariser l'image. Dans le but d'éliminer tout artefact de fluorescence ne concernant pas la biopsie, comme de la matière générant de la fluorescence hors de la biopsie (cheveux, poil...), une analyse est effectuée pour compter le nombre d'objets binaires présent sur l'image. S'il y a plusieurs objets détectés, seuls ceux qui ont une surface plus grande qu'une valeur donnée et correspondant à la biopsie sont conservés, les autres étant supprimés. Enfin, ce masque est sauvegardé au format *tif* et la surface image de la biopsie est calculée pour évaluer le score SHG de cette portion de biopsie, soit N_{α}^{TPEF} , pour l'image α .
2. Le minimum de traitement est effectué sur l'image SHG, cette image étant porteuse de l'information utile au score SHG. Une seule étape de seuillage (toujours à $t_4\%$) avec binarisation est réalisée. Une opération booléenne est alors réalisée à partir du masque TPEF représentant la surface de la biopsie et l'image SHG seuillée. Cette opération, un *ET logique*, consiste à créer une troisième image, où les pixels mis à 1 seront ceux présents à la fois sur le masque TPEF et sur l'image SHG seuillée, aux mêmes coordonnées spatiales. Il en résulte une image binaire, où les pixels à 1 sont dénombrés pour calculer le score de cette portion de biopsie, soit N_{α}^{SHG} , pour l'image α .
3. Enfin, les étapes **2** et **3** sont automatiquement réitérées pour toutes les portions d'une même biopsie, en général, une dizaine d'images. Il en résulte un score SHG global pour une biopsie donnée composée de n images :

$$S_{SHG} = \frac{\sum_{\alpha=1}^n N_{\alpha}^{SHG}}{\sum_{\alpha=1}^n N_{\alpha}^{TPEF}}$$

où $\sum_{\alpha=1}^n N_{\alpha}^{SHG}$ représente le nombre de pixels constituant le collagène fibrotique, et $\sum_{\alpha=1}^n N_{\alpha}^{TPEF}$ est la surface totale de la biopsie.

5.1.3 Résultats et discussion

Notre méthode de scoring SHG a été appliquée à une cohorte de 119 patients, étude qui a été réalisée au cours de la thèse de Luc GAILHOUSTE [Gailhouste, 2009(thèse)]. Ces résultats sont présentés figure 5.7 par un graphique de type boîte à moustaches. Les scores sont regroupés en fonction des stades Métavir [The METAVIR cooperative group, 1993] qui ont été attribués à ces patients au cours du diagnostic clinique réalisé en amont de notre étude.

Ces résultats montrent une bonne corrélation entre les scores SHG et la lecture Métavir de ces mêmes échantillons, avec un coefficient de corrélation de Spearman $\rho = 0.75$, méthode qui consiste à trouver un coefficient de corrélation, non pas entre les valeurs prises par deux variables

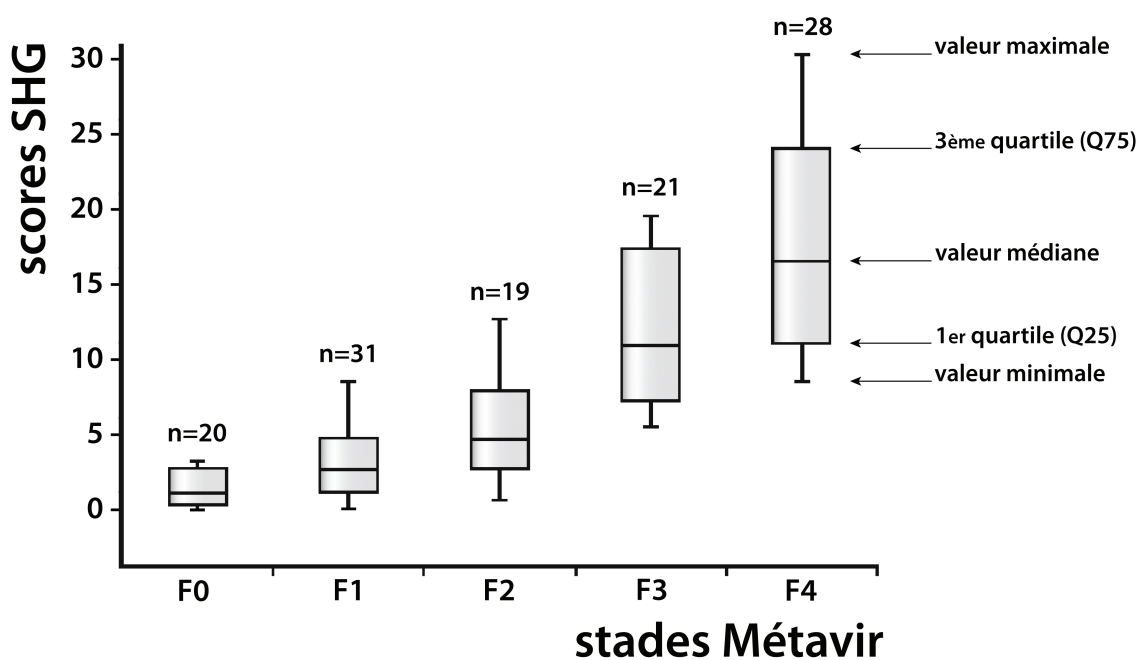


FIGURE 5.7 : Graphique de type "boîte à moustache", regroupant par stade Métavir les scores SHG de 119 coupes histologiques de $15\mu\text{m}$. Les boîtes se composent de quatre quartiles, chaque quartile comprenant un quart des valeurs. Les scores SHG ne présentent pas une progression linéaire en fonction des stades Métavir, mais exponentielle.

mais entre les rangs de ces valeurs.

Une autre façon de représenter ces résultats est de regrouper les valeurs de scores en tenant compte du fait qu'aux stades F0 et F1, le foie est considéré comme sain, et qu'à partir du stade F2, la fibrose est significative. Les mêmes données sont donc représentées non plus en cinq stades distincts, mais en deux, F0-F1 et F2-F3-F4, comme le montre la figure 5.8a).

La répartition du nombre d'échantillons entre les groupes F0-F1 et F2-F4 est équilibrée, environ 50% de chaque côté. Les deux groupes sont séparés distinctement, laissant envisager la possibilité d'établir un seuil qui permettrait de distinguer le mieux possible ces deux groupes. C'est ce que se propose d'évaluer la courbe ROC - et la valeur AUROC qui lui est associée - qui est une méthode d'analyse biostatistique très répandue pour évaluer un modèle de prédiction face à un modèle de référence, en fonction d'un seuil s . A partir de ce seuil s , un cas est classé Vrai si sa valeur est au dessus de s , en dessous de ce seuil, le cas sera classé Faux [Fawcett, 2006].

Introduction à l'analyse ROC/AUROC

Cette méthode d'analyse est basée sur l'évaluation de deux populations M (Malade) et NM (Non Malade), en fonction d'un seuil qui sépare ces deux populations en quatre catégories (table 5.1.3) :

- **VP**, pour Vrai Positif : $VP = Prob(s(+)) / M$: probabilité de classer un cas positif (au

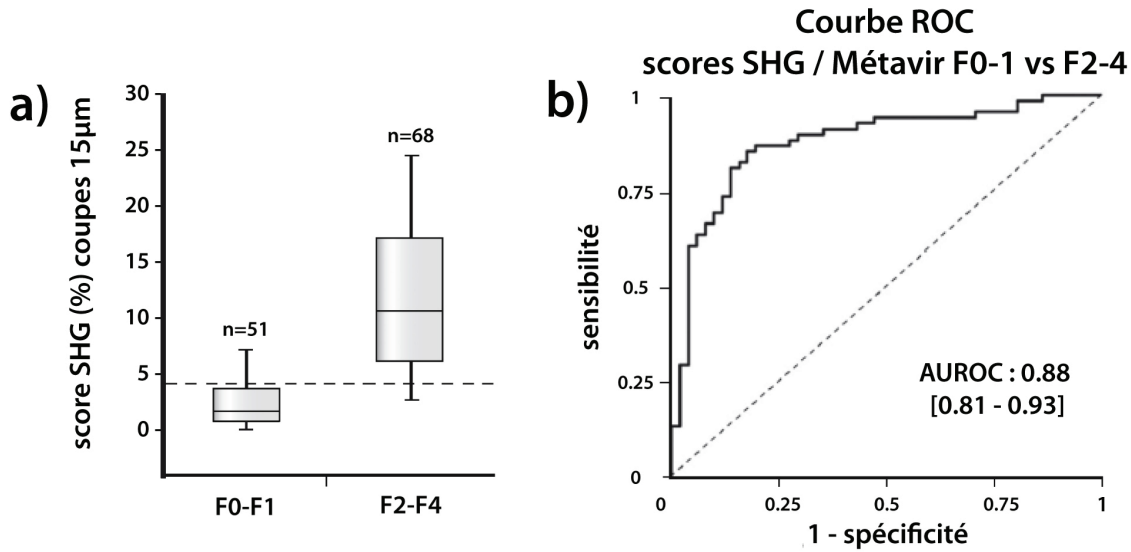


FIGURE 5.8 : Scores SHG de 115 coupes histologiques de $15\mu\text{m}$ d'épaisseur. **a)** Mêmes scores que 5.7 regroupés en deux catégories : F0-F1 et F2-F4. **b)** Courbe ROC de discrimination entre les stades avancés de fibrose (F2-F4) et les stades peu évolués (F0-F1) du score SHG appliqué aux coupes histologiques de $15\mu\text{m}$. L'aire sous la courbe ROC est de 0.88, intervalle de confiance à 95% : [0.81 – 0.93].

dessus du seuil s), sachant la maladie présente (M) ;

- **FN**, pour Faux Négatif : $FN = Prob(s(-) / M)$: probabilité de classer un cas négatif (en dessous du seuil s), sachant la maladie présente (M) ;
- **FP**, pour Faux Positif : $FP = Prob(s(+) / NM)$: probabilité de classer un cas positif, sachant qu'il n'y a pas de maladie (NM) ;
- **VN**, pour Vrai Négatif : $VN = Prob(s(-) / NM)$: probabilité de classer un cas négatif, sachant qu'il n'y a pas de maladie (NM).

Bien entendu, les composantes VN et VP constituent un modèle de prédiction juste en fonction du seuil s , tandis que les composantes FP et FN invalident le modèle (5.1.3a). A partir de là, on définit deux variables :

- la **sensibilité** Se , qui est la probabilité de prédire un cas positif (au dessus du seuil s) pour une maladie présente ($Se = VP$). Dans le cas idéal, $Se = 0$ pour tous les patients non malades, et vaut 1 pour tous les patients malades.

- la **spécificité** Sp , qui est la probabilité de prédire un cas négatif (en dessous du seuil s) en l'absence de maladie ($Sp = VN$). Dans le cas idéal, $Sp = 1$ pour tous les patients non malades, et vaut 0 pour tout les patients malades.

La courbe ROC trace la probabilité de prédire un Vrai Positif (soit la sensibilité), en fonction de la probabilité de prédire un Faux Positif (soit $1 - Sp$), le tout en fonction du seuil s à partir duquel un cas sera classé positif ou négatif (figure 5.9a). L'aire sous la courbe ROC représente la probabilité qu'un score tiré au hasard dans la population Malade, soit supérieur à un score tiré au hasard également dans la population Non Malade. C'est l'*AUROC* (*Area Under ROC*). Evidemment, plus l'*AUROC* a une valeur proche de 1, plus la méthode évaluée est efficace. Re-

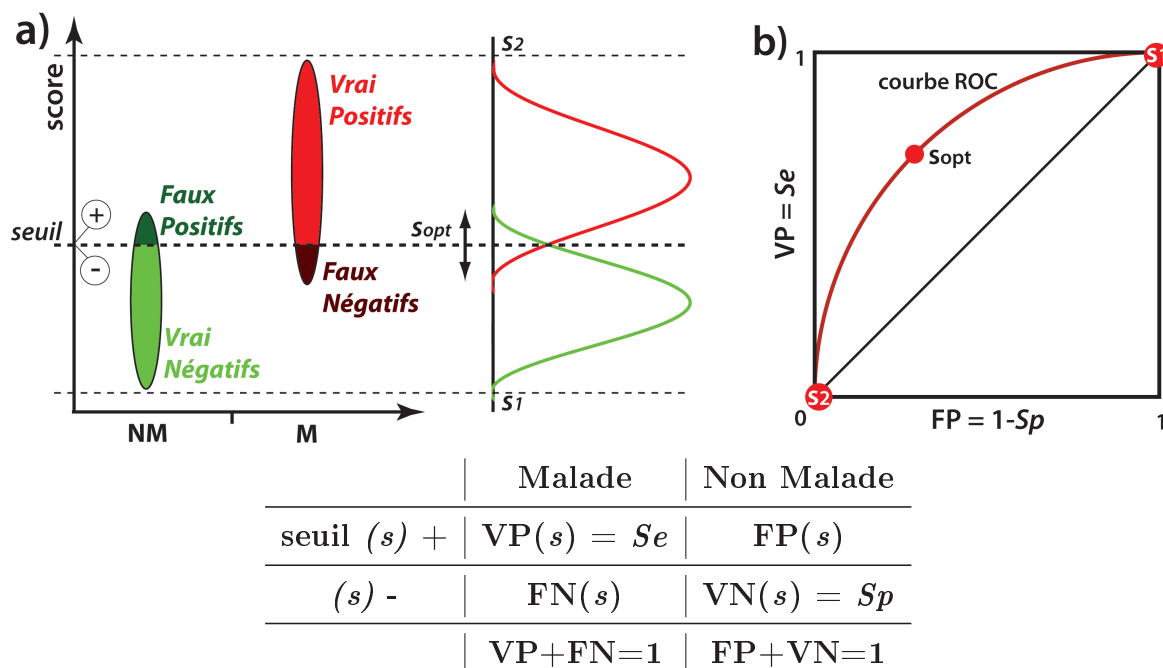


FIGURE 5.9 : a) Représentation de la dispersion des valeurs de scores de deux populations, Malades et Non Malades. Le seuil définit la valeur du score qui sépare les jugements de l'évaluation Malade (s(+)) et Non Malade (s(-)). Dans le cas S_1 , les deux populations sont évaluées (+), $FP = 1$ pour tous les NM, et $VP = 1$ pour tous les M. Pour le seuil S_2 , les deux populations sont évaluées (-), $VN = 1$ pour tous les NM, et $FN = 1$ pour tous les M. Le seuil S_{opt} pose le meilleur compromis entre le nombre de FP et de FN. b) Exemple de courbe ROC présentant Se en fonction de $1 - Sp$. Les points correspondant aux seuils S_1 , S_2 et S_{opt} sont donnés. L'AUROC associée à cette courbe ROC est l'aire sous la courbe. La bissectrice représente une AUROC de 0.5, correspondant à un classement aléatoire. **table)** Tableau récapitulatif des différentes catégories de classement possible. Pour la population Malade M, la somme des probabilités de classer un cas VP ou FN est égale à 1. Idem pour la population Non Malade NM, la somme des probabilités de classer un cas FP ou VN est égale à 1.

marquons que dans le cas où l'AUROC = 0.5 (symbolisée par la bissectrice, figure (5.9b), la méthode prédit un classement aléatoire, le modèle de prédiction ne sert donc à rien.

La figure 5.8 présente la courbe ROC évaluant le modèle de prédiction fourni par les scores SHG des coupes histologiques de $15\mu m$, la référence pour cette évaluation étant la classification Métavir pré-établie. L'AUROC est de 0.88, avec un intervalle de confiance à 95% de [0.81 – 0.93], et ce pour la discrimination entre les stades F0-F1 et F2-F4. Ce bon résultat permet d'envisager sérieusement d'approfondir cette étude pour permettre d'aider les médecins au diagnostic de la fibrose du foie.

Cette étude démontre que la microscopie de seconde harmonique est un outil de choix pour l'évaluation précise du stade d'évolution de la fibrose hépatique chez l'Homme. Il est fort probable

que cette technologie soit appliquée dans un contexte médical, en micro-endoscopie par exemple, dans un futur proche.

5.2 La microscopie SHG comme outil de diagnostic biomédical ?

Si un médecin soupçonne la présence d'une fibrose du foie chez un patient, les premiers tests effectués sont non invasifs - tests sériques (Fibrotest, Fibromètre...) et élastométriques (Fibroscan...). Si les résultats issus de ces différents tests ne sont pas significatifs, ou s'ils sont discordants, la décision de réaliser une biopsie hépatique peut-être prise, si les conditions le permettent. De cette biopsie est prélevée une coupe histologique de $5\mu m$ d'épaisseur, qui est colorée au rouge Sirius (ou autres colorants), puis un score Métavir est établi par un médecin anatomopathologiste par étude de la coupe avec un microscope en champ large. Ce score Métavir est la référence actuelle pour diagnostiquer le stade de la fibrose chez un patient.

Nous nous sommes alors posé plusieurs questions concernant à la fois l'apport des images SHG et la concordance de notre scoring SHG avec d'autres scoring : (i) *Quel est l'influence du biais d'échantillonnage entre deux coupes histologiques différentes issues de la même biopsie ?* Nous comparons les résultats des scores SHG présentés précédemment, réalisés à partir de coupes de $15\mu m$ avec des scores SHG obtenus à partir de coupes de $5\mu m$, issues du même échantillon. (ii) *Un médecin est-il capable d'évaluer un stade Métavir à partir d'images SHG de coupes histologiques ?* Nous nous intéresserons donc à la concordance entre scores Métavir établis à partir de différentes images. (iii) *Comment notre score SHG se situe par rapport à une méthode de référence comme l'histomorphométrie ?* La méthode d'histomorphométrie développée à Angers par l'équipe de Paul CALÈS quantifie la fibrose hépatique par un score en exploitant une classification couleur à partir d'images de coupes histologiques ayant préalablement été marquées avec un colorant (le rouge Sirius) qui contraste le collagène. Nous discuterons des différences observées entre cette méthode et la SHG, du point de vue des scores et des structures observables de collagène. Enfin, nous corrèlerons les scores SHG de coupes de $5\mu m$ d'épaisseur avec différents marqueurs non invasifs de la fibrose hépatique, directs et indirects, ainsi que différents scores combinant, entres autres, plusieurs paramètres morphologiques et/ou sanguins.

Cette étude préliminaire a été réalisée par la sélection de 41 biopsies dans une cohorte de patients où l'on disposait des résultats des tests non invasifs que nous souhaitons étudier, à savoir les Fibrotest, Fibromètre, Fibroscan et l'acide hyaluronique. Seules les biopsies de plus de $20mm$ de longueurs ont été retenues. Les scores Métavir de ces patients avaient déjà été établis par une lecture "au fil de l'eau". De cette série de biopsies a été réalisé une nouvelle série de coupes histologiques de $5\mu m$, l'épaisseur standard utilisée pour les études de microscopie. Ces coupes ont été imagées par SHG et les scores SHG établis. Puis cette même série de coupes a été marquée au rouge Sirius et envoyée dans l'équipe de P. CALÈS pour réaliser l'acquisition d'images couleurs de ces biopsies marquées, et le traitement d'histomorphométrie (HM) permettant d'établir le scoring HM.

Nous présentons dans cette partie les résultats préliminaires des corrélations croisées entres ces différentes évaluations de la fibrose. Nous insistons sur le fait que tous les résultats ont été obtenus à partir des mêmes coupes histologiques.

