



HAL
open science

Développements en microscopie non linéaire cohérente et incohérente et applications

David Sevrain

► **To cite this version:**

David Sevrain. Développements en microscopie non linéaire cohérente et incohérente et applications. Optique [physics.optics]. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2013. Français. NNT : 2013BRES0049 . tel-01061828

HAL Id: tel-01061828

<https://theses.hal.science/tel-01061828>

Submitted on 8 Sep 2014

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.



université de bretagne
occidentale



THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Sciences de la matière

Option : Optique fondamentale et milieux dilués

École Doctorale SICMA

présentée par

David Sevrain

Préparée au Laboratoire de Spectrométrie et
Optique Laser (EA 938)

Développements en microscopie non linéaire cohérente et incohérente et applications

Version provisoire pour le jury composé de :

Laurent BOURDIEU

Président du jury, École Normale Supérieure / *directeur de recherche CNRS*

François AMBLARD

Rapporteur, Institut Curie / *directeur de recherches CNRS*

Isabelle LEDOUX-RAK

Rapporteur, LPQM, ENS Cachan / *professeur*

Yves USSON

Examineur, DyCTiM, Université Joseph Fourier / *chargé de recherche CNRS*

Matthieu DUBREUIL

Examineur, LSOL, Université de Bretagne Occidentale / *maître de conférences*

Yann LE GRAND

Directeur, LSOL, Université de Bretagne Occidentale / *professeur*

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au sein du Laboratoire de Spectrométrie et Optique Laser (EA938), à l'UFR Sciences et Techniques de l'Université de Bretagne Occidentale, à Brest, et financé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Je tiens à remercier Bernard LE JEUNE pour m'avoir accueilli durant trois ans et demi dans son laboratoire. Tes conseils, ta disponibilité, nos discussions jusqu'à des heures indues auront été autant de facteurs de réussite.

Je remercie très chaleureusement mon directeur de thèse, Yann LE GRAND, pour la confiance sans failles qu'il m'a accordée. Ta rigueur scientifique, ton usage habile des mots seront des sources d'inspiration permanentes. Merci sincèrement pour ces trois années de travail.

Je ne remercierai jamais assez les membres de mon jury, qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mon travail : merci à Monsieur Laurent BOURDIEU d'avoir présidé ce jury, à Monsieur Yves USSON d'avoir examiné ce travail, à Madame Isabelle LEDOUX-RAK et Monsieur François AMBLARD d'avoir pris le temps de juger mon travail de thèse. Merci bien sûr à Matthieu DUBREUIL, dont je suis le premier "examiné". Qu'il me soit permis de souligner que ce jury a amené, lors de ma soutenance, des discussions passionnantes qui me motivent encore plus dans ma volonté de devenir chercheur.

Cette thèse est le fruit de nombreuses collaborations. Je remercie l'équipe de Laurent MISERY, directeur du Laboratoire de Neurosciences de Brest (EA4685). J'ai pris un réel plaisir à travailler avec cette équipe, toujours ouverte à la discussion. Je tiens à remercier plus particulièrement Nicolas LEBONVALLET et Virginie BUHE pour leur travail remarquable sur les échantillons nécessaires pour l'imagerie non linéaire de la peau ré-innervée. Ces trois années de collaboration auront été riches, et j'espère que les liens entre nos deux laboratoires perdureront.

Je remercie l'équipe de Monsieur Neil GUHA de l'Université de Nottingham pour nous avoir fourni les coupes de foie fibrosé. Un grand merci à Grace DOLMAN, qui nous a fait l'honneur de se déplacer à Brest pour évaluer le score SHG d'une partie de la cohorte de patients. Ces 7 jours de travail intensif font partie de mes meilleurs souvenirs de thèse.