5.2.1 Comparaison de scores SHG de coupes issues de la même biopsie

La série de 41 échantillons non marqués de $5\mu m$ que nous avons à notre disposition est issue des mêmes biopsies que les coupes histologiques de $15\mu m$ utilisées lors de la thèse de Luc GAILHOUSTE, et dont nous avons présenté les scores SHG dans la section 5.1.3. Les scores que nous avons réalisés sur cette série de $5\mu m$ peuvent donc être comparés avec ceux obtenu par Luc GAILHOUSTE au cours de sa thèse, avec la même technique. Le premier résultat est une corrélation entre patients répartis en deux groupes F0-F1 et F2-F4, figure 5.10.

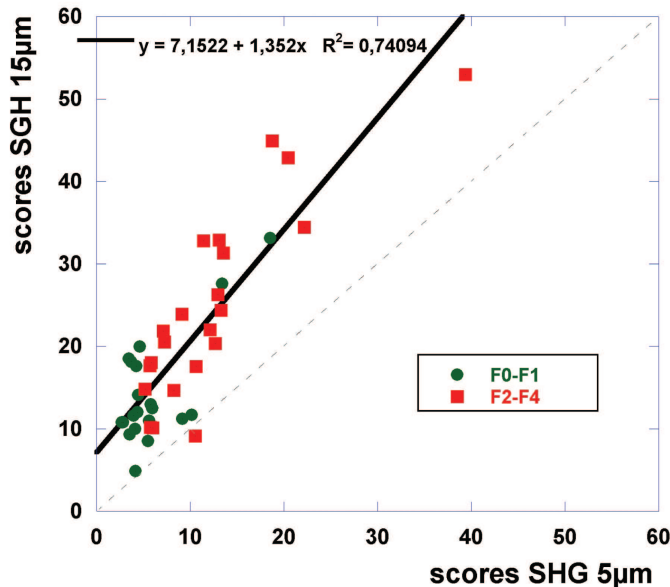


FIGURE 5.10 : Corrélation entre les scores SHG établis sur la même biopsie à des niveaux de coupes différentes, et avec une épaisseur différente, 5 et $15\mu m$.

On peut tirer plusieurs remarques de cette comparaison. Le coefficient $R^2 = 0.74$ indique une corrélation correcte entre ces deux scores. Le fait que le niveau des scores SHG des coupes histologiques de $15\mu m$ soient plus forts que ceux obtenus sur les coupes de $5\mu m$ s'explique par la différence d'épaisseur entre les deux séries (du simple au triple). On peut également noter que la pente de la fonction d'ajustement linéaire de ces données prend la valeur 1.3. On pouvait s'attendre à ce que cette pente soit proche de l'unité. Cet écart s'explique par le biais d'échantillonnage, qui à ces niveaux de coupes n'est pas négligeable. Les deux groupes F0-F1 et F2-F4 restent séparés de manière convenable par les deux scoring.

5.2.2 Lecture d'images SHG pour l'établissement d'un score F-Métavir

Dans cette partie, nous nous intéressons à la possibilité d'établir un score F-Métavir par lecture directe d'images SHG, et nous comparons ces évaluations par rapport aux lectures réalisées avec des images de microscopie champ large.

Nous avons demandé à un médecin spécialiste (Bruno TURLIN, du département d'anatomie pathologique) de réaliser une lecture de type Métavir sur deux types d'images :

- 1) une série d'images SHG basses résolutions (2448×2536 pixels max.) reconstruites à partir de notre série test de coupes histologiques de $5\mu m$. Les mêmes images avaient permis d'établir un score SHG par la méthode décrite dans les précédents paragraphes.
- 2) la série d'images RGB haute résolution ($14.000 \times 19.000 \times 3$ pixels) acquise en microscopie champ large sur les mêmes échantillons, après les avoir marqués au rouge Sirius. Cette série d'image, acquise par l'équipe de P. CALÈS (Angers), a également servi à établir un scoring par la méthode d'histomorphométrie.

Ces deux séries de lecture ont été réalisées à 15 jours d'intervalle, le choix de commencer par les images champ large ayant été tiré au hasard. Les lectures ont ensuite été réalisées en double aveugle, c'est à dire que l'ordre de présentation des images a été tiré au hasard par un programme, et que ni le "lecteur" (B. TURLIN), ni les chercheurs présents (C. ODIN et moi-même), ne connaissaient le score Métavir déjà attribué au patient de l'image présentée. Les images ne portaient qu'un seul numéro, toutes les références permettant d'identifier les images ayant été supprimées. Afin de conserver une certaine interactivité pour sélectionner et visualiser au mieux certaines zones, les images ont été présentées avec le logiciel IrfanView sur un écran d'ordinateur. Le médecin a ainsi pu sélectionner et zoomer sur des zones, comme il le ferait en conditions normales avec son microscope. La grande différence ici provient de la plus forte limitation en grossissement en SHG, à cause du faible échantillonnage spatial des images, choix que nous avons expliqué section 5.1.1 de ce chapitre.

Afin d'évaluer la concordance entre les différentes séries de lecture, nous avons utilisé le coefficient Kappa.

Le coefficient de Cohen : Kappa

Le test non paramétrique Kappa (κ) de Cohen [Cohen, 1960] permet de chiffrer l'accord entre deux observateurs ou techniques lorsque les jugements sont qualitatifs. Plus généralement, le test statistique Kappa est utilisé dans les études de reproductibilité qui nécessitent d'estimer l'agrément entre deux évaluations lorsqu'on étudie une variable discontinue, ici, la valeur du score F-Métavir. Ce coefficient prend des valeurs entre -1 et 1 , et la concordance est d'autant meilleure que le Kappa est proche de 1 . Le Kappa vaut 0 lorsque les deux jugements sont effectués au hasard de manière indépendante.

Définition : Dans le cas d'une étude d'accord entre deux observateurs statistiquement indépendants ayant r modalités de jugement, avec $r \geq 2$, le coefficient Kappa s'écrit $\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$,

ACCORD	κ
excellent	> 0.81
bon	$0.61 - 0.80$
modéré	$0.41 - 0.60$
médiocre	$0.21 - 0.40$
mauvais	$0.00 - 0.20$
très mauvais	< 0.0

TABLE 5.1 : Degré d'accord et valeur de Kappa associé, selon [Landis, 1977]

avec P_o la proportion d'accords observés, et P_e la proportion d'accords aléatoires ou concordance attendue sous l'hypothèse d'indépendance des jugements. Les données résultantes des deux observations sont classées dans un tableau de contingence, comme illustré par la figure 5.11. Pour remplir ce tableau, il faut dénombrer combien de cas correspondent à une case considérée. Par exemple, la case $p(11)$ du tableau 5.11 correspond au nombre d'échantillons ayant été classés dans la catégorie $C1$ à la fois par le juge A et le juge B. La valeur de la case $p(12)$ sera le nombre d'échantillons classés dans la catégorie $C1$ par le juge B mais classés $C2$ par le juge A.

Catégorie		Juge A				Total
		C1	C2	...	Cr	
Juge B	C1	$p(11)$	$p(12)$...	$p(1r)$	$p(1.)$
	C2	$p(21)$	$p(22)$	$p(2.)$

	Cr	$p(r1)$	$p(rr)$	$p(r.)$
Total		$p(.1)$	$p(.2)$...	$p(.r)$	N

FIGURE 5.11 : Répartition du nombre de concordances entre deux jugements dans un tableau de contingence.

On appelle alors concordance observée P_o , la proportion des individus classés dans les cases diagonales de concordance du tableau de contingence, soit la somme de ces effectifs diagonaux divisée par le nombre total d'échantillons N . La concordance aléatoire P_e est égale à la somme des produits des individus marginaux divisée par le nombre d'échantillons au carré. L'accord est d'autant plus élevé que la valeur de Kappa est proche de 1, et l'accord maximal est atteint ($\kappa = 1$) lorsque $P_o = 1$ et $P_e = 0.5$.

[Landis, 1977] *et al.* ont proposé un classement de l'accord en fonction de la valeur de Kappa présenté dans le tableau 5.1.

Le coefficient Kappa pondéré : Le coefficient Kappa ne tient pas compte de l'écart entre les catégories de classement. Or, et surtout en médecine, cet écart peut avoir de graves

	κ	κ_w
RS-Réf vs RS-BT	0.35, [0.15 – 0.56]	0.66, [0.53 – 0.79]
RS-Réf vs SHG-BT	0.37, [0.17 – 0.57]	0.63, [0.48 – 0.78]
RS-BT vs SHG-BT	0.44, [0.24 – 0.64]	0.66, [0.52 – 0.80]

TABLE 5.2 : Coefficients Kappa κ et Kappa pondérés κ_w évaluant la concordance entre deux jugements qualitatifs. Les valeurs entre crochets sont les intervalles de confiance à 95%.

conséquences. Le Kappa pondéré cherche à donner un poids plus fort aux plus grands écarts. Cohen propose de donner à chacune des cases du tableau de contingence, un poids w_{ij} fixé *a priori*, et qui reflète l'importance que l'on attribue au désaccord. Pour cette étude, nous utilisons des poids de concordance plutôt que des poids de discordance. Ces poids varient de 1 pour les cases de la diagonale, à 0 pour les cases correspondant au plus fort désaccord. Le choix des poids du coefficient Kappa pondéré κ_w est réalisé selon un système de pondération linéaire où chaque poids se calcule par

$$w_{ij} = 1 - \frac{|i - j|}{r - 1}$$

Ces coefficients ont été calculés avec le logiciel *GNU R*. R est un environnement de programmation ainsi qu'un langage, dédié aux calculs statistiques. Plusieurs bibliothèques permettant de calculer les coefficients Kappa et Kappa pondérés sont disponibles. Il est également possible d'obtenir ces coefficients à partir d'un site internet dédié : <http://faculty.vassar.edu/lowry/kappa.html>.

Résultats et interprétations

Trois comparaisons ont donc été effectuées, sur trois séries de lectures différentes, à savoir la lecture Métavir des échantillons sériés marqués au rouge Sirius de référence (notée "RS-Réf"), la lecture Métavir sur les mêmes échantillons de $5\mu\text{m}$ d'épaisseur ayant eux aussi été marqués au rouge Sirius, et réalisée par Bruno Turlin (notés "RS-BT"), et enfin, la lecture Métavir directe des images SHG brutes, en fausses couleurs mais non traitées, effectuée par Bruno Turlin également, et notée ("SHG-BT").

Le tableau contenant les résultats obtenus pour les coefficients Kappa κ et Kappa pondérés κ_w est donné table 5.2.2. Une représentation graphique de ces comparaisons avec les coefficients Kappa pondérés qui y sont associés, est présentée figure 5.12.

Les valeurs des coefficients Kappa non pondérés ne donnent pas de bons résultats (de médiocre à modéré). En revanche, les coefficients Kappa obtenus en ajoutant une pondération linéaire sont au dessus de 0.61, et les intervalles de confiance à 95% ne descendent pas en dessous de 0.41, ce qui indique, selon le tableau 5.1 [Landis, 1977], un bon accord. On peut tirer plusieurs remarques de ces résultats.

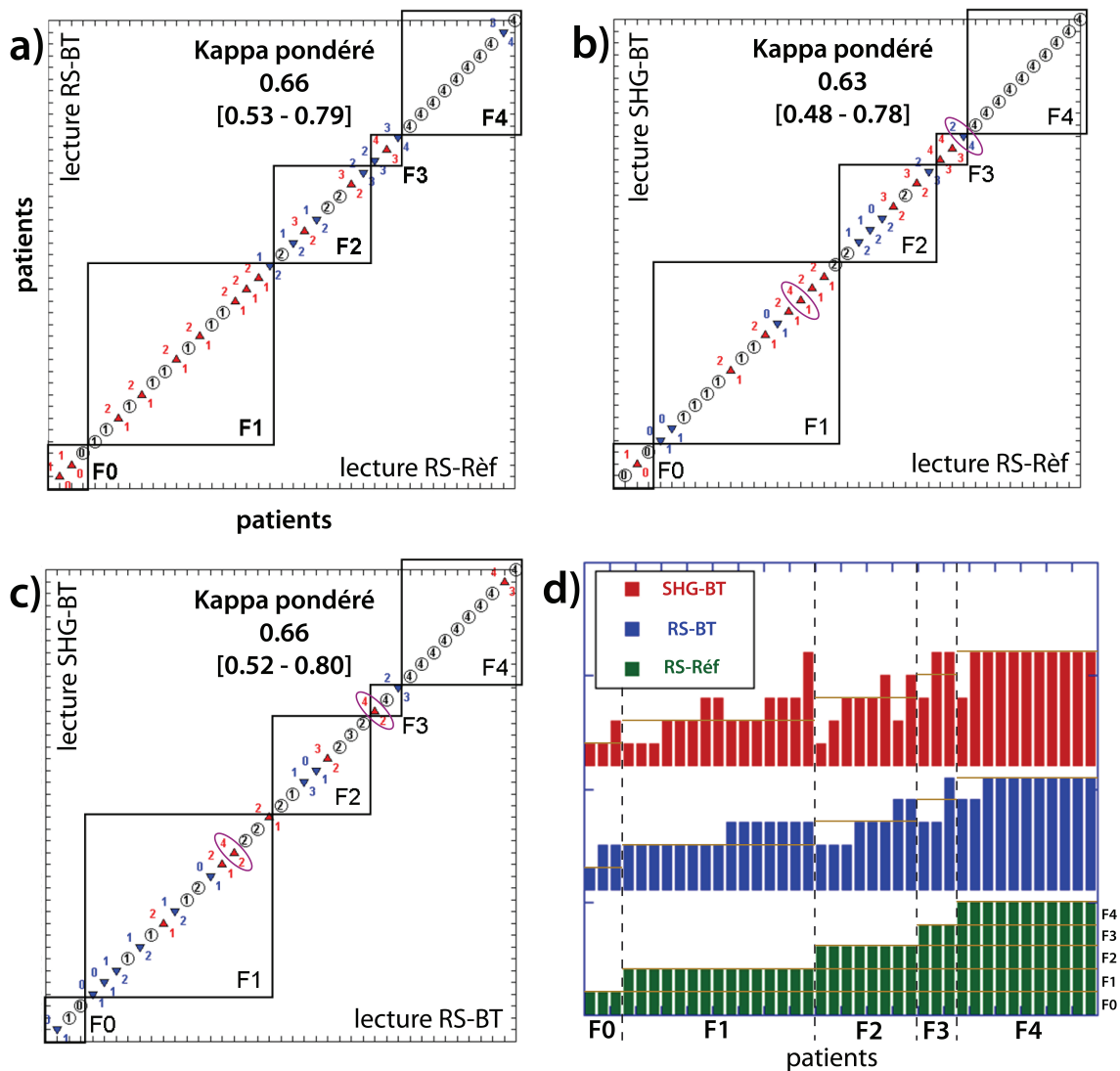


FIGURE 5.12 : Représentation graphique des scores MétaVir établis pour les trois lectures : RS-Réf, RS-BT et SHG-BT. **a)** RS-Réf versus RS-BT. Les icônes rouge (triangles vers le haut) indiquent une surestimation de la lecture RS-BT par rapport à la lecture RS-Réf, tandis que les bleus (triangles vers le bas) indiquent une sous-estimation. Les cercles indiquent une concordance. $\kappa_w = 0.66$, [0.53 - 0.79]. **b)** RS-Réf versus SHG-BT. $\kappa_w = 0.63$, [0.48 - 0.78]. Les ellipses indiquent une forte discordance. **c)** RS-BT versus SHG-BT. $\kappa_w = 0.66$, [0.52 - 0.80]. **d)** Bilan graphique, patient par patient, des trois lectures MétaVir avec en référence en bas, la lecture RS-Réf.

Tout d'abord, la bonne concordance entre les deux lectures Métavir basées sur des images de coupes histologiques colorées au rouge Sirius sériées ($\kappa_w = 0.66$, intervalle de confiance à 95% [0.53 – 0.79]) indique une reproductibilité inter et intra-opérateur correcte pour cette série. La seconde remarque concerne l'évaluation directe de scores Métavir à partir d'images SHG reconstruites. Les deux comparaisons RS-Réf *vs* SHG-BT et RS-BT *vs* SHG-BT donnent des coefficients Kappa pondérés supérieur à 0.61 (intervalle de confiance à 95% > 0.48), indiquant clairement la possibilité d'établir un score Métavir à partir d'images SHG d'échantillons sans aucun marquage.

A partir de ces résultats, on peut regarder plus précisément les singularités observées directement sur les deux types d'images, celles de microscopie en champ large haute résolution à partir d'échantillons marqués au rouge Sirius, et celles acquises en SHG à basse résolution, à partir d'échantillons vierges de tout marquage. Les différentes singularités présentées ici ont été révélées lors des deux sessions de lectures avec Bruno TURLIN.

Comparaisons d'images de coupes histologiques acquises en microscopie en champ large et en microscopie SHG

Nous rappelons que les deux séries d'images comparées ici ont été acquises avec deux méthodes de microscopies fondamentalement différentes. Ceci implique que les informations que nous pouvons en tirer sont de natures différentes, et ont de grandes chances d'être complémentaires. Les particularités et points de comparaison flagrants entre les images issues des deux techniques décrits ici concernent :

- les Espaces Portes (EP) "sains",
- les EP globuleux avec expansion,
- l'alternance typique entre EP et Veines Centrolobulaires (VC),
- la capsule du foie (point d'entrée de la biopsie),
- la fibrose cerclant les nodules en expansion arciforme,
- la fibrose sinusoïdale.

Ces différents point sont discutés et illustrés par des exemples, figure 5.13.

Les EP : Dans la plupart des coupes histologiques de biopsies de foie Humain, on peut observer l'alternance de la présence d'EP avec des VC 5.13c). La taille de l'espace entre un EP et ses VC est riche en information. Si ces deux structures sont très proches l'une de l'autre, on est très certainement en présence d'un stade F4, voire d'une cirrhose. Sont considérés sains, les EP où la présence de collagène se limite à la périphérie de l'EP (F0-F1), comme illustré figure 5.13a). Au delà de cette périphérie, la présence de collagène est considérée comme étendue ou élargie, l'EP est alors dit "globuleux" et le stade F2 est décrété (5.13b)). Il a été noté que les images SHG faisaient beaucoup mieux ressortir les liserets de collagène en bord de veine, ainsi que les septa entre deux EP.