Je remercie bien sûr toutes les équipes avec qui nous avons commencé de très intéressantes collaborations : le laboratoire "Mouvement, Sport et Santé" (EA1274), notamment Marie-Agnès GIROUX-METGES qui s'est montrée très réceptive à notre demande de collaboration ; le laboratoire "Immunologie, Pathologie et Immunothérapie" (EA2216), en particulier Jacques-Olivier PERS, et Sébastien COSTA ; le laboratoire ORPHY (EA4324) et Michael THERON. Tous ces collaborateurs, malgré nos disciplines très différentes, se sont montrés curieux et ouverts. J'espère que nous leur apportons autant qu'ils nous apportent.

Un merci tout particulier au laboratoire CEMCA (UMR6521 CNRS), qui m'aura bien souvent vu dans ses couloirs. Je suis sûr que certains ont fini par se demander si je n'étais pas plutôt doctorant en chimie.

Je tiens à remercier Christophe ODIN, de l'Institut de Physique de Rennes (UMR CNRS 6521), pour son aide précieuse pour les thématiques de mesure des paramètres de diffusion dans les milieux turbides et de quantification de la fibrose hépatique. Merci à Aymeric LERAY, de l'Institut de Recherche Interdisciplinaire de Lille, pour m'avoir permis de découvrir le monde merveilleux des

simulations Monte-Carlo. Je remercie également Thomas GUILBERT, de l'Institut Cochin, pour m'avoir initié à la quantification de la fibrose hépatique. J'ai eu beaucoup de chance de vous avoir croisés au cours de ma thèse. Merci à tous mes collègues du LSOL, qui auront magnifiquement donné vie à mon travail : Guy LE BRUN, Gaël LE ROUX, Fabrice PELLE, Sylvain RIVET, les jeunes retraités Jack CARIOU et Guy ZION, notre secrétaire Jacqueline LE BARS, les stagiaires de passage avec qui j'ai eu la chance de travailler : Anaïs, Amandine, Sérigne, Loïc, Ludovic et Marvin, et bien sûr les nouveaux "futurs-docteurs", je n'en doute pas : Christelle et Aymeric. Tous mes vœux de réussite vous accompagnent. Par ailleurs, vous récupérez également les décorations de Noël.

Deux personnes méritent que je les félicite pour m'avoir supporté dans le même bureau. En premier lieu Rana, ma camarade de thèse. On a commencé ensemble, tu as fini 5 mois avant moi. Tout est normal. Ce fut un plaisir de partager mon bureau avec toi, et je n'oublierai jamais cette ambiance joyeuse qui y régnait. J'espère te revoir très vite ; je planifie dès que possible un voyage au Liban. Sauf si tu ne veux pas de moi là-bas, bien sûr. Mais je viendrai quand même.

Vincent, on se suit depuis la M2 et ce fut un réel plaisir de te voir occuper le siège tout juste libéré par Rana. J'ai énormément apprécié nos discussions, le syndrome de la grande bouteille d'eau et nos repas au RU. Je suis sûr que les plats n'auront plus la même saveur après moi. C'est peut-être mieux ainsi, diront certains.

Un grand merci à tout le personnel de l'UBO que j'ai pu côtoyer. Michèle, ma thèse aurait été un véritable échec, au moins administratif, sans ton aide. On ne te le dit pas assez souvent, mais merci pour le boulot formidable que tu abats quotidiennement. Je tiens à remercier Nelly du service RMN, et Catherine et Tati Val' pour les Cordées. Faites que cela dure !

J'ai eu par ailleurs la chance de rencontrer des doctorants formidables durant ces trois années. Tous les adhérents de l'association Dakodoc, que j'aurais eu l'honneur de co-fonder avec Vincent J. et Melvin E., et de présider. Kévin, tu as présidé de manière formidable à ma suite. Olivier et le nouveau bureau, bon courage pour la reprise ! Merci également à tous les doctorants de chimie, trop nombreux pour que je les cite un par un. Plus spécialement, Mélissa, et nos séances mémorables d'aïkido (merci Laurent !); Wilfried, surveille bien Mélissa à Nancy. Bonne chance à tous les deux ! Laëtitia, que je connais depuis notre licence et qui m'aura fait l'honneur d'être secrétaire de l'asso, et Damien, qui prend sa suite. Des bisous à maîtresse Aurore !