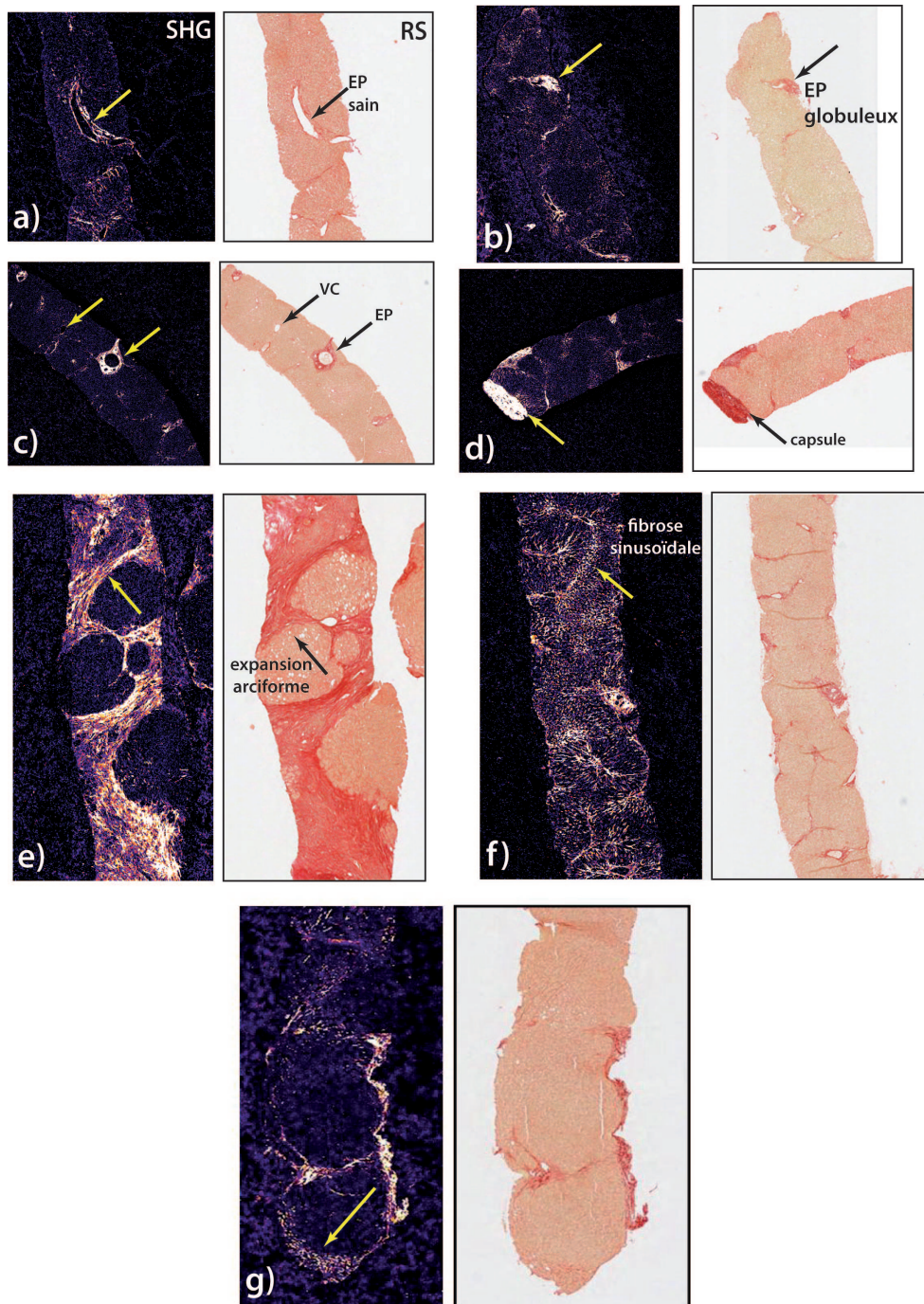


FIGURE 5.13 : Illustration de la mise en évidence plus ou moins facile de particularités structurales de la MEC selon la technique d'imagerie. Les images SHG sont représentées en fausses couleurs de type "Fire" et n'ont pas été traitées, tout comme les images de microscopie RS. **a)** A gauche : image SHG ; à droite : image de microscopie champ large d'échantillons colorés. EP : Espace Porte. **b)** Espace porte globuleux. **c)** Alternances espace porte / veine centrolobulaire. **d)** Capsule du foie, point d'entrée de la biopsie. **e)** Fibrose cerclant les nodules en expansion arciforme. **f)** Fibrose sinusoidale. **g)** Aspect nodulaire, expansion arciforme de la fibrose visible en SHG, mais pas sur l'image RS.

La capsule : Sur certaines coupes de biopsies, on peut observer à une des deux extrémités de l'échantillon, une très forte concentration de collagène, correspondant à la capsule du foie, soit le point d'entrée de l'aiguille opérant la biopsie (5.13d). Cette zone particulière n'intervient pas dans l'évaluation du score Métavir.

La fibrose cerclant les nodules en expansion arciforme : Caractéristique de la cirrhose, la présence de cette fibrose en expansion arciforme (en arc de cercle) facilement reconnaissable aboutit obligatoirement au diagnostic Métavir F4 (5.13e).

La fibrose sinusoïdale : Dans l'établissement du score Métavir, un médecin anatomopathologiste ignore la fibrose sinusoïdale. Elle n'est pas révélatrice d'un stade Métavir particulier, et a été relativement peu étudiée. On peut d'ailleurs noter que cette fibrose sinusoïdale est très difficilement discernable sur l'image rouge Sirius de la figure (5.13f). En revanche, en microscopie SHG, la fibrose sinusoïdale ressort en contraste comme de la fibrose "régulière", et a donc une implication non négligeable dans le calcul du score SHG.

D'autres commentaires émis par Bruno Turlin lors de la séance de lecture des images SHG sont porteurs d'informations intéressantes. Par exemple, dans le cadre d'une étude plus complète, il serait envisageable de coupler une information de fluorescence (TPEF) avec l'image SHG. En effet, certaines informations utiles à l'établissement du score Métavir n'apparaissent pas sur l'image SHG, comme l'aspect des travées entre les hépatocytes ou les hépatocytes eux-mêmes. En revanche, certains échantillons émettent un fort signal SHG, là où le contraste du colorant RS ne révèle rien de particulier, par exemple pour les aspects nodulaires, comme le démontre l'exemple de la figure 5.13g).

En conclusion de cette discussion, il est ressorti qu'avec un léger apprentissage des contrastes révélés par la microscopie SHG, il est tout à fait possible d'effectuer une évaluation d'un score Métavir à partir d'une image SHG, ce qui est corroboré avec les résultats traduits par les coefficients Kappa pondérés (> 0.61).

5.2.3 Comparaison du score SHG avec l'histomorphométrie

Après avoir démontré la robustesse de la méthode de scoring SHG appliquée sur des pièces opératoires et des biopsies en coupes histologiques, et après l'avoir confrontée aux scores F-Métavir de référence, nous comparons maintenant nos résultats avec ceux obtenus avec les **mêmes** échantillons par histomorphométrie.

Le score histomorphométrique

La technique d'histomorphométrie développée à Angers par l'équipe de Paul Calès permet d'établir un score de quantification du collagène responsable de la fibrose hépatique. Si la finalité d'une telle méthode est comparable à celle du score SHG, la méthode utilisée est bien différente.

Cette méthode utilise une image couleur (RGB), à forte résolution d'une coupe histologique marquée avec un colorant se fixant sur le collagène. Une technique d'analyse d'image permet d'établir un score, pourcentage de pixels correspondant à de la fibrose par rapport à l'air totale de la biopsie.

A partir d'une coupe histologique colorée, plusieurs images sont acquises avec un microscope en champ large (objectif 20×, résolution image : $0.5\mu m/pix$) automatisé disponible au Pôle Imagerie du CHU d'Angers. Ces images sont reconstruites automatiquement pour ne faire qu'un seul fichier image représentant toute la biopsie (système d'acquisition *ScanScope*, Aperio Technologies, Inc., CA, USA).

Cette image reconstruite au format **.svs* (*Scanscope Virtual Slide*, format propriétaire) est de grande taille, à savoir jusqu'à $14.000 \times 19.000 \times 3$ pixels, pour seulement 36Mo. Pour comparaison, une image de même taille au format **.tif* non compressée pèsera environ 3Go. La compression du format **.svs* est donc sans perte, et est utilisée pour l'imagerie médicale ou géospatiale. L'exploitation d'une telle image se fait par un logiciel de visualisation dédié, *ImageScope*, qui permet d'effectuer différentes opérations, comme la sauvegarde des images sous différents formats, en cassant la résolution ou en compressant l'image selon les besoins.

L'image de la coupe entière est ensuite seuillée par un programme développé par Julien Chaigneau au Pôle Imagerie du CHU d'Angers, qui permet de classifier la totalité des pixels en quatre catégories bien distinctes, leur attribuant une valeur bien précise selon un algorithme *Fuzzy C-means* que nous ne détaillerons pas ici. Cette méthode de classification a été mise au point en collaboration avec des médecins anatomopathologistes qui ont traité "à la main" les images, offrant ainsi une base sur laquelle Julien Chaigneau s'est reposé pour développer le programme de traitement. Les parties d'images hors de la biopsie auront la valeur 0, les zones considérées comme étant fibrosées auront la valeur 30, la matrice extra-cellulaire aura la valeur 208 tandis que les zones de stéatoses auront la valeur 255. On se trouve ainsi en présence d'une image en niveaux de gris bien distincts, aisément manipulable. Le score d'histomorphométrie est établi en faisant le ratio entre le nombre de pixels ayant pour valeur 30 (les zones fibrosées) sur le nombre total de pixels > 0 .

Notons ici qu'une coupe histologique de biopsie numérisée et traitée par le système d'acquisition *ScanScope* est fortement dépendante de la concentration en colorant se fixant sur les collagènes. Pour s'affranchir de cette dépendance, l'équipe de Paul CALÈS a décidé d'établir un traitement d'image dynamique. Les scores d'histomorphométrie sont réalisés dynamiquement, avec un niveau de seuillage différent pour chaque échantillon, évoluant en fonction du contraste détecté entre une zone de forte concentration en collagène, fortement marqué par le colorant, et une zone saine. Par comparaison, les scores SHG sont réalisés toujours de la même manière (puissance laser et niveau de détection du PM réglé à 4% suivant la procédure mainte fois décrite, et seuillage constants). Cette différence de traitement des images est un point important.

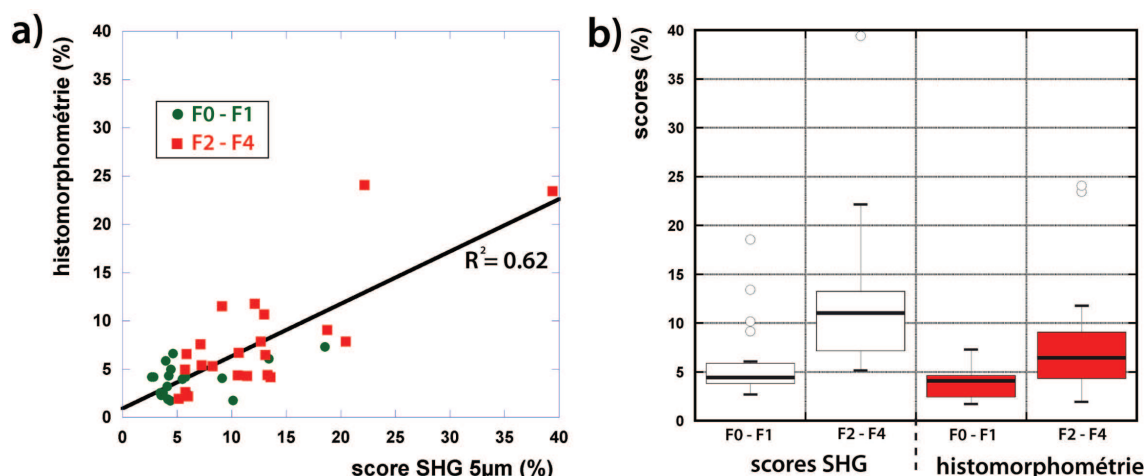


FIGURE 5.14 : Comparaison des scores SHG et HM issus des mêmes coupes histologiques ($5\mu m$) : **a)** Corrélation entre les deux scores. $R^2 = 0.62$. **b)** Représentation type "boîtes à moustaches" de la répartition des valeurs de scores en fonction du stade Métavir de référence, regroupées par stade F0-F1 et F2-F4 d'après la lecture RS-réf.

Comparaison des deux scores

La première étape de comparaison est simplement effectuée en corrélant les scores issus des deux méthodes (figure 5.14), et en utilisant comme score Métavir de référence le RS-réf, c'est à dire celui qui a été établi "au fil de l'eau" sur d'autres coupes des mêmes biopsies. Nous verrons ensuite l'effet d'un autre choix de référence.

La figure 5.14a) appelle plusieurs commentaires. D'abord, bien que ces scores aient été effectués sur les mêmes échantillons (au marquage près), la corrélation linéaire entre les résultats des deux techniques est faible puisque $R^2 = 0.62$. Ensuite, les aires de fibroses mesurées par les scores SHG sont supérieures à celles mesurées en morphométrie puisque la majorité des valeurs des scores SHG se trouvent en dessous de la bissectrice de la figure 5.14a). Cette tendance est retrouvée sur la figure 5.14b). Néanmoins, les deux méthodes séparent de manière à peu près équivalente les deux groupes F0-F1, F2-F3-F4. Notons cependant que l'écart de score entre les deux groupes est plus grande en SHG qu'en HM. L'écart entre les valeurs des scores SHG et HM peut provenir de plusieurs facteurs :

- La SHG met en évidence le collagène de type I et celui de type III lorsqu'il est associé au type I. Le rouge Sirius se fixe sur plusieurs types de collagènes pour les mettre en évidence. La SHG et la morphométrie ne mesurent donc pas forcément le même signal.
- Si on augmente la résolution des images SHG, on constate que le collagène est présent partout et de manière diffuse dans le foie. Le problème est de différencier ce qui est physiologique (MEC) de ce qui est pathologique (collagène fibrillaire - fibrose sinusoïdale). Or, le rouge Sirius ne colore pas uniquement la fibrose, mais également une partie de la MEC.
- L'histomorphométrie exploitant des images haute résolution met en évidence certaines composantes de la MEC qui sont prises en compte dans le score. Les scores SHG étant réalisés à partir d'image basse résolution, cette contribution n'est pas considérée. Il faudrait

imager à plus fort grossissement -60×- pour pouvoir tenir compte de cette contribution. En revanche, les structures de collagènes fibrillaires de grandes dimensions sont toutes prises en compte dans les scores SHG, tandis qu'en morphométrie, certaines structures (comme la périphérie des veines centrolobulaires) sont éliminées de l'analyse.

Quelques points de la figure 5.14a) de corrélation entre les deux méthodes ont une position exotiques, puisque des points du groupe F0-F1 prennent des valeurs de scores SHG supérieures à 10%. La référence à partir de laquelle nous avons basé cette corrélation est la lecture Métavir RS-réf établie à partir des mêmes biopsies, mais sur des coupes différentes. Nous avons vu dans la partie 5.2.1 l'influence du biais d'échantillonnage sur les scores SHG. On peut alors légitimement se demander si cette corrélation n'aurait pas plus de sens, si nous faisons de la lecture Métavir effectuée par Bruno TURLIN sur cette même série d'échantillon de $5\mu\text{m}$, notre référence.

La figure 5.15 présente cette nouvelle comparaison.

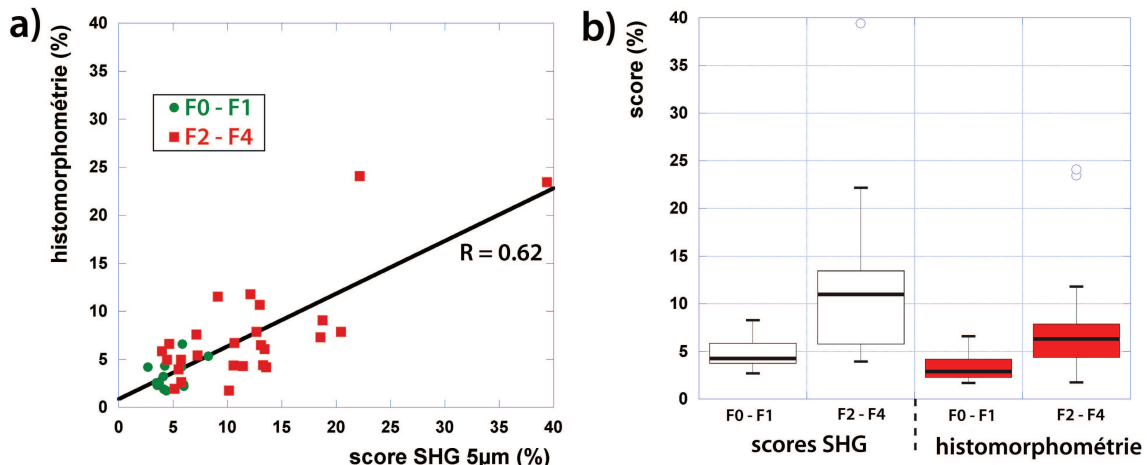


FIGURE 5.15 : Comparaison des scores SHG et HM issus des mêmes coupes histologiques ($5\mu\text{m}$) : **a)** Corrélation entre les deux scores. $R^2 = 0.62$. **b)** Représentation de la répartition des valeurs de scores en fonction d'un stade Métavir de référence, regroupées par stade F0-F1 et F2-F4 d'après la lecture RS-BT.

Sur la figure 5.15a), la position des différents points ne changent pas, en revanche, certains points ont changé de groupe. En effet, il n'y a plus de points appartenant au groupe F0-F1 qui dépasse une valeur de score SHG de 10%.

Nous avons cherché à comparer finement les différences mises à jour par ce dernier point, en superposant l'image SHG seuillée à l'image haute résolution morphométrique constituée uniquement des pixels représentatifs de la fibrose. Pour ce faire, il faut reconstruire une image complète de coupe histologique de biopsie hépatique, à partir des images utilisées pour déterminer les scores. En SHG, il s'agit en général d'une dizaine d'images 12 bits de 512×512 pixels. Pour reconstruire de façon la plus fidèle possible l'image entière, on se sert des images de fluorescence disponibles (TPEF). Une fois que l'image de la biopsie entière est prête, l'image SHG est seuillée à $t_r = 25\%$, de façon analogue à la méthode de score SHG. A partir de l'image HM haute résolution qui contient quatre informations distinctes (fibrose, stéatose, MEC et zones hors biopsie,

figure 5.16c)), nous ne sélectionnons que les pixels correspondant à l'information fibreuse. Les deux images binaires SHG et HM sont ensuite superposées. Par chance, nous n'avons pas observé de décalage angulaire entre les deux acquisitions, ce qui facilite grandement la superposition, dont on tire une image RGB : vert pour la SHG, rouge pour la morphométrie et jaune pour la colocalisation des deux composantes (figure 5.16).

Rappelons que les images SHG ont été sous échantillonnées spatialement (approximativement d'un facteur 2) pour les raisons indiquées dans la section 5.1.1 alors que l'échantillonnage spatial de l'acquisition en microscopie champ large est adaptée. Cette différence de résolution et d'échantillonnage spatial est illustrée sur les figures 5.16d-e). Nous remarquons que la MEC est moins apparente en HM qu'en SHG. Ceci peut s'expliquer d'une part par la différence de résolution entre HM ($\approx 0.5\mu m$) et SHG ($\approx 4\mu m$), et d'autre part par l'éventuel faible contraste induit par le rouge Sirius dans les zones de faible concentration en collagène. En revanche, pour les zones à forte concentration de collagène fibrillaire, on constate une bonne colocalisation des composantes SHG et HM. Néanmoins, on constate que tous les bords de biopsies, les périphéries de veines centrolobulaires ou d'espaces portes sont systématiquement écartés du score HM, tandis qu'en SHG, cette contribution est flagrante et illustrée par des flèches inversées, figures 5.16e). Cette différence dans les méthodes de traitement d'image pour assigner les pixels valides, et qui supprime plus d'information en HM, expliquerait que les scores SHG soient plus forts que les scores HM.

Dans la continuité de ce travail de comparaison entre les score SHG et HM, il est possible de corrélérer ces scores avec les autres méthodes d'analyse, invasives et non invasives, disponibles pour cette même cohorte de patients. Rappelons que c'est la disponibilité de tous les jeux de données qui a conduit à sélectionner ces patients.