Enfin, je ne peux que terminer par remercier ma famille : je dois mon parcours - et *a fortiori*, ce manuscrit - à mes parents, qui m'auront toujours soutenu dans mes choix, et à ma tante, pour toute son affection. À mon grand-père, à qui j'aurais aimé offrir un de mes manuscrits. À Morgane, Julien et la nouvelle branche de la famille, mon neveu Gabin ; à Charlotte, qui m'aura tracé la route dans des délires insoupçonnés ; à Nicolas, pour qui j'ai désormais du temps libre pour voyager. J'attends de pouvoir observer des papillons exotiques. Je n'oublie pas, bien sûr, Chloé, Florent et Thomas, pour l'ambiance à l'appart'.

Je n'aurai jamais pu réussir sans le soutien indéfectible de Camille, qui aura su me supporter durant ces deux dernières années. Merci à toute sa famille pour les merveilleux moments passés en leur compagnie.

Je prie tous ceux qui m'ont soutenu pendant ces trois années de me pardonner de ne pas les citer. Le cœur y est, mais pas le nombre de pages. Merci à toutes et à tous !

Table des matières

Introduction générale	1
I Introduction à la microscopie non linéaire	5
I.1 Introduction	5
I.2 Présentation de quelques sources de contraste en microscopie	6
I.2.1 La fluorescence linéaire	6
I.2.2 Processus non linéaire incohérent : la fluorescence non linéaire	12
I.2.3 Processus non linéaire cohérent : la génération d’harmoniques	17
I.3 Techniques de microscopie de fluorescence	22
I.3.1 Microscopie à champ large	22
I.3.2 Microscopie confocale à balayage	23
I.3.3 Microscopie multiphotonique à balayage	25
I.4 Dispositif expérimental	28
I.4.1 Caractéristiques générales	28
I.4.2 Les éléments du dispositif	31
I.4.3 Voies de collection des signaux optiques	34
Bibliographie	41
II Mesure des paramètres de diffusion dans les milieux turbides	47
II.1 Introduction	47
II.2 Milieux turbides et processus de diffusion	48
II.3 Bases théoriques de la mesure des paramètres optiques des milieux diffusants	56
II.3.1 Théorie de la diffusion	56
II.3.2 Mesure des paramètres optiques des milieux diffusants	58

II.4	Microscopie 2PEF adaptée à la mesure des paramètres optiques de diffusion	60
II.4.1	Mesure du coefficient de diffusion μ_s	60
II.4.2	Détermination du facteur d'anisotropie g	63
II.5	Simulations Monte-Carlo	65
II.5.1	Principe	65
II.5.2	Simulations des efficacités de collection	72
II.5.3	Correction du coefficient de diffusion apparent	78
II.5.4	Validité du protocole d'obtention du facteur d'anisotropie g	84
II.6	Validation expérimentale sur des gels biomimétiques	87
II.6.1	Protocole expérimental	87
II.6.2	Milieux hétérogènes	104
II.7	Conclusion	116
Bibliographie		119
III Microscopie à deux photons de la peau ré-innervée		125
III.1	Introduction	125
III.2	Peau et innervation cutanée	126
III.2.1	Physiologie de la peau	126
III.2.2	Innervation cutanée	129
III.2.3	Microscopie à deux photons de la peau	135
III.3	Choix des molécules fluorescentes	139
III.4	Principe	142
III.4.1	Mesure de $\sigma_{abs}^{(2)}$	142
III.4.2	Mesure des concentrations de fluorophores au sein des DRG	144
III.5	Protocole expérimental	146
III.5.1	Prélèvement des ganglions dorsaux rachidiens sur des ratons	146
III.5.2	Imagerie	148
III.5.3	Détermination des efficacités de détection	149
III.5.4	Mesure de l'intensité	152
III.6	Résultats	161
III.6.1	Concentrations au sein des cellules nerveuses	161
III.6.2	Sections efficaces d'absorption à deux photons $\sigma_{abs}^{(2)}$	163