5.2.4 Comparaison du scores SHG avec les autres tests

Après avoir démontré la robustesse de la méthode de scoring SHG obtenus à partir de pièces opératoires et de biopsies en coupes histologiques, et après l'avoir confronté aux scores F-Métavir de référence ainsi qu'aux scores d'histomorphométrie, nous allons comparer nos résultats avec ceux obtenus par différents tests non invasifs. Nous comparerons donc nos scores SHG avec les scores obtenus par FibroMètre, Fibrotest, Fibroscan, ainsi qu'avec les concentrations sériques d'acide hyaluronique. Ces différents tests ont été décrits dans l'introduction de cette seconde partie de thèse.

Pour commencer, nous pouvons comparer les valeurs d'aires AUROC de chacun de ces tests, que nous avons calculé en prenant pour référence la première lecture F-Métavir, RS-réf; les AUROC des scores SHG et HM sont également présentés (figure 5.17).

Les faibles valeurs des AUROC des tests sanguins et du Fibroscan peuvent être expliquées par le fait que les patients ont été biopsiés en raison d'un manque de concordance entre ces mêmes tests non invasifs de fibrose. L'histomorphométrie et le score SHG donnent les meilleurs

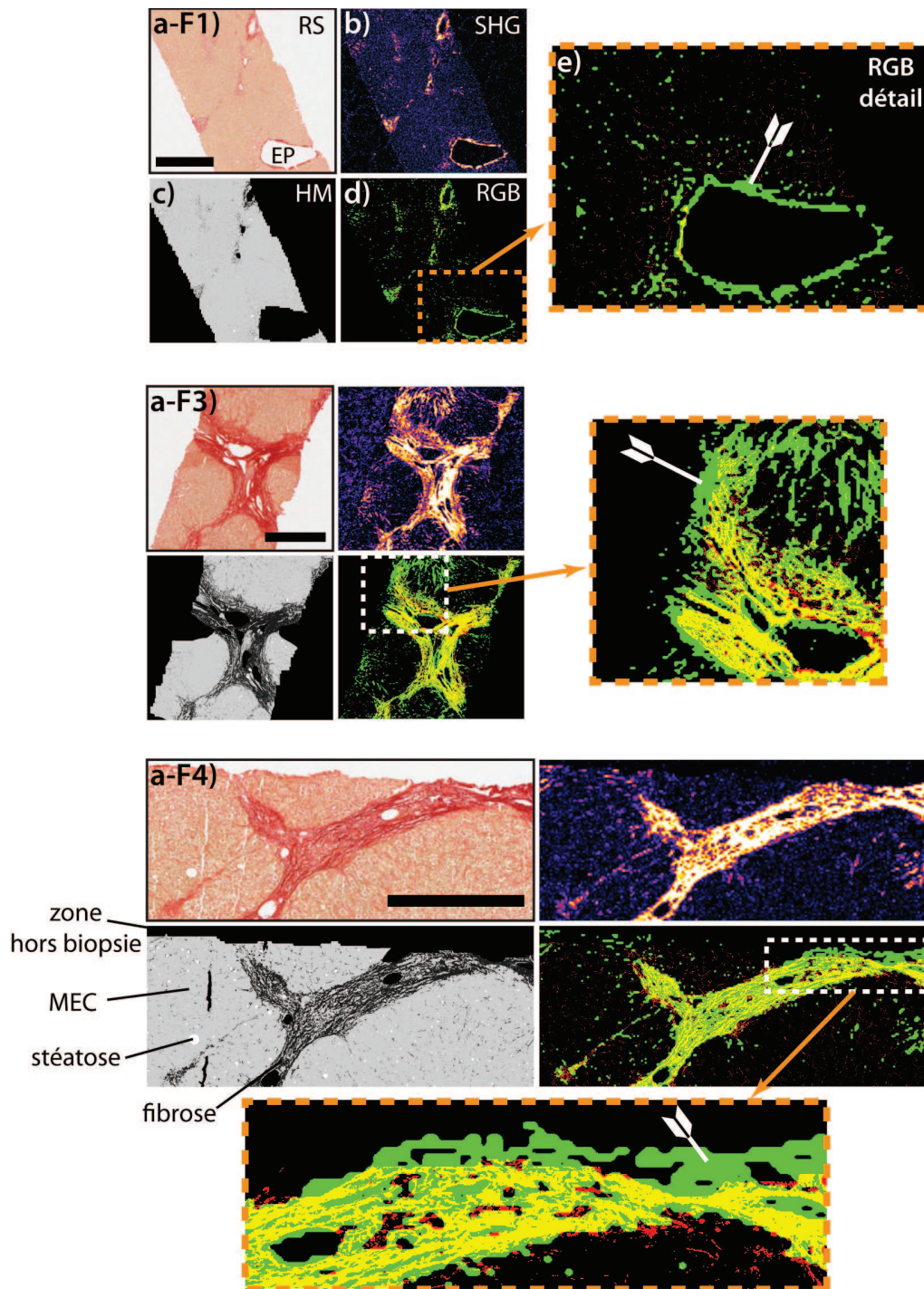


FIGURE 5.16 : Comparaison entre deux techniques d'imagerie, microscopie champ large et SHG et des images seuillées permettant d'établir le score. ROIs issues de coupes histologiques de $5\mu\text{m}$ à différents stade Métavir : F1, F3 et F4. **a)** F1-F3-F4 : Images issues du système d'acquisition ScanScope, échantillon marqué au rouge Sirius. **b)** Images SHG brute en fausses couleurs de la même ROI qu'en a). **c)** Image a) après application du traitement d'image pour le score d'histomorphométrie. **d)** Superposition de l'image SHG b) seuillée à 25% et de l'image c) en ne gardant que les pixels classés en fibrose. En vert : SHG ; en rouge : morphométrie ; en jaune : colocalisation des deux contrastes. **e)** Détail de d). Barres d'échelles : $500\mu\text{m}$.

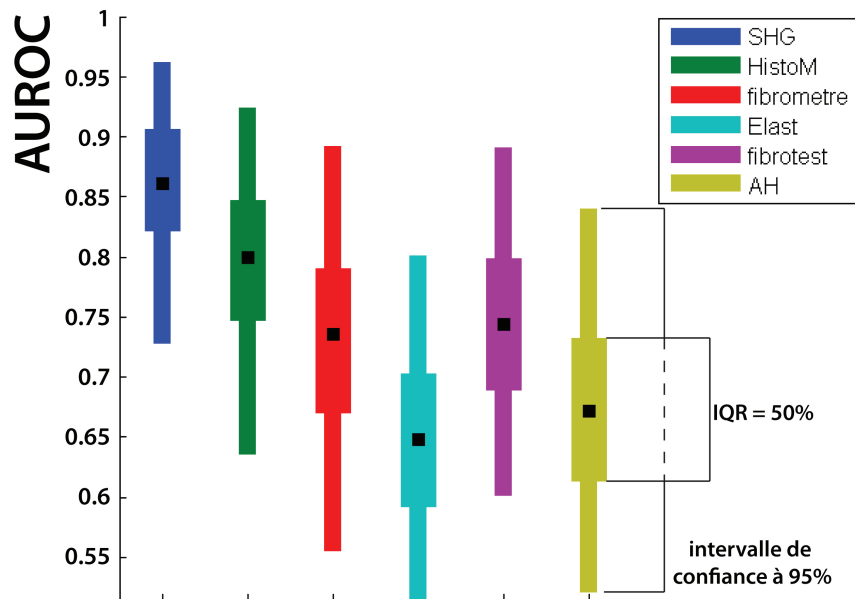


FIGURE 5.17 : AUROC des différents tests indiqués. Ces valeurs proviennent de l'évaluation de tous ces tests appliqués aux coupes histologiques de $5\mu\text{m}$ déjà présentées.

résultats. Notons une fois encore que ces AUROC sont calculés en prenant comme référence la lecture Métavir RS-réf établie à partir du niveau de coupe de la biopsie de $15\mu\text{m}$ d'épaisseur, alors que ces tests ont été effectués sur les coupes de $5\mu\text{m}$.

Dans un souci de lisibilité, les différentes corrélations entre tests sont toutes représentées dans la figure 5.18, où la diagonale représente la répartition des valeurs prises par les différents tests.

Les points bleu représentent le groupe F0-F1 et les points vert le groupe F2-F4, ces groupes étant formés sur la base de la lecture Métavir RS-réf. Seule la corrélation entre les scores SHG et histomorphométrie a véritablement un intérêt, dans le sens où elle compare deux techniques qui évaluent une quantité de collagène. Néanmoins, cette représentation permet de voir si la combinaison de deux tests permet de séparer nettement les deux groupes F0-F1 et F2-F4. Il est difficile de répondre à cette question, surtout en regard de tests comme le Fibromètre, le Fibrotest ou l'élastométrie (Fibroscan) qui présentent tous une forte dispersion des valeurs. Rappelons ici que si les patients ont été biopsiés, c'est principalement en raison d'une discordance entre les tests non invasifs de fibrose.

Nous avons vu dans ce dernier chapitre une application très précise de la méthode de scoring SHG que nous avons développée au sein du laboratoire. Cette application porte sur des coupes histologiques de $5\mu\text{m}$ d'épaisseur, de biopsies de foies hépatiques à différents stades Métavir.

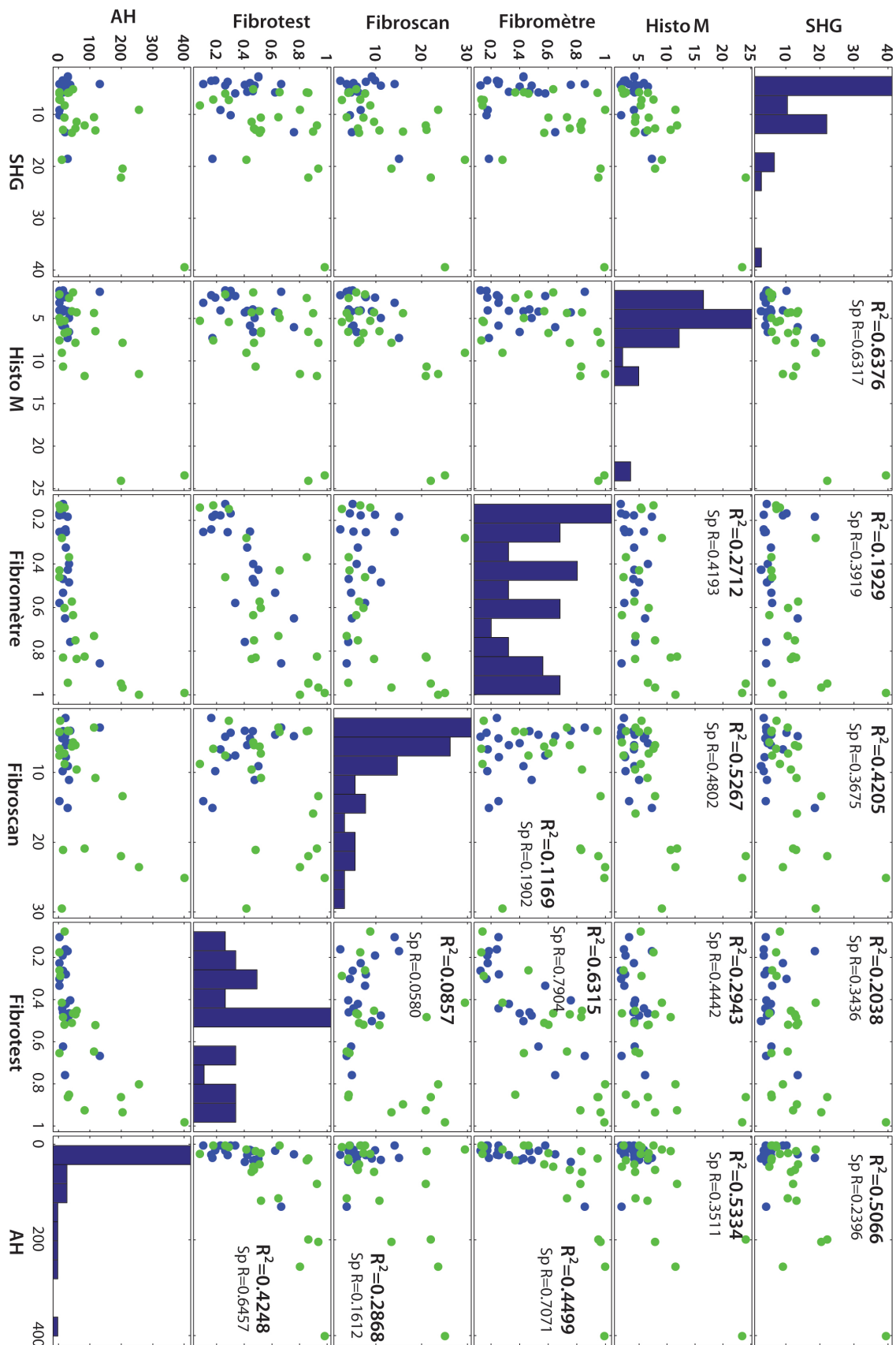


FIGURE 5.18 : Correlations entre les différents tests appliqués aux coupes histologiques de foie hépatique de $5\mu\text{m}$. La diagonale montre la répartition des valeurs prises par les différents tests. Les points bleu représentent le groupe F0-F1 et les points vert le groupe F2-F4, d'après la lecture Métavir RS-réf.

Notre méthode de scoring SHG à faible NA a été adaptée à la problématique posée par des coupes aussi fines, avec par exemple, la prise en compte de la génération de seconde harmonique par la paraffine. Ces échantillons ayant fait l'objet d'une étude clinique exhaustive, nous avons pu comparer les valeurs issus de nos scores avec ceux des différents tests déjà établis. Les résultats obtenus montrent que notre méthode de scoring SHG est une technique fiable et robuste, pouvant faire l'objet d'une aide au diagnostic de la fibrose hépatique. Néanmoins, pour achever cette étude, un nombre plus important d'échantillons doit compléter ces résultats, pour pouvoir être significatif du point de vue statistique.

5.2.5 Perspective pour l'imagerie SHG haute résolution

Nous l'avons vu, l'imagerie SHG à basse résolution avec un objectif à faible NA , permet d'une part d'intégrer sur l'épaisseur de la coupe histologique, et d'autre part d'avoir un large champ de vue, adapté à la méthode de scoring SHG. Il est également possible d'imager beaucoup plus précisément les structures constituant les agrégats de collagène fibrillaire dans le foie hépatique. C'est ce que nous proposons d'illustrer à présent.

Nous présentons à présent des reconstructions de piles d'images acquises avec un objectif à fort NA , $60\times$ - NA 1.2 à immersion d'eau. Les reconstructions sont comparées avec une acquisition avec l'objectif $10\times$ - NA 0.25 à air, comme le montre la figure 5.19.

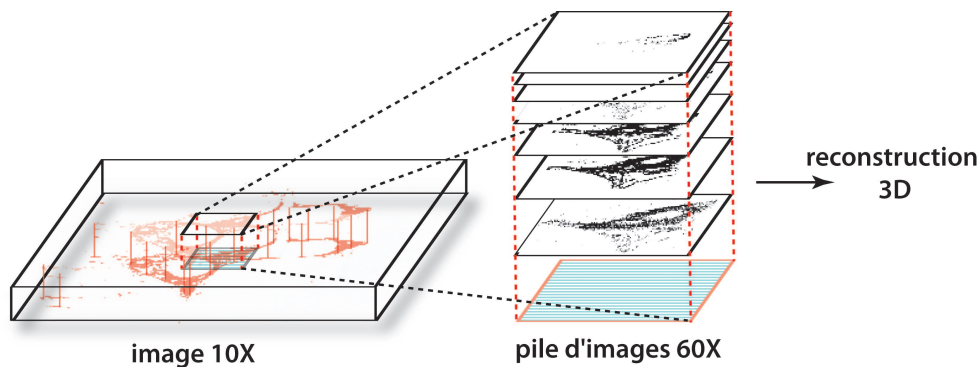


FIGURE 5.19 : Illustration du principe de reconstruction 3D d'images acquises avec un objectif à fort NA , $60\times$, NA 1.2 à immersion d'eau. Le pas d'acquisition des piles d'images en z est de $2\mu m$.

L'imagerie multiphotonique à forte résolution de structures telles que celles que forment le collagène fibrillaire au sein de coupes histologiques de biopsie de foie hépatique, offre potentiellement des informations très complètes. Ces approches très précises ont en effet un potentiel pour apporter des réponses très fines aux problèmes, par exemple, de structuration du collagène dans la MEC ou des agrégats fibrotiques à différents stades. La figure 5.20 illustre cette imagerie SHG haute résolution.

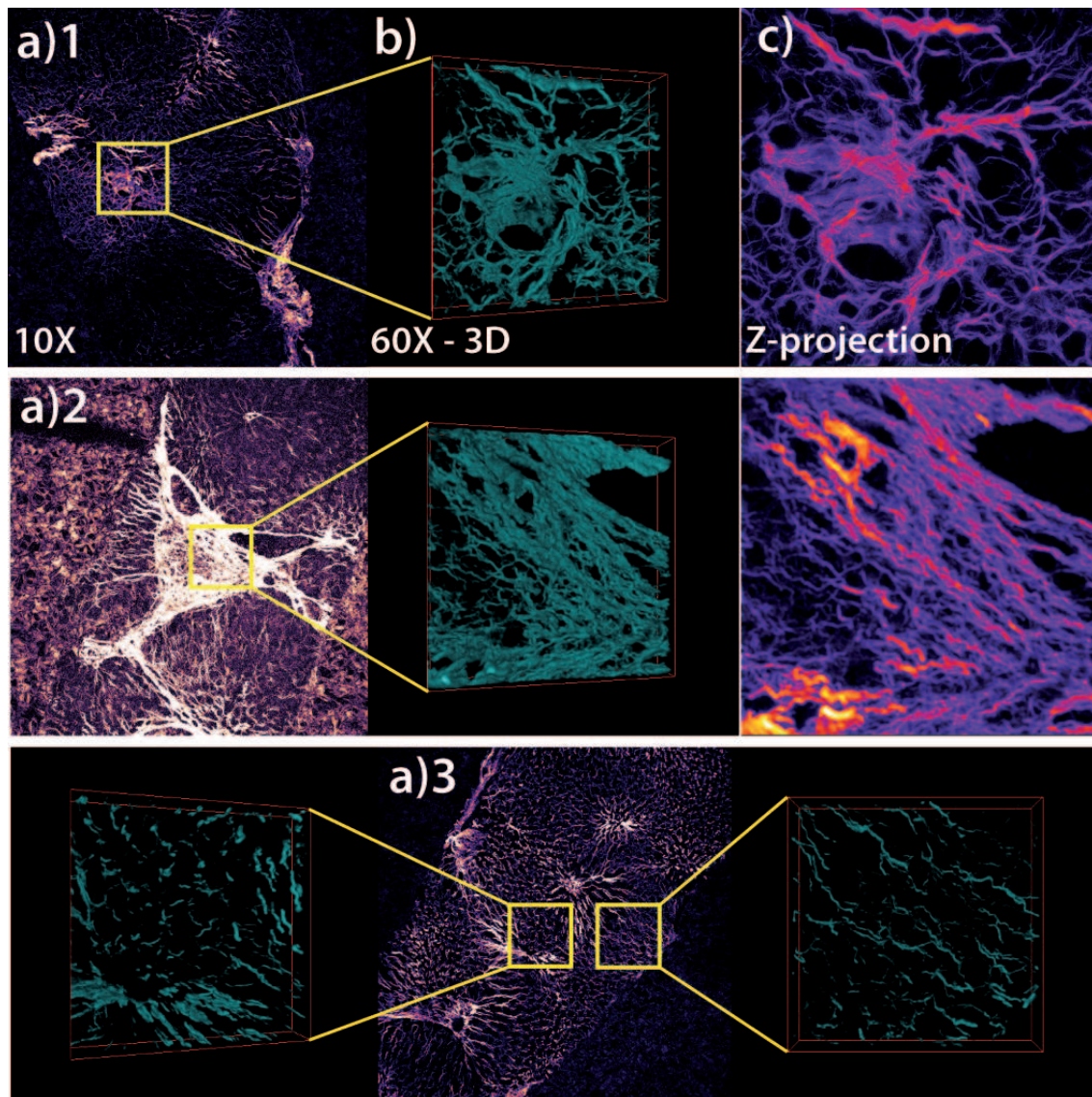


FIGURE 5.20 : **a)1**- Image SHG 10× plein champ (1.25mm) d'une biopsie de 15 μ m d'épaisseur - F2 MétaVir. **b)** Reconstruction 3D de la ROI entourée sur a)1, pile d'images acquise au 60× avec un pas en z de 2 μ m. **c)** Projection moyennée en intensité suivant l'axe z de la pile d'images, plein champ (235 μ m). **a)2**- Comme a)1, F4 MétaVir. **a)3**- Comme a)1, F2 MétaVir. Fibrose sinusoidale.

On montre ici la possibilité de résoudre très finement les structures formées par le collagène fibrillaire dans les trois dimensions de l'espace. Cette technique est donc potentiellement très riche en information, par exemple pour l'étude de l'architecture de la progression du collagène fibrillaire dans le foie fibrosé, problématique à coupler avec la réversibilité de la fibrose par exemple.

L'imagerie exhaustive à fort NA est une technique puissante, offrant des perspectives de travail prometteuses, en particulier pour la compréhension des architectures mis en jeu dans la prolifération du collagène fibrillaire dans le foie hépatique.

Conclusion

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit, à l'interface entre la biologie et la physique, s'est attaché à caractériser le signal de seconde harmonique émis par deux protéines fibrillaires : le collagène et la myosine. Le développement d'outils d'analyse et d'automatisation a constitué une partie majeure de ce travail, dont les applications ont été réalisées en étroite collaboration avec des biologistes et des médecins.

La prise en main et la compréhension du fonctionnement du microscope multiphotonique s'est effectuée en imageant des systèmes proches de modèles simples, tels que le tendon d'agneau (collagène), et le muscle de veau ou l'embryon de poulet (myosine). La méthode OF-SHM développée au sein de l'équipe a permis de caractériser ces deux protéines fibrillaires, jusqu'à remonter à leur orientation propre au sein de l'échantillon. Nous avons montré que l'orientation de l'axe principal du tenseur de susceptibilité non linéaire local d'ordre 2 de ces fibres est fortement corrélé à l'orientation des fibres elles-mêmes. La microscopie de seconde harmonique, sur laquelle est basée cette méthode, est de plus en plus utilisée en biologie, où elle permet d'imager spécifiquement et sans marquage, entres autres, la myosine et les collagènes fibrillaires au sein d'échantillons biologiques où la fluorescence excitée à deux photons permet d'obtenir une seconde source de contraste, sans marquage non plus. Cette technique de microscopie est donc tout à fait adaptée à l'étude du muscle squelettique. Nous avons montré lors d'une étude prospective que l'on pouvait imager sans marquage certaines trames conjonctives tandis que d'autres n'émettent pas de signal SHG. Nous avons également développé une méthode pour mesurer simplement la longueur moyenne de sarcomères et ce, directement à partir d'une image SHG, ou encore à partir de la transformée de Fourier de cette image. De nombreuses études restent à réaliser sur la caractérisation du muscle squelettique, en particulier la mise en place d'un couplage d'échantillons en coupes sériés, marqués immunologiquement et sans marquage, pour pouvoir comprendre exactement ce que révèle le signal SHG. Ainsi, l'imagerie par SHG pourra s'avérer utile pour la caractérisation de certaines pathologies associées à une altération des fibres musculaires ou de la matrice extra-cellulaire.

La spécificité du signal SHG pour certains collagènes fibrillaires confère à cette technique de microscopie à balayage un aspect unique et très applicatif. Nous avons ainsi montré dans ce manuscrit qu'il était possible de mettre au point une méthode de scoring du collagène dans le tissu hépatique, sur des pièces opératoires chirurgicales aussi bien que sur des biopsies en coupes histologique de 5 à $50\mu\text{m}$ d'épaisseur, en utilisant un objectif à faible NA . Cette méthode établit un score SHG pour chaque coupe, à partir d'un protocole d'imagerie que nous avons développé et validé. En particulier, nous avons trouvé une combinaison acquisition/seuillage qui permet de s'affranchir en grande partie de la contribution de la matrice extra-cellulaire "saine". Nous avons également évalué les avantages et les inconvénients de la microscopie SHG par rapport à d'autres méthodes conventionnelles pour l'évaluation d'un stade de fibrose. Cette étude devra être complétée avec une seconde série d'échantillons pour être statistiquement significatif. L'imagerie haute résolution à fort NA est également une perspective à envisager, pour mieux comprendre l'organisation des architectures mis en jeu dans la prolifération du collagène fibrillaire dans les tissus hépatique.

Ce manuscrit démontre ainsi le fort potentiel de la microscopie multiphotonique, en particulier du contraste SHG pour l'aide à la caractérisation ou au diagnostic biomédical, aussi bien pour le muscle squelettique que pour les organes touchés par des maladies fibroprolifératives. Ce travail de thèse s'inscrit également dans la perspective d'utiliser la génération de seconde harmonique pour étendre notre méthode à l'endoscopie, en vue d'une application aux biopsies virtuelles.

Bibliographie

- [Abramoff, 2004] M.D. Abramoff, P.J. Magelhaes and S.J. Ram, "Image Processing with ImageJ," *Biophotonics International*, **11**(7), 36-42, (2004).
- [Abubaker, 2008] M.G. Abubaker, A. Taylor, G.A. Ferns and H. Herman, "Differences in Raman Spectra of Aluminium Treated Brain Tissue Sample," *The Internet Journal of Toxicology*, **4** (2) (2008).
- [Adams, 2005] L.A. Adams, M. Bulsara, E. Rossi, B. DeBoer, D. Speers, J. George, J. Kench, G. Farrell, G.W. McCaughan and G.P. Jeffrey, "Hepascore : an accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection," *Clin. Chem.*, **51**, 1867-1873 (2005).
- [Arthur, 2002] M.J. Arthur, "Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C," *Gastroenterology*, **122**, 1525-1528 (2002).
- [Ascenzi & Lomovtsev, 2005] M. G. Ascenzi and A. Lomovtseva, "Collagen orientation patterns in human secondary osteons, quantified in the radial direction by confocal microscopy," *J. Struct. Biology*, **153** (1), 14-30 (2005).
- [Bao, 2010] H. Bao, A. Boussioutas, R. Jeremy, S. Russell and M. Gu, "Second harmonic generation imaging via nonlinear endomicroscopy," *Opt. Express*, **18** (2), 1255-1260 (2010).
- [Barad, 1997] Y. Barad, H. Eisenberg, M. Horowitz and Y. Silberberg, "Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation," *Appl. Phys. Lett.*, **70**(8), 922-924 (1997).
- [Bataller, 2005] R. Bataller and D.A. Brenner, "Liver fibrosis," *J. Clin. Invest.*, **115**, 209-218 (2005).
- [Beaurepaire, 2002] E. Beaurepaire and J. Mertz, "Epifluorescence collection in two-photon microscopy," *Applied Optics*, **41**(25), 5376-5382 (2002).
- [Bedossa, 2003] P. Bedossa, D. Dargère and V. Paradis, "Sampling Variability of Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis C," *Hepatology*, **38**, 1449-1457 (2003).
- [Bloembergen, 1962] N. Bloembergen and P.S. Pershan, "Light waves at the boundary of nonlinear media," *The Physical Review*, **128**(2), 606-622 (1962).
- [Boerboom, 2007] R. A. Boerboom, K. N. Krahn, R. T. Megens, M. A. van Zandvoort, M. Merckx and C. V. Bouten, "High resolution imaging of collagen organisation and synthesis using a versatile collagen specific probe," *J. Struct. Biol.*, **159**, 392-399 (2007).

- [Born & Wolf, 1993] M. Born and E. Wolf, "Principles of Optics," Pergamon Press (1993).
- [Both, 2004] M. Both, M. Vogel, O. Friedrich, F. von Wegner, T. Künsting, R. H. A. Fink and D. Uttenweiler, "Second harmonic imaging of intrinsic signals in muscle fibers in situ," **9** (5), 882 (2004).
- [Bouevitch, 1993] O. Bouevitch, A. Lewis, I. Pinevsky, J. P. Wuskell and L. M. Loewt, "Probing Membrane Potential with Nonlinear Optics," *Biophys. J.*, **65**, 672-679 (1993).
- [Boulesteix, 2004] T. Boulesteix, E. Beaurepaire, M. Sauviat and M.-C. Schanne-Klein, "Second-harmonic microscopy of unstained living cardiac myocytes : measurements of sarcomere length with 20-nm accuracy," *Opt. Lett.* **29**, 2031-2033 (2004).
- [Boulesteix, 2005] T. Boulesteix, A. M. Pena, N. Pagès, G. Godeau, M. P. Sauviat, E. Beaurepaire and M. C. Schanne-Klein, "Micrometer Scale Ex Vivo Multiphoton Imaging of Unstained Arterial Wall Structure," *Cytometry*, **69A**, 20-26 (2005).
- [Brakenhoff, 1979] G.J. Brakenhoff, P. Biota and P. Barends, "Confocal scanning light microscopy with high aperture immersion lenses," *J. Microsc. (Oxf.)* **117**, 219-232 (1979).
- [Brevet, 1996] P. F. Brevet, "*Surface Second Harmonic Generation*, (Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne), (1996).
- [Brockbank, 2008] K. G. Brockbank, W. R. MacLellan, J. Xie, S. F. Hamm-Alvarez, Z. Z. Chen and K. Schenke-Layland, "Quantitative second harmonic generation imaging of cartilage damage," *Cell Tissue Bank*, **9**, 299-307 (2008).
- [Brown, 2003] E. Brown, T. McKee, E. diTomaso, A. Pluen, B. Seed, Y. Boucher and R. K. Jain, "Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumors in vivo using second-harmonic generation," *Nat. Med.* **9**, 796-800 (2003).
- [Calès, 2005] P. Calès, F. Oberti, S. Michalak, I. Hubert-Fouchard, M.C. Rousselet, A. Konate, Y. Gallois, C. Ternisien, A. Chevailler and F. Lunel, "A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis," *Hepatology*, **42**, 1373-1381 (2005).
- [Campagnola, 2002] P.J. Campagnola, A.C. Millard, M. Terasaki, P.E. Hoppe, C.J. Malone and W.A. Mohler, "Three-dimensional high-resolution Second-Harmonic-Generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues," *Biophys. J.* **82**, 493-508 (2002).
- [Carrino, 1999] D.A. Carrino, J.M. Sorrell and A.I. Caplan, "Dynamic Expression of Proteoglycans During Chicken Skeletal Muscle Development and Maturation," *Poultry Science*, **78**, 769-777 (1999).
- [Chen, 2007] J. Chen, S. Zhuo, T. Luoa, D. Liua and J. Zhao, "Simultaneous observation of collagen and elastin based on the combined nonlinear optical imaging technique coupled with two-channel synchronized detection method," *Optik*, **119** (11), 519-522 (2007).
- [Chen, 2008] W. L. Chen, Y. Sun, W. Lo, H. Y. Tan and C. Y. Dong, "Combination of multiphoton and reflective confocal imaging of cornea," *Microsc. Res. Tech.*, **71**, 83-85 (2008).
- [Chen, 2009] G. Chen, J. Chen, S. Zhuo, S. Xiong, H. Zeng, X. Jiang, R. Chen and S. Xie, "Nonlinear spectral imaging of human hypertrophic scar based on two-photon excited fluorescence and secondharmonic generation," *Br. J. Dermatol.* **161** (1), 48-55 (2009).
- [Cheong, 1990] W.F. Cheong, S.A. Prahl and A.J. Welch, "A review of the optical properties of biological tissues," *IEEE J. of Quantum Elec.*, **26**, 2166-2185 (1990).
- [Chernyavskiy, 2009] O. Chernyavskiy, L. Vannucci, P. Bianchini, F. Difato, M. Saieh and L. Kubinova, "Imaging of mouse experimental melanoma in vivo and ex vivo by combination of confocal and nonlinear microscopy," *Microsc. Res. Tech.* **72**, 411-423 (2009).

- [Chu, 2003] S.W. Chu, S.Y. Chen, T.H. Tsai, T.M. Liu, C.Y. Lin, H.J. Tsai and Chi-Kuang Sun, "In vivo developmental biology study using noninvasive multi-harmonic generation microscopy," *Opt. Express*, **11** (23), 3093-3099 (2003).
- [Chu, 2004] S.W. Chu, S. Y. Chen, G. W. Chern, T.H. Tsai, Y.C. Chen, B. L. Lin and C.K. Sun, "Studies of $\chi^{(2)}/\chi^{(3)}$ tensors in submicron-scaled bio-tissues by polarization harmonics optical microscopy," *Biophys. J.*, **86**, 3914-3922 (2004).
- [Cohen, 1960] J. Cohen, "A coefficient of agreement for nominal scales," *Educ. Psychol. Meas.*, **20**, 27-46 (1960).
- [Cox, 2002] G. Cox, F. Manconi and E. Kable, "Second harmonic imaging of collagen in mammalian tissue," *Proc. SPIE*, **4620**, 148-156 (2002).
- [Cox, 2003] G. Cox, E. Kable, A. Jones, I. Fraser, F. Manconi and M. D. Gorrell, "3-Dimensional imaging of collagen using second harmonic generation," *J. Struct. Biol.*, **141**, 53-62 (2003).
- [Cox, 2005] G. Cox and J. Feijo, "Second harmonic imaging of plant polysaccharides," *J. Biomed. Opt* **10**, 024013-024018 (2005).
- [Czaja, 2004] A.J. Czaja and H.A. Carpenter, "Decreased fibrosis during corticosteroid therapy of autoimmune hepatitis," *J. of Hepatol.*, **40**, 646-652 (2004).
- [Dahab, 2004] G.M. Dahab, M.M. Kheriza, H.M. El-Beltagi, A.-M.M. Fouda and O.A.S. El-Din, "Digital quantification of fibrosis in liver biopsy sections : Description of a new method by Photoshop software," *J. Gastroent. and Hepat.*, **19**, 78-85 (2004).
- [Daria, 1998] V. Daria, C.M. Blanca, O. Nakamura, S. Kawata and C. Saloma, "Image contrast enhancement for two-photon fluorescence microscopy in a turbid medium," *Applied Optics*, **37**(34), 7960-7967 (1998).
- [Débarre, 2006] D. Débarre, A.-M. Pena, W. Supatto, T. Boulesteix, M. Strupler, M.-P. Sauviat, J.-L. Martin, M.-C. Schanne-Klein et E. Beaurepaire, "Microscopies multiharmoniques pour l'imagerie structurale de tissus intacts," *Médecine/Sciences*, **22**, 845-50 (2006).
- [Deng, 2002] X. Deng, X. Gan and M. Gu, "Multiphoton fluorescence microscopic imaging through doublelayer turbid tissue media," *J. of App. Phys.*, **91**(7), 4659-4665 (2002).
- [Denk, 1990] W. Denk, J.H. Strickler and W.W. Webb, "Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy," *Science*, **248** (4951), 73-76 (1990).
- [Denk & Svoboda, 1997] W. Denk and K. Svoboda, "Why Multiphoton Imaging Is More than a Gimmick," *Neuron*, **18**, 351-357 (1997).
- [Deuffic, 1999] S. Deuffic, L. Buffat, T. Poynard and A.-J. Valleron, "Modeling the Hepatitis C Virus Epidemic in France," *Hepatology*, **29** (5), 1596-1601 (1999).
- [Di Lullo, 2002] G.A. Di Lullo, S.M. Sweeney, J. Körkkö, L. Ala-Kokko, J.D. San Antonio, "Mapping the Ligand-binding Sites and Disease-associated Mutations on the Most Abundant Protein in the Human, Type I Collagen," *J. Biol. Chem.* **277** (6) : 4223-4231 (2002).
- [Diaspro, 2002] A. Diaspro, "Confocal and Two-Photon Microscopy : Foundations, Applications, and Advances," A.J. Wiley & Sons, Inc., Publications, Genoa Italy (2002).
- [Duncan, 1982] M.D. Duncan, J. Reintjes and T.J. Manuccia, "Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope," *Optics Letters*, **7**(8), 350-352 (1982).
- [Dombeck, 2003] D. A. Dombeck, K. A. Kasischke, H. D. Vishwasrao, M. Ingelsson, B. T. Hyman and W. W. Webb, "Uniform polarity microtubule assemblies imaged in native brain tissue by second-harmonic generation microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 7081-7086 (2003).