III.6.3 Discussion sur l'autofluorescence	166
III.7 Imagerie de la peau ré-innervée	169
III.7.1 Ré-innervation de la peau	169
III.7.2 Protocole expérimental	170
III.7.3 Aspect des explants non innervés en microscopie 2PEF	173
III.7.4 Influence du marquage au FM1-43 et du protocole de fixation	175
III.7.5 Modifications qualitatives du derme et de l'épiderme	178
Bibliographie	183
IV Microscopie à deux photons et fibrose hépatique	195
IV.1 Introduction	195
IV.2 Généralités sur la fibrose hépatique	196
IV.2.1 Le foie	196
IV.2.2 La fibrose hépatique	196
IV.2.3 Diagnostic de la fibrose hépatique	200
IV.2.4 Scoring SHG adapté à la fibrose hépatique	206
IV.3 Méthode de scoring SHG	207
IV.4 Étude d'une cohorte d'échantillons de foie fibrosé	211
IV.4.1 Échantillons	211
IV.4.2 Conditions d'imagerie	212
IV.4.3 Principe d'automatisation du score SHG	213
IV.4.4 Traitement de la paraffine	217
IV.5 Résultats	230
IV.5.1 Statistiques comparées	230
IV.5.2 Courbes ROC	233
IV.5.3 Conclusion	235
IV.6 Perspectives de développement du score SHG	237
IV.6.1 Développement d'un critère morphologique	237
IV.6.2 Analyse en polarisation : polarimètre de Mueller instantané	242
IV.6.3 Mesure des paramètres de diffusion du foie fibrosé	247
IV.7 Conclusion	252
Bibliographie	255

Conclusion générale	263
A Développement mathématique de la correction du coefficient de diffusion apparent	265
A.1 Méthode des moindres carrés	265
A.1.1 Fonction affine	265
A.1.2 Fonction polynomiale d'ordre 2	266
A.2 Correction du coefficient de diffusion apparent	267
B Préparation des gels biomimétiques	271
Publications et Communications	273

Introduction générale

Depuis son invention au début des années 1990 [Denk et al., 1990], la microscopie de fluorescence excitée à deux photons (microscopie 2PEF : Two-Photon Excitation Fluorescence) a connu des développements spectaculaires, en témoigne l'augmentation quasi-exponentielle des travaux de recherche relevant du domaine depuis cette époque (figure 1).

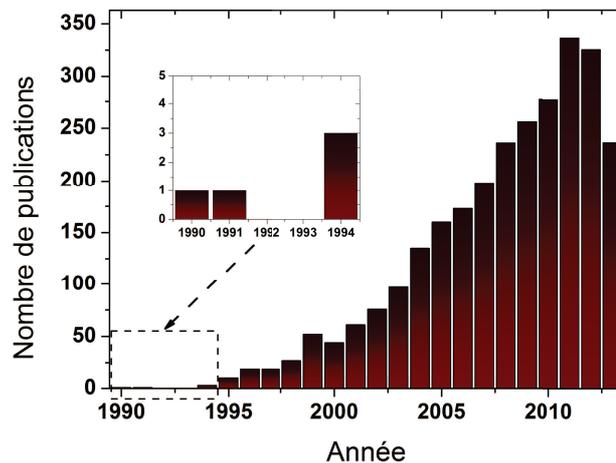


FIGURE 1 – Histogramme des publications associées à une recherche suivant les mots-clés "two-photon microscopy" dans la base de données PubMed.