- [Dombeck, 2004] D. A. Dombeck, M. Blanchard-Desce and W. W. Webb, "Optical Recording of Action Potentials with Second-Harmonic Generation Microscopy," *J. of Neurosc.*, **24**(4), 999-1003 (2004).
- [Dumont, 1986] B.L. Dumont, "Muscle Structure, conférence sur La Restructuration des Viandes," Versailles (France), FR8604565, ErtiParis (1986).
- [Elias & Elias, 2002] M. Elias and G. Elias, "New and fast calculation for incoherent multiple scattering," *J. Opt. Soc. Am. A*, **19**(5), 894-901 (2002).
- [Fawcett, 2006] T. Fawcett, "An introduction to ROC analysis," *Patt. Recogn. Letters*, **27**, 861-874 (2006).
- [Feldmann, 1995] G. Feldmann, "Critical analysis of the methods used to morphologically quantify hepatic fibrosis," *J. Hepatol.*, **22** (Suppl 2), 49-54 (1995).
- [Fratzl, 2003] P. Fratzl, "Cellulose and collagen : from fibres to tissues," *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **8** (1), 32-39 (2003).
- [Freund, 1986] I. Freund and M. Deutsch, "Second-harmonic microscopy of biological tissue," *Opt. Lett.*, **11**, 94-96 (1986).
- [Gailhouste, 2009(thèse)] L. Gailhouste, "Spécificité fonctionnelle de la voie des MAP Kinases MEK/ERK dans la croissance tumorale des cellules hépatiques transformées; Microscopie multiphoton appliquée à l'étude de la fibrose du foie," Thèse de doctorat, Unité de Recherche EA 4427 SeRAIC-INSERM U522, Université de Rennes 1, soutenue le 14 septembre 2009.
- [Gailhouste, 2010] L. Gailhouste, Y. Le Grand, C. Odin, D. Guyader, B. Turlin, F. Ezan, Y. Désille, T. Guilbert, A. Bessard, C. Frémin, N. Theret and G. Baffet, "Fibrillar collagen scoring by second harmonic microscopy : A new tool in the assessment of liver fibrosis," *J. of Hepatol.*, **52** (3), 398-406 (2010).
- [Gan, 1998] X.S. Gan, S.P. Schilders and M. Gu, "Image formation in turbid media under a microscope," *J. Opt. Soc. Am. A*, **15**(8), 2052-2058 (1998).
- [Gannaway, 1978] J.N. Gannaway and C.J.R. Sheppard, "Second-harmonic imaging in the scanning optical microscope," *Optic. and Quantum Elec.*, **10**, 435-439 (1978).
- [Gao, 2006] L. Gao, L. Jin, P. Xue, J. Xu, Y. Wang, H. Ma, and D. Chen, "Reconstruction of complementary images in second harmonic generation microscopy," *Opt. Express* **14**, 4727-4735 (2006).
- [Gheyle, 1991] M. Gheyle, C. Puttevils and J.P. Logghe, "Sirius red : method for routine analysis of collagen fibers," *Revue française d'histotechnologie*, **4** (1), 7-10 (1991).
- [Glazer, 1996] A. M. Glazer, J. G. Lewis and W. Kaminsky, "An automatic optical imaging system for birefringent media," *Proc. R. Soc. London Series*, **A452**, 2751-2765 (1996).
- [Gobinet, 2008] C. Gobinet, V. Vrabie, O. Piot and M. Manfait, "Preprocessing and source separation methods for Raman spectra analysis of biomedical samples," *IRBM*, **29** (1), 13-19 (2008).
- [Golovan, 2001] L.A. Golovan, V.Y. Timoshenko, A.B. Fedotov, L.P. Kuznetsova, D.A. Sidorov-Biryukov, P.K. Kashkarov, A.M. Zheltikov, D. Kovalev, N. Kunzner, E.Gross, J. Diener, G. Poliski and F.Koch, "Phasematching of second-harmonic generation in birefringent porous silicon," *Appl. Phys. B*, **73**, 31-34 (2001).
- [Gong, 2008] B. Gong, J. Sun, G. Vargas, Q. Chang, Y. Xu, D. Srivastava and P. J. Boor, "Nonlinear imaging study of extracellular matrix in chemical-induced, developmental dissecting aortic aneurysm : evidence for defective collagen type III," *Birth Defects Res ; A Clin. Mol. Teratol.*, **82**, 16-24 (2008).

- [Goodman, 2007] Z.D. Goodman, "Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases," *J. Hepatol.*, **47**, 598-607 (2007).
- [Göppert-Meyer, 1931] M. Göppert-Meyer, "Über Elementarakte mit zwei Quantensprungen. Göttinger Dissertation," *Ann. Phys.* **9**, 273-294 (1931).
- [Gosker, 2000] H.R. Gosker, E.F.M. Wouters, G.J. van der Vusse and A.M.W.J. Schols, "Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease and chronic heart failure : underlying mechanisms and therapy perspectives," *Am. J. Clin. Nutr.*, **71**, 1033-1047 (2000).
- [Gratton, 1995] E. Gratton and M.J. van de Ven, "Laser sources for confocal microscopy," in *Handbook of Confocal Microscopy* (ed. J.B. Pawley) New York : Plenum, 69-97 (1995).
- [Green, 2009] H.J. Green, M.E. Burnett, C. D'Arsigny, S. Iqbal, J. Ouyang, K.A. Webb and D.E. O'Donnell, "Muscle fiber type characteristics in females with chronic obstructive pulmonary disease. A preliminary study," *J. Mol. Hist.* **40**, 41-51 (2009).
- [Guo, 1996] Y. Guo, P. P. Ho, A. Tirkisliunas, F. Liu and R. R. Alfano, "Optical harmonic generation from animal tissues by the use of picosecond and femtosecond laser pulses," *Appl. Opt.* **35**, 6810-6813 (1996).
- [Guo, 1997] Y. Guo, P. P. Ho, H. Savage, D. Harris, P. Sacks, S. Schantz, F. Liu, N. Zhadin and R. R. Alfano, "Second-harmonic tomography of tissues," *Opt. Lett.*, **22** (17), 1323-1325 (1997).
- [Gupta, 1994] V. K. Gupta and J. A. Kornfield, "Polarization modulation laser scanning microscopy : A powerful tool to image molecular orientation and order," *Rev. Sci. Instrum.*, **65** (9), 2823-2828 (1994).
- [Han, 2008] X. Han, R. M. Burke, M. L Zettel, P. Tang and E. B. Brown, "Second harmonic properties of tumor collagen : determining the structural relationship between reactive stroma and healthy stroma," *Opt. Express* **16** (3), 1846-1859 (2008).
- [Harris, 1976] P.V. Harris, "Structural and other aspects of meat tenderness," *J. of Texture Studies*, **7** (1), 49-63 (1976).
- [Heinz, 1983] T. F. Heinz, H. W. K. Tom and Y. R. Shen, "Determination of molecular orientation of monolayer adsorbates by optical second-harmonic generation," *Phys. Rev. A* **28**, 1883-1885 (1983).
- [Hell, 1996] S.W. Hell, K. Bahlmann, M. Schrader, A. Soini, H. Malak, I. Gryczynski and J.R. Lakowicz, "Three-Photon Excitation in Fluorescence Microscopy," *J. of Biomed. Opt.*, **1**(1), 71-74 (1996).
- [Hellwarth, 1974] R. Hellwarth and P. Christensen, "Nonlinear optical microscopic examination of structure in polycrystalline *ZnSe*," *Opt. Com.*, **12**(3), 318-322 (1974).
- [van Heuningen, 1982] R. van Heuningen, W. H. Rijnsburger and H. E. ter Keurs, "Sarcomere length control in striated muscle," *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **242**, H411-H420 (1982).
- [Hodge, 1963] A. J. Hodge and J. A. Petruska, "Aspects of protein structure," Academic Press, New York (1963).
- [Huxley & Niedergerke, 1954] A.F. Huxley and R. Niedergerke, "Structural changes in muscle during contraction - Interference microscopy of living muscle fibres," *Nature*, **4412**, 971-973 (1954).
- [Issa, 2004] R. Issa, X. Zhou, C.M. Constandinou, J. Fallowfield, H. Millward-Sadler, M.D. Gaca, E. Sands, I. Suliman, N. Trim, A. Knorr, M.J. Arthur, R.C. Benyon and J.P. Iredale, "Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis : evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking," *Gastroenterol.*, **126**, 1795-1808 (2004).
- [Jiang, 1998] S.T. Jiang, "Contribution of Muscle Proteinases to Meat Tenderization," *Proc. Nat. Sc. Council, ROC, Part B* **22**, 97-107 (1998).

- [Jonkman, 2002] J.E.N. Jonkman and E.H.K. Stelzer, "Confocal and Two-Photon Microscopy : Foundations, Applications and Advances," chapitre 5 : Resolution and Contrast in Confocal and Two-Photon Microscopy. John Wiley & Sons, (2002).
- [Kaiser & Garrett, 1961] W. Kaiser and C.G.B. Garrett, "Two-Photon Excitation in $CaF_2 : Eu^{2+}$ ", P.R.L., **7**(6), 229-231 (1961).
- [Kawai & Kuntz, 1973] M. Kawai and I.D. Kuntz, "Optical diffraction studies of muscle fibres," Biophys. J., **13**, 857-876 (1973).
- [Kleinman, 1962] D. A. Kleinman, "Nonlinear Dielectric Polarization in Optical Media," Phys. Rev. **126**, 1977-1979 (1962).
- [König, 2000] K. König, "Multiphoton microscopy in life sciences," J. of Microscopy, **200**(2), 83-104 (2000).
- [König, 2007] K. König, A. Ehlers, I. Riemann, S. Schenkl, R. Bückle and M. Kaatz, "Clinical Two-Photon Microendoscopy," Microscopy Research and Technique, **70** 398-402 (2007).
- [Kwan, 2008] A.C. Kwan, D.A. Dombeck and W.W. Webb, "Polarized microtubule arrays in apical dendrites and axons," PNAS, **105** (32), 11370-11375 (2008).
- [Kwan, 2009] A.C. Kwan, K. Duff, G.K. Gouras and W.W. Webb, "Optical visualization of Alzheimer's pathology via multiphoton-excited intrinsic fluorescence and second harmonic generation," Opt. Express, **17** (5), 3679-3689 (2009).
- [Kweon, 2001] Y.O. Kweon, Z.D. Goodman, J.L. Dienstag, E.R. Schiff, N.A. Brown, E. Burchardt, R. Schoonhoven, D.A. Brenner and M.W. Fried, "Decreasing fibrogenesis : an immunohistochemical study of paired liver biopsies following lamivudine therapy for chronic hepatitis B," J. Hepatol., **35**, 749-755 (2001).
- [Lacomb, 2008] R. Lacomb, O. Nadiarnykh and P. J. Campagnola, "Quantitative second harmonic generation imaging of the diseased state osteogenesis imperfecta : experiment and simulation," Biophys. J. **94**, 4504-4514 (2008).
- [Landis, 1977] J.R. Landis, G.G. Koch, "The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data," Biometrics, **33**, 159-174 (1977).
- [Le Grand, 2008] Y. Le Grand, A. Leray, T. Guilbert and C. Odin, "Non-descanned versus descanned epifluorescence collection in two-photon microscopy : Experiments and Monte Carlo simulations," Opt. Com., **281**(21), 5480-5486 (2008).
- [Lepetit & Culioli, 1994] J. Lepetit and J. Culioli, "Mechanical properties of meat," Meat Science, **36** (1-2), 203-237 (1994).
- [Leray, 2004] A. Leray, L. Leroy, Y. Le Grand, C. Odin, A. Renault, V. Vié, D. Rouède, T. Mallegol, O. Mongin, M. H. V. Werts and M. Blanchard-Desce, "Organization and orientation of amphiphilic push-pull chromophores deposited in Langmuir-Blodgett monolayers studied by second-harmonic generation and atomic force microscopy," Langmuir **20**, 8165-8171 (2004).
- [Leray, 2005] A. Leray, "Microscopie multiphotonique appliquée à la biologie", Ph.D Thesis, Université de Rennes 1 (2005).
- [Leray, 2006a] A. Leray, C. Odin, E. Huguet, F. Amblard and Y. Le Grand, "Spatially distributed two-photon excitation fluorescence in scattering media : Experiments and time-resolved Monte Carlo simulations," Opt. Com., **272**(1), 269-278 (2007).
- [Leray, 2006b] A. Leray and J. Mertz, "Rejection of two-photon fluorescence background in thick tissue by differential aberration imaging," Opt. Express **14**(22) 10565-10573 (2006).

- [Leray, 2008] A. Leray, C. Odin and Y. Le Grand, "Out-of-focus fluorescence collection in two-photon microscopy of scattering media," *Opt. Com.*, **281**(24), 6139-6144 (2008).
- [Lewin, 2007] M. Lewin, A. Poujol-Robert, P.Y. Boelle, D. Wendum, E. Lasnier, M. Viallon, J. Guechot, C. Hoeffel, L. Arrive, J.M. Tubiana and R. Poupon, "Diffusion-weighted magnetic resonance imaging for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C," *Hepatology*, **46**, 658-665 (2007).
- [Lin, 1989] L.I. Lin, "A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility," *Biometrics*, **45**(1), 255-68 (1989).
- [Lin, 2000] L.I. Lin, "A note on : A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility," *Biometrics*, **56**, 324-325 (2000).
- [Listrat, 1998] A. Listrat, B. Picard and Y. Geay, "Age-related changes and location of type I, III and IV collagens during skeletal muscle development of double-muscled and normal bovine fetuses," *J. of Muscle Res. and Cell Mot.*, **19**, 1-14 (1998).
- [Listrat, 2000] A. Listrat, C. Lethias, J.F. Hocquette, G. Renand, F. Ménissier, Y. Geay and B. Picard, "Age-related changes and location of types I, III, XII and XIV collagen during development of skeletal muscles from genetically different animals," *The Histochemical Journal*, **32**, 349-356 (2000).
- [Llewellyn, 2008] M.E. Llewellyn, R.P.J. Barretto, S.L. Delp and M.J. Schnitzer, "Minimally invasive high-speed imaging of sarcomere contractile dynamics in mice and humans," *Nature*, **454**, 784-788 (2008).
- [Lo, 2010] W.-L. Lo, J.-Y. Lai, S.E. Feinberg, K. Izumi, S.-Y. Kao, C.-S. Chang, A. Lin and H.K. Chiang, "Raman spectroscopy monitoring of the cellular activities of a tissue-engineered ex vivo produced oral mucosal equivalent," *J. Raman Spectrosc.*, (Articles online in advance of print) (2010).
- [Marsh, 2003] P. Marsh, D. Burns and J. Girkin, "Practical implementation of adaptive optics in multi-photon microscopy," *Opt. Express*, **11**, 1123-1130 (2003).
- [Mardia, 2000] K. V. Mardia and P. E. Jupp, "Directional Statistics," John Wiley and Sons Ltd, Chichester (2000).
- [Massoumian, 2003] F. Massoumian, R. Juskaitis, M. A. A. Neil and T. Wilson, "Quantitative polarized light microscopy," *J. Microscopy*, **209** (1), 13-22 (2003).
- [Maunier-Sifre, 2005] L. Sifre, P. Berge, E. Engel, J.F. Martin, J.-M. Bonny, A. Listrat, R. Taylor and J. Culioli, "Influence of the Spatial Organization of the Perimysium on Beef Tenderness," *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 8390-8399 (2005).
- [Mazely, 1987] T. L. Mazely and W. M. Hetherington, "Second-order susceptibility tensors of partially ordered molecules on surfaces," *J. Chem. Phys.* **86**, 3640-3647 (1987).
- [McCormick, 1994] R.J. McCormick, "The flexibility of the collagen compartment of musclestar," *Meat Science*, **36** (1-2), 79-91 (1994).
- [Meade, 2005] A.D. Meade, H.J. Byrne and F.M. Lyng, "Correlation of spectroscopic and biochemical assays postionising radiation exposure in human skin cell analogues," conference papers, Dublin Institute of Technology (2005).
- [Mertz, 2001] J. Mertz and L. Moreaux, "Second-harmonic generation by focused excitation of inhomogeneously distributed scatterers," *Opt. Com.*, **196**, 325-330 (2001).
- [Minsky, 1988] M. Minsky, "Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope," *Scanning*, **10**, 128-138 (1988).
- [Mohler, 2003] W. Mohler, A. C. Millard and P. J. Campagnola, "Second harmonic generation imaging of endogenous structural proteins," *Methods*, **29**, 97-109 (2003).

- [Morishige, 2007] N. Morishige, A. J. Wahlert, M. C. Kenney, D. J. Brown, K. Kawamoto, T. Chikama, T. Nishida and J. V. Jester, "Second-harmonic imaging microscopy of normal human and keratoconus cornea," *Invest Ophthalmol Vis. Sci.*, **48**, 1087-1094 (2007).
- [Nicastro, 2005] D. Nicastro, J.R. McIntosh and W. Baumeister, "3D structure of eukaryotic flagella in a quiescent state revealed by cryo-electron tomography," *PNAS*, **102**, 15889-15894 (2005).
- [Nishimura, 1996] T. Nishimura, K. Ojima, A. Liu, A. Hattori and K. Takahashi, "Structural changes in the intramuscular connective tissue during development of bovine semitendinosus muscle," *Tissue & Cell*, **28** (5), 527-536 (1996).
- [Nishiumi, 1999] T. Nishiumi, "Intramuscular connective tissue : its relation to meat texture and post-mortem alterations," *Recent res. dev. in agricultural & food chem.*, **3**, 159-179 (1999).
- [Nishimura, 1994] T. Nishimura, A. Hattori and K. Takahashi, "Ultrastructure of the Intramuscular Connective Tissue in Bovine Skeletal Muscle," *Acta Anatomica*, **151**, 250-257 (1994).
- [Nishimura, 2002] T. Nishimura, E. Futami, A. Taneichi, T. Mori and A. Hattori, "Decorin expression during development of bovine skeletal muscle and its role in morphogenesis of the intramuscular connective tissue," *Cells Tissues Organ*, **171**, 199-214 (2002).
- [Nucciotti, 2009] V. Nucciotti, C. Stringari, L. Sacconi, F. Vanzi, L. Fusi, M. Linari, G. Piazzesi, V. Lombardi and F.S. Pavone, "Probing myosin structural conformation in vivo by second-harmonic generation microscopy," *PNAS*, **107** (17), 7763-7768 (2010).
- [Noorlander, 2002] M. L. Noorlander, P. Melis, A. Jonker, and C. J.F. Van Noorden, "A Quantitative Method to Determine the Orientation of Collagen Fibers in the Dermis," *J. Histochem. Cytochem.*, **50**, 1469-1474 (2002).
- [Nye, 1985] J. F. Nye, "*Physical Properties of Crystals*," (Oxford University Press, Oxford) (1985).
- [Odin, 2006] C. Odin C, "NMR studies of Phase Transitions," *Ann. Rep. NMR Spectr.*, **59**, 107-183 (2006).
- [Odin, 2007] C. Odin, Y. Le Grand, A. Renault, L. Gailhouste and G. Baffet, "Orientation fields of nonlinear biological fibrils by second harmonic generation microscopy," *J. Microsc.*, **229** (1), 32-38 (2007).
- [Odin, 2008] C. Odin, T. Guilbert, A. Alkilani, O.P. Borynska, V. Fleury and Y. Le Grand, "Collagen and myosin characterisation by orientation field second harmonic microscopy," *Opt. Express* **16**, 16151-16165 (2008).
- [Odin, 2009] C. Odin, C. Heichette, D. Chretien and Y. Le Grand, "Second harmonic microscopy of axonemes," *Opt. Express*, **17** (11), 9235-9240 (2009).
- [Oheim, 2001] M. Oheim, E. Beaurepaire, E. Chaigneau, J. Mertz and S. Charpak, "Two-photon microscopy in brain tissue : parameters influencing the imaging depth," *J. of Neurosc. Meth.*, **111**(1), 29-37 (2001).
- [Oldenbourg, 1998] R. Oldenbourg, E. D. Salmon and P. T. Tran, "Birefringence of Single and Bundled Microtubules," *Biophys. J.*, **74** 645-654 (1998).
- [Panula, 1998] H. E. Panula, M. M. Hyttinen, J. P. A. Arokoski, T. K. Långsjö, A. Pelttari, I. Kiviranta and H. J Helminen, "Articular cartilage superficial zone collagen birefringence reduced and cartilage thickness increased before surface fibrillation in experimental osteoarthritis," *Ann. Rheum. Dis.*, **57** 237-245 (1998).
- [Parry, 1984] D. A. D. Parry and A. S. Craig, "Growth and development of collagen fibrils in connective tissue," A. Ruggeri and P. M. Motta, Editors, *Ultrastructure of the Connective Tissue Matrix*, Nijhoff, Boston (1984).