L'engouement pour cette technique doit beaucoup à sa capacité à imager en profondeur dans les milieux biologiques, avec une résolution optique limitée par la diffraction, tout en minimisant les photo-dommages. En effet, l'excitation biphotonique des molécules fluorescentes par des impulsions ultra-courtes (idéalement femtosecondes) dans le proche infrarouge (typiquement autour de 800 nm), fournit un sectionnement optique intrinsèque au microscope sans nécessiter de détection confocale. Cette propriété rend la microscopie à deux photons plus robuste à la diffusion, permettant d'imager à l'intérieur de certains tissus biologiques jusqu'à 2 mm de profondeur [Parra et al., 2012] avec une résolution spatiale comparable à celle de la microscopie confocale. Les photo-dommages restent par ailleurs limités

du fait de la transparence de ces tissus aux longueurs d'onde d'excitation mise en œuvre. En outre, les spectres d'absorption moléculaire à deux photons sont généralement très larges, ce qui permet d'exciter simultanément l'autofluorescence d'une variété de protéines endogènes telles que les flavines, NAD(H)P, élastine etc., qui sont alors autant de sources de contraste possibles pour l'imagerie intravitale sans marquage [Zipfel et al., 2003a].

Par ailleurs, l'utilisation d'impulsions laser intenses ouvre la voie à toute une panoplie de contrastes non linéaires qui ont donné naissance à autant de microscopies différentes. Parmi les plus usitées, on trouve les microscopies SHG (harmonique 2) [Zipfel et al., 2003b], THG (harmonique 3) [Debarre, 2006] et CARS (Raman stimulé anti-stokes) [Volkmer, 2005]. L'association de tout ou partie de ces contrastes au sein d'un même microscope est aujourd'hui techniquement possible et connue sous le nom de microscopie non linéaire multimodale (figure 2).

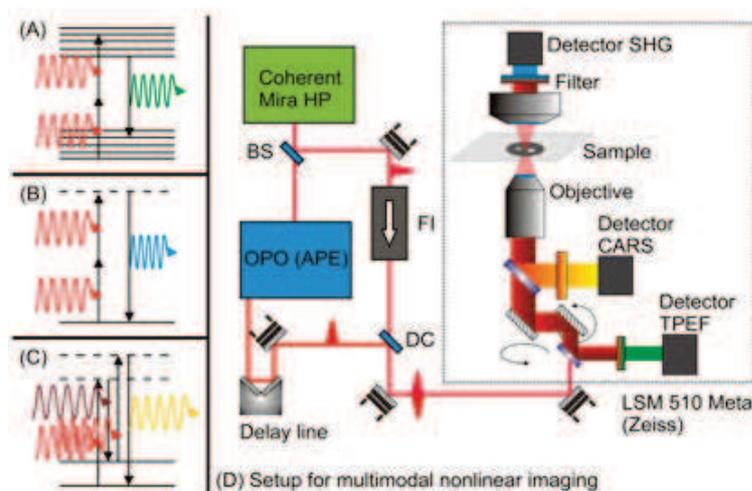


FIGURE 2 – Diagrammes énergétiques et dispositif expérimental de microscopie non linéaire multimodale exploitant les contrastes 2PEF (A), SHG (B) et CARS (C) (Image extraite du site internet <http://www.laboratory-journal.com/science/medicine-diagnostics/multimodal-nonlinear-microscopy-histopathology-brain-tumors>).

Une autre extension marquante de la microscopie 2PEF concerne les techniques dites de super-résolution optique qui permettent de dépasser la limite de diffraction en champ lointain. Parmi ces techniques on peut citer les microscopie STED [Hell et Wichmann, 1994; Moneron et Hell, 2009], 4Pi [Hanninen et al., 1995] et par résonance Förster (FRET) [Mills et al., 2003].

Ce travail de thèse, mené au sein du Laboratoire de Spectrométrie et Optique

Laser de l'Université de Brest (LSOL, EA 938) sous la direction du Pr. Yann Le Grand, concerne le développement des microscopies 2PEF et SHG à des fins de métrologie des milieux diffusants et d'applications biomédicales. Le manuscrit est organisé en quatre chapitres.

Dans le premier chapitre nous rappelons les notions de fluorescence excitée à un et deux photons, et de génération de second harmonique. Les principes et les limitations des microscopies de fluorescence en champ large et confocale sont ensuite discutés, puis les techniques 2PEF et SHG sont abordées et le dispositif expérimental développé au LSOL décrit.

Le deuxième chapitre est consacré à la présentation d'une méthode originale de mesure des paramètres optiques de diffusion (coefficient et anisotropie de diffusion) de milieux turbides, basée sur la comparaison des intensités des signaux de fluorescence 2PEF collectés selon différentes modalités de notre microscope. Nous justifions le principe de cette méthode à l'aide de simulations Monte-Carlo puis nous l'appliquons à des milieux biomimétiques que nous fabriquons et à des échantillons biologiques réels.

Le troisième chapitre explore les possibilités de la microscopie bimodale 2PEF et SHG dans la caractérisation des processus de ré-innervation de la peau humaine. Ce travail a été mené en collaboration avec le Laboratoire de Neurosciences de Brest (LNB, EA 4685). L'équipe du Pr. L. MISERY a développé une méthode de ré-innervation d'explants cutanés qui nécessitait une technique capable de rendre compte du développement dans la peau des terminaisons nerveuses issues de cellules sensorielles. Dans ce contexte, nous avons étudié les modalités d'imagerie et de marquage des fibres nerveuses. Un effort particulier a été porté sur la caractérisation 2PEF de différents marqueurs neuronaux fluorescents dans les conditions réelles d'imagerie 2PEF. Pour ce faire, nous proposons un protocole de mesure basé sur l'utilisation d'un fluorophore de référence et le couplage des modes confocal et biphoton de notre microscope.

Le dernier chapitre est une poursuite des travaux sur la quantification de la fibrose du foie humain à partir de la microscopie SHG, initiés dans le cadre des thèses de L. GAILHOUSTE et T. GUILBERT. Une collaboration amorcée en 2011 avec une équipe du centre de recherches sur les maladies hépatiques (BRU NHS) de Nottingham nous a permis de disposer de 152 coupes histologiques de foie présentant des stades de fibrose avancés. Après avoir rappelé les principes de la méthode de

quantification SHG du collagène fibrillaire hépatique, nous étudions différentes pistes visant à éliminer autant que faire se peut la contribution de la paraffine, source d'un signal SHG parasite, au score SHG de fibrose. Nous appliquons alors notre méthode à la cohorte de 152 patients et analysons nos résultats en regard de ceux des anatomopathologistes (classifications METAVIR et, pour la première fois, Ishak). Nous terminons par une discussion sur l'apport de quelques techniques complémentaires visant à améliorer le diagnostic de la fibrose par quantification SHG du collagène.

Chapitre I

Introduction à la microscopie non linéaire

I.1 Introduction

Des efforts considérables ont été engagés depuis plusieurs siècles pour utiliser la lumière à des fins d'observation de la matière à l'échelle microscopique. Le développement des techniques de microscopie depuis le XVII^{ème} siècle a notamment permis de découvrir et de décrire les structures élémentaires des êtres vivants, les cellules. Les techniques de fluorescence développées dès le XX^{ème} siècle ont affiné la description du vivant en mettant en évidence des composés microscopiques jusque-là invisibles par les techniques conventionnelles d'imagerie en lumière blanche.