- [Peleg, 1999] G. Peleg, A. Lewis, M. Linial and L. M. Loew, "Nonlinear optical measurement of membrane potential around single molecules at selected cellular sites," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6700-6704 (1999).
- [Pena, 2005] A.M. Pena, T. Boulesteix, T. Dartigalongue and M.C. Schanne-Klein, "Chiroptical effects in the second harmonic signal of collagens I and IV," *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 10314-10322 (2005).
- [Pena, 2007] A.M. Pena, A. Fabre, D. Debarre, J. Marchal-Somme, B. Crestani, J.L. Martin, E. Beaurepaire and M. C. Schanne-Klein, "Three-dimensional investigation an scoring of extracellular matrix remodeling during lung fibrosis using multiphoton microscopy," *Microsc. Res. Tech.*, **70**, 162-170 (2007).
- [Perentes, 2009] J. Y. Perentes, T. D. McKee, C. D. Ley, H. Mathiew, M. Dawson, T. P. Padera, L. L. Munn, R. K. Jain and Y. Boucher, "In vivo imaging of extracellular matrix remodeling by tumor-associated fibroblasts," *Nat. Methods* **6**, 143-145 (2009).
- [Perz, 2006] J.F. Perz, G.L. Armstrong, L.A. Farrington, Y.J.F. Hutin and B.P. Bell, "The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide," *J. of Hepatol.*, **45** (4), 529-538 (2006).
- [Plotnikov, 2006a] S. Plotnikov, A. Millard, P. J. Campagnola and W. A. Mohler, "Characterization of the Myosin-Based Source for Second-Harmonic Generation from Muscle Sarcomeres," *Biophys. J.*, **90**, 693-703 (2006).
- [Plotnikov, 2006b] S. Plotnikov, V. Juneja, A. B. Isaacson, W. A. Mohler and P. J. Campagnola, "Optical Clearing for Improved Contrast in Second Harmonic Generation Imaging of Skeletal Muscle," *Biophys. J.*, **90**, 328-339 (2006).
- [Plotnikov, 2008] S.V. Plotnikov, A.M. Kenny, S.J. Walsh, B. Zubrowski, C. Joseph, V.L. Scranton, G.A. Kuchel, D. Dauser, M. Xu, C.C. Pilbeam, D.J. Adams, R.P. Dougherty, P.J. Campagnola and W. A. Mohler, "Measurement of muscle disease by quantitative second-harmonic generation imaging," *J. Biomed. Opt.*, **13**, 044018 (2008).
- [Pollack, 1990] G. H. Pollack, "Muscles & Molecules : Uncovering the Principles of Biological Motion," Ebner & Sons Pub. (1990).
- [Poynard, 2003] T. Poynard, J. McHutchison, M. Manns, R.P. Myers and J. Albrecht, "Biochemical surrogate markers of liver fibrosis and activity in a randomized trial of peginterferon alfa-2b and ribavirin," *Hepatology*, **38**, 481-492 (2003).
- [Provenzano, 2006] P. P. Provenzano, K. W. Eliceiri, J. M. Campbell, D. R. Inman, J. G. White and P. J. Keely, "Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion," *BMC Med.* **4**, 38 (2006).
- [Provenzano, 2008] P. P. Provenzano, D. R. Inman, K. W. Eliceiri, J. G. Knittel, L. Yan, C. T. Rueden, J. G. White and P. J. Keely, "Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression," *BMC Med.*, **6**, 11 (2008).
- [Psilodimitrakopoulos, 2009a] S. Psilodimitrakopoulos, D. Artigas, G. Soria, I. Amat-Roldan, A.M. Planas and P. Loza-Alvarez, "Quantitative discrimination between endogenous SHG sources in mammalian tissue based on their polarization response," *Opt. Express*, **17**, 10168-10176 (2009).
- [Psilodimitrakopoulos, 2009b] S. Psilodimitrakopoulos, V. Petegnief, G. Soria, I. Amat-Roldan, D. Artigas, A.M. Planas and P. Loza-Alvarez, "Estimation of the effective orientation of the SHG source in primary cortical neurons," *Opt Express*, **17** (16), 14418-14425 (2009).

- [Psilodimitrakopoulos, 2009c] S. Psilodimitrakopoulos, S.I.C.O. Santos, I. Amat-Roldan and A.K.N. Thayil, "In vivo, pixel-resolution mapping of thick filaments' orientation in nonfibrillar muscle using polarization-sensitive second harmonic generation microscopy," *J. of Biomed. Opt.*, **14** (1), 014001 (2009).
- [Ralston, 2008] E. Ralston, B. Swaim, M. Czapiga, W. L. Hwu, Y. H. Chien, M. G. Pittis, B. Bemb, O. Schwartz, P. Plotz, and N. Raben, "Detection and Imaging of Non-Contractile Inclusions and Sarcomeric Anomalies in Skeletal Muscle by Second Harmonic Generation Combined with Two-Photon Excited Fluorescence," *J. Struct. Biol.*, **162** (3), 500-508 (2008).
- [Recher, 2009] G. Recher, D. Rouède, P. Richard, A. Simon, J. J. Bellanger, F. Tiaho, "Three distinct sarcomeric patterns of skeletal muscle revealed by SHG and TPEF Microscopy," *Opt. Exp.*, **17** (22), 19763-19777 (2009).
- [Regev, 2002] A. Regev, M. Berho, L.J. Jeffers, C. Milikowski, E.G. Molina, N.T. Pysopoulos, Z.Z. Feng, K.R. Reddy and E.R. Schiff, "Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection," *Am. J. Gastroenterol.*, **97**, 2614-2618 (2002).
- [Ricard-Blum, 1992] S. Ricard-Blum, S. Bresson-Hadni, D.A. Vuitton, G. Ville and J.A. Grimaud, "Hydroxypyridinium collagen cross-links in human liver fibrosis : study of alveolar echinococcosis," *Hepatology* **15**, 599-602 (1992).
- [Roth, 1979] S. Roth and I. Freund, "Second harmonic generation in collagen," *J. Chem. Phys.* **70** (4), 1637-1643 (1979).
- [Sandrin, 2003] L. Sandrin, B. Fourquet, J.M. Hasquenoph, S. Yon, C. Fournier, F. Mal, C. Christidis, M. Ziol, B. Poulet, F. Kazemi, M. Beaugrand and R. Palau, "Transient elastography : a new non-invasive method for assessment of hepatic fibrosis," *Ultrasound Med. Biol.*, **29**, 1705-1713 (2003).
- [Sevrain, 2010] D. Sevrain, "Mémoire de fin d'étude : Mise en place d'une expérience de microscopie multiphotonique," LSOL, UBO, Brest (2010).
- [Shen, 1989] Y. R. Shen, "Surface properties probed by second-harmonic and sum-frequency generation," *Nature* **337**, 519-525 (1989).
- [Schenke-Layland, 2006] K. Schenke-Layland, I. Riemann, O. Damour, U.A. Stock and K. König, "Two-photon microscopes and in vivo multiphoton tomographs . Powerful diagnostic tools for tissue engineering and drug delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, **58**, 878-896 (2006).
- [Schmitt, 1979] O. Schmitt, T. Degas, P. Perot, M.R. Langlois and B.L. Dumont, "Etude morpho-anatomique du périnysium - Méthodes de description et d'évaluation," *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **19** (1A), 1-30 (1979).
- [Sheppard, 1977] C.J.R. Sheppard, J.N. Gannaway, R. Kompfner and D. Walsh, "The scanning harmonic optical microscope," *IEEE J. of Quantum Elec.*, QE13 :100D (1977).
- [Singh & Bradley, 1964] S. Singh and L.T. Bradley, "Three-Photon Absorption in Naphtalene Crystals by Laser Excitation," *P.R.L.*, **12**(22), 612-614 (1964).
- [Squier, 1987] J.M. Squier and P. J. Vibert, "Fibrous Protein Structure," Academic Press, (1987).
- [Squier, 1998] J.A. Squier, D.N. Fittinghoff, C.P.J. Barty, K.R. Wilson, M. Müller and G.J. Brakenhoff, "Characterization of femtosecond pulses focused with high numerical aperture optics using interferometric surface-third-harmonic generation," *Opt. Com.*, **147**, 153-156 (1998).
- [Stoller, 2002] P. Stoller, K. M. Reiser, P. M. Celliers and A. M. Rubenchik, "Polarization-modulated second harmonic generation in collagen," *Biophys. J.*, **82**, 3330-3342 (2002).

- [Stromer, 1974] M.H. Stromer, D.E. Goll, R.B. Young, R.M. Robson and F.C. Parrish, "Ultrastructural features of skeletal muscle differentiation and development," *Jr. J. Anim Sci.* **38**, 1111-1141 (1974).
- [Strupler, 2007] M. Strupler, A. M. Pena, M. Hernest, P. L. Tharaux, J. L. Martin, E. Beaurepaire and M. C. Schanne-Klein, "Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues," *Opt. Express*, **15**, 4054-4065 (2007).
- [Strupler, 2008(a)] M. Strupler, M. Hernest, C. Fligny, J. L. Martin, P. L. Tharaux and M. C. Schanne-Klein, "Second harmonic microscopy to quantify renal interstitial fibrosis and arterial remodeling," *J. Biomed. Opt.*, **13**, 054041 (2008).
- [Strupler, 2008(thèse)] M. Strupler, "Imagerie du collagène par microscopie multiphotonique; Application aux fibroses rénales," Thèse de doctorat de l'École Polytechnique, Paris, soutenue le 27 novembre 2008.
- [Sun, 2003] C-K. Sun, S-W. Chua, S-Y. Chen, T-H. Tsai, T-M. Liu, C-Y. Lin and H-J. Tsai, "Higher harmonic generation microscopy for developmental biology," *J. of Struct. Bio.*, **147**(1), 19-30 (2004).
- [Sun, 2006] Y. Sun, W-L. Chen, S-J. Lin, S-H. Jee, Y-F. Chen, L-C. Lin, P. T. C. So and Chen-Yuan Dong, "Investigating Mechanisms of Collagen Thermal Denaturation by High Resolution Second-Harmonic Generation Imaging," *Biophys. J.*, **91**, 2620-2625 (2006).
- [Sun, 2008] W. Sun, S. Chang, D. C. Tai, N. Tan, G. Xiao, H. Tang and H. Yu, "Nonlinear optical microscopy : use of second harmonic generation and two-photon microscopy for automated quantitative liver fibrosis studies," *J. Biomed. Opt.* **13**, 064010 (2008).
- [Tai, 2009] D.C.S. Tai, N. Tan, S. Xu, C.H. Kang, S.M. Chia, C.L.C.A. Wee, C.L. Wei, A.M. Raja, G. Xiao, S. Chang and J.C. Rajapakse, "Fibro-C-Index : comprehensive, morphology-based quantification of liver fibrosis using second harmonic generation and two-photon microscopy," *J. of Biomed. Opt.* **14**(4), 044013 (2009).
- [Thampanitchawong, 1999] P. Thampanitchawong and T. Piratvisuth, "Liver biopsy : complications and risk factors," *World J. Gastroenterol.*, **5**, 301-304 (1999).
- [The METAVIR cooperative group, 1993] The METAVIR cooperative group, "Proposition d'une grille de recueil des lésions histopathologiques dans l'hépatite chronique virale C," *Ann. Pathol.*, **13**, 260-265 (1993).
- [Tiaho, 2007] F. Tiaho, G. Recher, and D. Rouède, "Estimation of helical angles of myosin and collagen by second harmonic generation imaging microscopy," *Opt. Express* **15**, 12286-12295 (2007).
- [Vanzi, 2006] F. Vanzi, M. Capitano, L. Sacconi, C. Stringari, R. Cicchi, M. Canepari, M. Maffei, N. Piroddi, C. Poggesi, V. Nucciotti, M. Linari, G. Piazzesi, C. Tesi, R. Antolini, V. Lombardi, R. Bottinelli and F.S. Pavone, "New techniques in linear and non-linear laser optics in muscle research," *J. of Muscle Research and Cell Motility*, **27** (5-7), 469-479 (2006).
- [Vohnsen, 2008] B. Vohnsen and P. Artal, "Second-harmonic microscopy of ex vivo porcine corneas," *J. Microsc.* **232**, 158-163 (2008).
- [Vrabie, 2007] V. Vrabie, C. Gobinet, O. Piot, A. Tfayli, P. Bernard, R. Huez and Michel Manfait, "Independent component analysis of Raman spectra : Application on paraffin-embedded skin biopsies," *Biomedical Signal Processing and Control*, **2** (1), 40-50 (2007).
- [Werkmeister, 2007] E. Werkmeister, H. Kerdjoudj, L. Marchal, J. F. Stoltz and D. Dumas, "Multiphoton microscopy for blood vessel imaging : new non-invasive tools (Spectral, SHG, FLIM)," *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, **37**, 77-88 (2007).

- [Williams, 2005] R.M. Williams, W.R. Zipfel and W.W. Webb, "Interpreting Second-Harmonic Generation Images of Collagen I Fibrils," *Biophys. J.*, **88** (2), 1377-1386 (2005).
- [Wilson, 1984] T. Wilson, C. Sheppard, "Theory and practice of scanning optical microscopy," Academic Press : London (1984).
- [Wise, 1999] F. Wise, "Lasers for two-photon microscopy," in *Imaging : A Laboratory Manual* (ed. R. Yuste, F. Lanni and A. Konnerth), Cold Spring Harbor Press, 18.1-18.9 (1999).
- [Yelin, 2002] D. Yelin, D. Oron, E. Korkotian, M. Segal and Y. Silberberg, "Third-harmonic microscopy with a titanium:sapphire laser," *Appl. Phys. B*, **74**[Suppl.], S97-S101 (2002).
- [Zipfel, 2003a] W.R. Zipfel, R.M. Williams and W.W. Webb, "Nonlinear magic : multiphoton microscopy in the biosciences," *Nature Biotech.*, **21**, 1369-1377 (2003).
- [Zipfel, 2003b] W.R. Zipfel, R.M. Williams, R. Christie, A.Y. Nikitin, B.T. Hyman and W.W. Webb, "Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation," *PNAS*, **100** (12), 7075-7080 (2003).
- [Zoumi, 2002] A. Zoumi, A. Yeh and B. J. Tromberg, "Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence," *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **20**, 11014-11019 (2002).
- [Zoumi, 2004] A. Zoumi, X. Lu, G. S. Kassab and B. J. Tromberg, "Imaging coronary artery microstructure using second-harmonic and two-photon fluorescence microscopy," *Biophys. J.*, **87**, 2778-2786 (2004).

Simulation Monte Carlo

Les principes de propagation de photons que nous avons implémentés s’inspirent des programmes en langage C, de type Monte Carlo également, développé par S.L. Jacques¹. La méthode que nous avons choisie est de considérer que les photons se comportent comme des particules, de vitesse constante c , diffusés par les inhomogénéités de la matière. Ce qui revient donc à un problème de diffusion en trois dimensions par un milieu semi-infini, dépendant principalement de la loi de distribution du libre parcours moyen et de l’anisotropie de la diffusion.

Principe de propagation d’un photon et de sa collection

Pour réaliser ces simulations, il a fallu faire plusieurs hypothèses :

- le milieu diffusant est supposé homogène, non absorbant et semi-infini.
- les phénomènes de phase et de dépolarisation sont ignorés (négligeables dans un milieu diffusant de facteur d’anisotropie élevé).

Les paramètres de chaque photon sont :

- sa position, décrite par les coordonnées x , y et z ,
- sa direction, définie par ses cosinus directeurs μ_x , μ_y et μ_z .

Deux systèmes de coordonnées sont à prendre en compte dans la simulation :

1. Un système de coordonnées cartésien $R_c(x, y, z)$ utilisé pour repérer les trajectoires des photons. L’origine de ce système est un point d’émission original. L’axe z est toujours la normale à l’interface.

1. disponible sur le site :
<http://omlc.org/edu/classroom/ece532/class4/ssmc/mc321.c>

2. Un système de coordonnées sphérique mobile $R_{SM}(\theta, \psi, z')$ utilisé pour décrire les changements de directions des photons. L'axe z' est aligné avec la direction de propagation du photon, et les angles θ (déflexion) et ψ (azimut) servent à décrire le changement de direction du photon.

Les photons sont initialement émis de manière isotrope pour simuler le phénomène de fluorescence, à partir de la position $(x_{initial}, y_{initial}, z_{initial} = (0, 0, 0))$. La direction de chaque photon est définie par ses cosinus directeurs μ dont les coordonnées dans le repère R_c sont :

$$\begin{aligned}\mu_x &= \sin\alpha.\cos\beta \\ \mu_y &= \sin\alpha.\sin\beta \\ \mu_z &= \cos\alpha\end{aligned}\tag{A.1}$$

Le premier pas du photon se fait alors selon cette direction $\vec{\mu}$, sa longueur s étant une variable aléatoire qui dépend de l'inverse du libre parcours moyen μ_t . La longueur de parcours suit la loi de probabilité :

$$p(s) = \mu_t.\exp(-\mu_t.s)\tag{A.2}$$

Matlab nous fourni une routine de base qui est un générateur de nombre aléatoire ξ dans l'intervalle $[0, 1]$. Pour l'utiliser, il faut donc effectuer un changement de variable pour passer de s à ξ . La conservation de la probabilité donne $p(s)ds = d\xi$, qui permet d'obtenir par intégration la relation :

$$s = \frac{-\ln(\xi)}{\mu_t}\tag{A.3}$$

Après tirage d'un nombre aléatoire ξ et calcul du pas s , la nouvelle position du photon dans R_c vaut :

$$\begin{aligned}x &\leftarrow x + \mu_x.s \\ y &\leftarrow y + \mu_y.s \\ z &\leftarrow z + \mu_z.s\end{aligned}\tag{A.4}$$

A partir de là, le premier pas isotrope est donc pris en compte. Pour caractériser la diffusion, on introduit l'angle de déflexion $\theta \in [0, \pi]$ et l'angle azimutal $\psi \in [0, 2\pi]$ dans le repère R_{SM} . La probabilité de distribution $p(\cos\theta)$ pour le cosinus de l'angle de déflexion $\cos\theta$ est décrite par la fonction de diffusion de Henyey & Greenstein :

$$p(\cos\theta) = \frac{1 - g^2}{2(1 + g^2 - 2g \cos\theta)^{3/2}} \quad (\text{A.5})$$

où le facteur d'anisotropie g est égal à : $g = \langle \cos\theta \rangle$. De même que pour le pas s , on peut trouver la transformation qui permet de générer la variable aléatoire $\cos\theta$ à partir du nombre aléatoire ξ distribué uniformément entre 0 et 1 :

$$\cos\theta = \frac{1}{2g} \left(1 + g^2 - \left[\frac{1 - g^2}{1 - g + 2g\xi} \right]^2 \right) \quad (\text{A.6})$$

L'angle azimutal, quant à lui, dans l'hypothèse où la diffusion est produite par des particules de symétrie sphérique, est distribué de façon homogène sur $[0, 2\pi]$ comme :

$$\psi = 2\pi\xi \quad (\text{A.7})$$

La nouvelle position du photon considérée dans R_c sera donc donné par :

$$\begin{aligned} \mu'_x &= \frac{\sin\theta}{\sqrt{1 - \mu_z^2}} (\mu_x \mu_z \cos\psi - \mu_y \sin\psi) + \mu_x \cos\theta \\ \mu'_y &= \frac{\sin\theta}{\sqrt{1 - \mu_z^2}} (\mu_y \mu_z \cos\psi + \mu_x \sin\psi) + \mu_y \cos\theta \\ \mu'_z &= -\sin\theta \cos\psi \sqrt{1 - \mu_z^2} + \mu_z \cos\theta \end{aligned} \quad (\text{A.8})$$

Le photon se déplace alors d'un nouveau pas s suivant la loi décrite par l'équation (4) et selon cette nouvelle direction, ainsi de suite jusqu'à ce qu'il rencontre une condition d'arrêt.

Gestion d'un paquet de photon et algorithme

La vectorisation des routines implique la propagation globale d'un ensemble de photons. Comme nous programmons sous Matlab, nous considérons un paquet (ou "bouffée") de N photons, représenté par un vecteur colonne de taille N , qui subissent tous à l'instant t_α une collision aléatoire (voir organigramme Fig. A.1). Nous avons en effet remarqué que les calculs avec des vecteurs colonnes sont bien plus rapide que les vecteurs lignes pour une raison de gestion de mémoire.

On initialise 3 tableaux de 1 colonne (optimisation des calculs) nuls pour stocker les cosinus directeurs des photons, 3 autres tableaux identiques pour les positions des photons, et enfin un dernier tableau pour stocker les positions en z des photons sortis. Leur taille correspond au nombre de photons prédéfini.

On commence par initialiser les coordonnées du point de départ des photons en valeurs isotropes dans le but de simuler la fluorescence. Pour ce faire, on utilise le générateur de nombre

aléatoire implémenté dans Matlab. Les calculs sont ceux indiqués plus haut dans ce rapport. On test ensuite si la condition de sortie en z est réalisée en comparant le tableau de position des photons en z avec la valeur z_{limite} . Dans ce cas, on conserve dans des tableaux idoines, la position et les cosinus directeurs des photons sortis (ces photons sont alors dit *balistiques*), et on les retire des tableaux servant au calcul des photons qui vont continuer à se propager.

Une fois cette étape d'initialisation réalisée, on entre dans la partie diffusive du programme avec calcul d'un nouveau pas, et de nouvelles positions pour chaque photon restant. A chaque pas, les positions des photons sont testés et conservés le cas échéant. La condition d'arrêt s'effectue dans le cas où 95% des photons sont sortis du plan z_{limite} .

Dans le but de calculer l'efficacité de collection de notre système, on ajoute comme paramètres d'entrées du programme le rayon maximal de propagation des photons (r_{lim}), la distance de travail de l'objectif (wd), le rayon de la lentille frontale de l'objectif (r_{ofa}) ainsi que le rayon du champ de vue du système (r_{fov}). Ces données sont entrées dans un programme général qui fait appel à une fonction pour calculer l'efficacité de collection d'un système en fonction d'une épaisseur z_{limite} à traverser. Nous avons appelé ce programme "efficacité de collection en anneaux" car il est possible de paramétrer la profondeur de l'excitation en fluorescence, ainsi qu'un éventuel décalage par rapport à l'axe du foyer.

Ce programme demande beaucoup plus de ressource mémoire que ceux implémentés précédemment. En effet, pour calculer l'efficacité de collection du système, donc pour effectuer les calculs cités plus haut dans ce rapport, nous avons besoin des positions des photons avant leurs sorties ainsi que de leurs derniers cosinus directeurs. Une fois que 95% des photons sont sortis, on calcule dans un premier temps les coordonnées des photons sortis en $z = wd$, puis, on ne conserve que ceux sortis dans le rayon de la lentille r_{ofa} .

On définit une "boîte" de calcul pour limiter la propagation des photons dans le milieu semi-infini. En effet, si le photon va trop loin dans une direction donnée, on peut considérer que la probabilité qu'il frappe la lentille frontale est extrêmement faible. Dans ce cas, si ses coordonnées indiquent que le photon est sorti de la "boîte" ($\Rightarrow x^2 + y^2 > r_{limite}^2$), alors on le supprime du paquet. Cette limite est fixée à $r_{limite} = 1cm$, limite trouvée en diminuant progressivement la taille de la "boîte", jusqu'à obtenir la plus petite compatible avec la précision souhaitée. Avec cette méthode, le calcul devient de plus en plus rapide puisque le paquet de photons est de plus en plus petit. Le temps de calcul est limité à la fin par le temps de boucle, qui ralentissent les calculs dans ces langages. Une optimisation possible serait de rajouter des photons au paquet restant au dessous d'un certain seuil.

Dans un second temps, on effectue le *raytracing*, pour ne conserver que les photons qui appartiennent au champs de vue du système. Enfin, pour obtenir l'efficacité de collection, on effectue le rapport entre le nombre de photons ainsi collectés sur le nombre de photons envoyés initialement. La figure A.1 est un organigramme qui schématise le déroulement de ce programme.

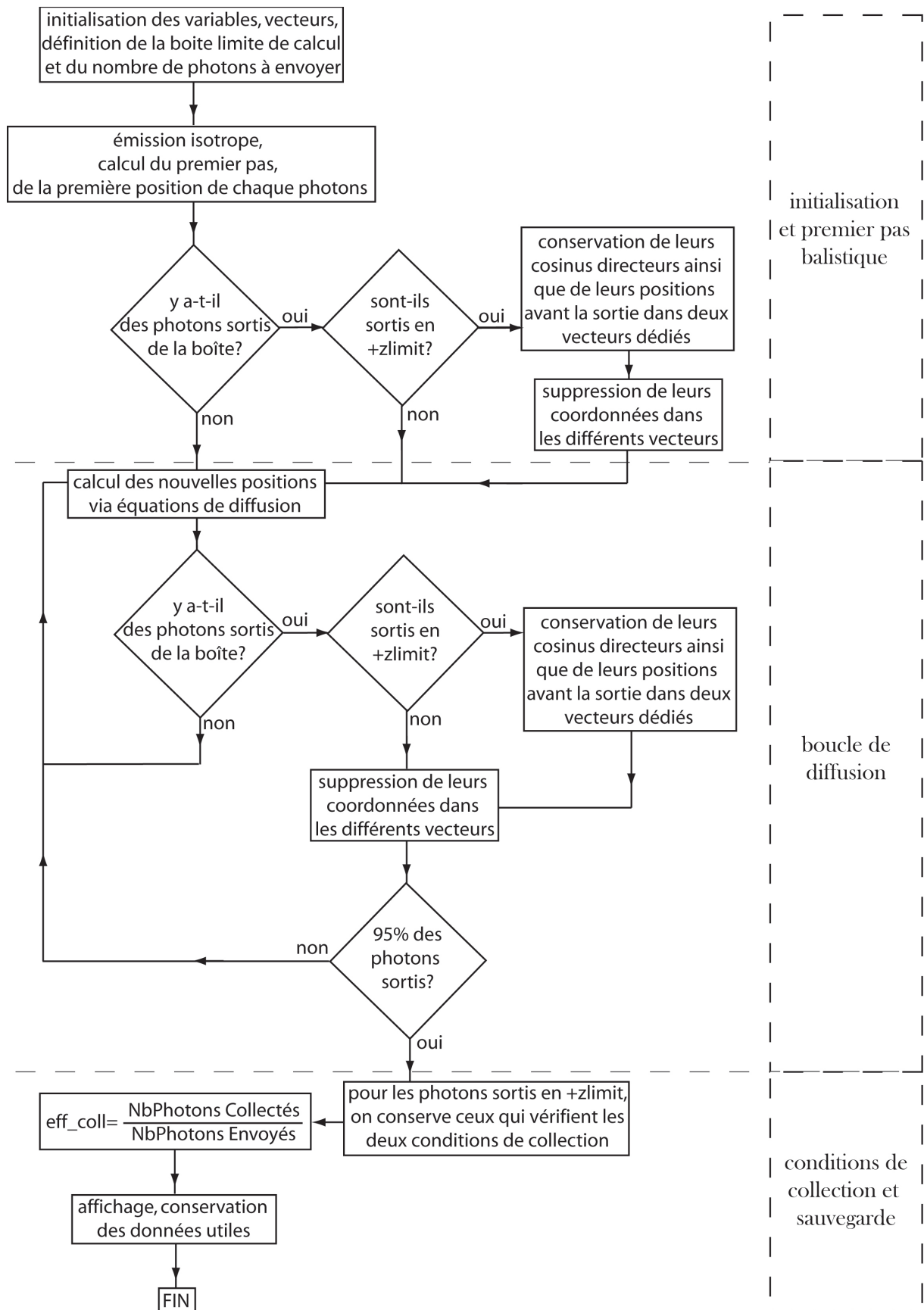


FIGURE A.1 : Organigramme simplifié du programme

Spectroscopie Raman

Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est une technique d'analyse non destructive, basée sur la détection des photons diffusés suite à l'interaction de l'échantillon avec un faisceau de lumière monochromatique. Les photons sont diffusés de manière élastique ou inélastique (figure B.1), et la position des raies contient des informations sur les modes de vibrations (les phonons) de l'échantillon étudié.

Lors de la diffusion élastique (diffusion de Rayleigh), la molécule est excitée vers un état virtuel puis relaxe vers son état initial en émettant un photon à la même longueur d'onde que l'excitatrice. Cette diffusion est typiquement très forte par rapport à l'effet Raman (de l'ordre de $10^6/1$), et il faut filtrer très fortement cette contribution Rayleigh pour pouvoir observer les diffusions inélastiques.

La diffusion inélastique fait apparaître deux composante : la diffusion Stokes et la diffusion anti-Stokes. La diffusion Stokes correspond à la diffusion d'un photon d'énergie inférieure au photon incident, avec création d'un phonon, alors que la diffusion anti-Stokes correspond à la diffusion d'un photon d'énergie supérieure au photon incident, avec annihilation d'un phonon (figure B.1).

Un spectre Raman renseigne sur :

- la nature de la liaison chimique (simple, double, ionique...)
- le degré de liberté de la liaison (rotation, translation...)
- l'environnement direct (matériaux sous-contraintes, dopages éventuels...)

Le micro-spectromètre Raman confocal utilisé pour réaliser nos expériences fait partie du

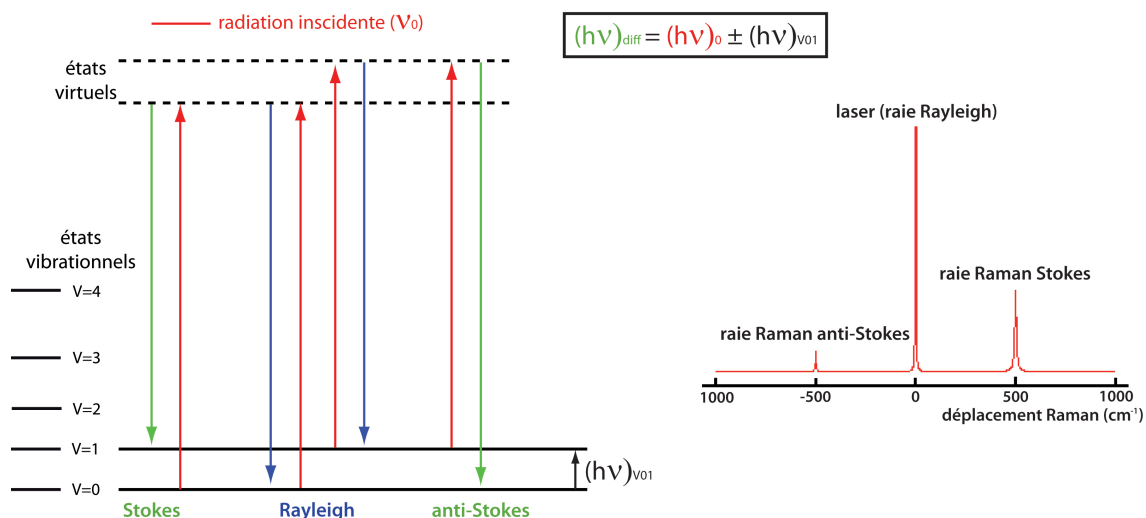


FIGURE B.1 : Schéma de principe de la diffusion Raman et illustration des niveaux d'énergie mis en jeu dans les techniques de spectroscopies Raman. Un spectre témoin est donné.

plateau Raman de la plateforme ONIS de l'Université de Rennes 1 (HR800, Horiba Scientific / Jobin-Yvon). La source est une diode laser dont l'émission est centrée à 785nm (résolution spectrale $0.7\text{cm}^{-1}/\text{pixel}$). L'excitation et la collection se font au travers d'un objectif Olympus ULWD, de grossissement $100\times$ et d'ouverture numérique NA 0.75 (résolution axiale de l'ordre de $2\mu\text{m}$ en mode confocal). Toutes ces expériences ont été réalisées avec Alain MORÉAC de l'équipe biophysique de l'IPR.

Traitement d'image

Nous donnons ici le code de la macro qui permet d'effectuer un score SHG à partir d'une combinaison d'images TPEF/SHG.

Les commentaires sont en italique.

```
// author : Thomas GUILBERT
```



```
// description : Macro à adapter selon les besoins de mesure  
// accepte un fichier stack 2 images, dédié pour le double contraste TPEF/SHG  
// réalise un masque avec la TPEF, l'applique sur la SHG pour ne faire ressortir  
// que le signal généré par le collagène. Idéal pour biopsies
```



```
// NECESSITE IMAGEJ 1.42m ou upgrade
```



```
// Pour faire une mise à jour de votre soft ImageJ :  
// http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/imagej-updater.html  
// Télécharger 'ImageJ_Updater_.class' dans le repertoire 'plugins' de votre ImageJ puis redé-  
marrer votre logiciel.  
// Dans le menu plugins apparaît alors une commande ImageJ Updater.
```



```
//protocole d'ouverture de fichier
```



```
Im1=File.openDialog("Choix de l'image TPEF/SHG");  
open(Im1); //ouverture de l'image  
dir=File.directory;
```

```

tmp=File.nameWithoutExtension;
ddir=dir+tmp;
File.makeDirectory(ddir); //création repertoire de sauvegarde du nom de l'image

run("Stack to Images"); //séparation images tpef/shg
saveAs("tiff", ddir + '/shg'); //sauvegarde image shg puis fermeture
close();
saveAs("tiff", ddir + '/tpef'); //sauvegarde image tpef
//dirtpef= ddir + '$$tpef.tif'; //mise en variable des chemins d'accès vers les images tpef/shg
dirshg=ddir + '
shg.tif';

//traitement pour mask TPEF
run("Mean...", "radius=4"); //filtrage moyenne 4pix*4pix
setMinAndMax(0, 400); //augmentation des contraste
setThreshold(X, 4095); //seuillage
run("Make Binary"); //binarisation

run("Fill Holes"); //remplissage des contours
run("Erode"); //erosion des bords
run("Analyze Particles...", "size=2 circularity=0 show=Nothing clear record");

//paramétrage de la taille de l'objet à sélectionner

count1 = nResults; //count1 contient le nombre d'objets de l'image

for (i=0; i<nResults; i++) //recherche de l'objet le plus gros
x = getResult('XStart', i);
y = getResult('YStart', i);
if (i<count1)
setKeyDown("shift"); //add
else
setKeyDown("alt"); //subtract
doWand(x,y); //selection de l'objet le plus gros

run("Clear Outside"); //on efface tout ce qui est autours

run("Select All");
run("Measure");

```

```
NbPixMask= getResult('%Area', 0);
print(NbPixMask); //affichage de l'aire du mask TPEF
run("Clear Results");
saveAs("tiff", ddir + '/masque_tpef'); //sauvegarde masque tpef
//traitement pour la partie SHG
open(dirshg);
setThreshold(1024, 4095); // seuillage de la SHG

run("Make Binary"); //binarisation
run("Images to Stack"); //stack SHGbin+masque_tpef
run("Stack to Images"); //séparation des images (pas d'erreurs)

imageCalculator("AND create", "masque_tpef", "shg"); //operation AND : (masque_tpef AND
shg_seuillée)
saveAs("tiff", ddir + '/SHGseuil'); //sauvegarde
run("Select All");
run("Measure");
NbPixSHG= getResult('%Area', 0);
print(NbPixSHG); //affichage du nombre de pixel SHG contenu dans l'aire du mask
run("Clear Results");
close()

run("Images to Stack"); //remise en stack des images
run("Make Composite"); //composition RGB
saveAs("tiff", ddir + '/composite'); //sauvegarde
close();

AireSHG=NbPixSHG*100/NbPixMask ;
print(AireSHG); // Aire SHG, scoring.
```


Microscopie multiphotonique de protéines fibrillaires : application à l'étude de la fibrose hépatique

Résumé : Les techniques d'imagerie optique basées sur des effets non linéaires d'interaction onde-matière sont de plus en plus appliquées en biologie. En particulier, la microscopie multiphotonique a l'avantage de fournir une information micrométrique avec une profondeur d'imagerie inégalée dans les tissus vivants, tout en les préservant des effets phototoxiques. De plus, les différentes sources de contrastes endogènes des tissus biologiques permettent de visualiser, sans marquage, l'émission de fluorescence excitée à deux photons (TPEF), ainsi que la génération de seconde harmonique (SHG) de molécules non centrosymétriques dans un milieu présentant une organisation non centrosymétrique, en particulier des protéines fibrillaires telles que certains collagènes et la myosine. La combinaison de ces deux contrastes endogènes permet des applications dans des domaines tels que l'embryologie, les neurosciences ou encore la cancérologie. Dans ce contexte, la microscopie multiphotonique apparaît comme un outil bien adapté à l'étude des protéines fibrillaires présentes dans les tissus biologiques.

Dans ce manuscrit, nous présentons dans un premier temps la technique de microscopie multiphotonique, les deux contrastes mis en jeu, ainsi qu'un outil reposant sur la modulation de polarisation de la lumière excitatrice pour la caractérisation de deux protéines fibrillaires, le collagène et la myosine. Nous présentons également une étude préliminaire du muscle squelettique bovin par microscopie multiphotonique. Dans un second temps, nous utilisons la spécificité de la SHG pour le collagène pour développer une méthode de "quantification" du collagène fibrillaire impliqué dans la fibrose du foie humain. Après une analyse détaillée de notre méthode de scoring SHG, elle est évaluée et comparée aux méthodes usuelles de caractérisation des stades de fibrose. Cette méthode, basée sur l'utilisation d'objectifs à faible NA , pourrait être utilisée en endoscopie SHG, quand les biopsies virtuelles seront possibles.

Mots-clés : *Microscopie multiphotonique, Microscopie SHG, Collagène, Fibrose, Foie, Myosine, Muscle squelettique*

Multiphoton microscopy of fibrillar proteins : application to the study of liver fibrosis

Abstract : Optical imaging techniques based on nonlinear effects of photon-matter interactions, are increasingly applied in biology. Multiphoton microscopy provides an in-depth information at a micrometric scale in tissues, with low photo-toxicity. Moreover, the various sources of endogenous contrast in biological tissues allow to visualize, without any staining, the two photon excited fluorescence emission (TPEF), and second harmonic generation (SHG) of non-centrosymmetric molecules in non-centrosymmetric media, such as fibrillar proteins like collagen and myosin. These two endogenous contrasts enable a wide range of applications along with embryology, neuroscience or oncology. In this context, multiphoton microscopy appears as a promising tool for the study of fibrillar proteins present in biological tissues.

In this document we first present the basis of multiphoton microscopy, the two contrasts involved in this imaging technique, and a tool based on the modulation of polarization of the exciting laser for the characterization of two fibrillar proteins, collagen and myosin. We also present a preliminary study of cattle skeletal muscle by multiphoton microscopy. In a second step, we use the specificity of SHG for imaging collagen to develop a method of scoring of fibrillar collagen deposits in human liver fibrosis. After an in-depth study of our collagen SHG scoring method, it is evaluated and compared to usual technics used to characterise fibrosis. This method which uses low NA lenses, could be extended to SHG endoscopes, when virtual biopsies will be possible.

Keywords : *Multiphoton microscopy, SHG microscopy, Collagen, Fibrosis, Liver, Myosin, Skeletal muscle*