L'avènement de la microscopie confocale à balayage a permis de franchir une étape cruciale en termes d'imagerie en profondeur des tissus biologiques grâce à son sectionnement optique axial. La fluorescence produite par les plans situés en-deçà et au-delà du plan focal image de l'objectif du microscope est rejetée en détectant la lumière à travers un trou confocal, conjugué du point focal image à travers l'optique de collection du microscope. La contre-partie de cette détection confocale est le renoncement à l'imagerie parallèle (champ large), l'image étant ici reconstruite point par point. Les milieux biologiques étant essentiellement diffusants et peu absorbants aux longueurs d'onde visibles et proche infrarouge, la fluorescence générée dans le volume focal image est d'autant plus diffusée, et passe donc d'autant moins "facilement" à travers le trou confocal que la profondeur d'imagerie est plus grande. La profondeur d'imagerie de la microscopie confocale est ainsi typiquement limitée au libre parcours moyen de diffusion de la fluorescence dans le milieu imagé, c'est-à-dire quelques dizaines de micromètres dans le cas des tissus biologiques.

La microscopie non linéaire permet à la fois de bénéficier du sectionnement optique propre à la microscopie confocale à balayage et d'imager en profondeur des échantillons diffusants et épais. Le sectionnement optique intrinsèquement lié à la forte localisation spatiale du processus non linéaire de génération de la lumière permet de s'affranchir du trou confocal et autorise ainsi la collection de la lumière diffusée. L'augmentation résultante de l'intensité de fluorescence collectée permet d'atteindre des profondeurs d'imagerie plus importante.

Nous présentons dans le chapitre qui suit les phénomènes optiques linéaire et non linéaire mis en œuvre au cours de cette thèse, puis nous passons en revue les techniques de microscopie à balayage exploitant ces phénomènes. Enfin, nous décrivons le dispositif expérimental à la base de tous les travaux présentés dans ce manuscrit.

I.2 Présentation de quelques sources de contraste en microscopie

I.2.1 La fluorescence linéaire

Processus d'absorption

Lorsqu'une onde optique traverse un milieu physique (gaz, liquide, solide ou plasma), elle interagit avec le cortège électronique des atomes ou molécules constituant ce milieu. Plusieurs effets peuvent alors être observés (absorption, diffusion,...) dont l'importance dépend de la longueur d'onde λ et de la nature du milieu.

Le nombre de photons absorbés par unité de temps et par molécule de ce milieu est donné par :

$$W_{abs} = \frac{\sigma_{abs}(\lambda_{abs})}{A} \frac{P\lambda_{abs}}{hc} \quad , \quad (I.1)$$

où h est la constante de Planck, c la vitesse de la lumière dans le vide et λ_{abs} la longueur d'onde associée au photon. $\sigma_{abs}(\lambda_{abs})$ est la section efficace d'absorption à un photon de la molécule (en cm^2) à la longueur d'onde λ_{abs} , P est la puissance d'illumination (en Watts) et A l'aire d'une section droite du faisceau lumineux incident. Les fournisseurs donnent généralement le coefficient d'extinction molaire $\epsilon(\lambda_{abs})$ (unités :

$\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$), relié à $\sigma_{abs}(\lambda_{abs})$ par l'égalité suivante :

$$\epsilon(\lambda_{abs}) = \frac{N_A \sigma_{abs}(\lambda_{abs})}{\ln(10)} \quad , \quad (\text{I.2})$$

où N_A est le nombre d'Avogadro [Moser, 2000]. À titre d'exemple, la molécule de fluorescéine en solution aqueuse (pH supérieur à 9) possède une section efficace d'absorption à un photon de $3 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$ et un coefficient d'extinction molaire de $7,8 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ à la longueur d'onde de 488 nm [Berland, 2001].

D'un point de vue microscopique, l'absorption d'un photon par une molécule provoque le passage d'un électron de son niveau électronique fondamental vers un niveau d'énergie supérieur (état excité). Ce processus est extrêmement rapide, de l'ordre de la femtoseconde (10^{-15} s). Pour revenir à son état fondamental, cette molécule doit perdre de l'énergie. Les processus d'absorption et de conversion de l'énergie sont décrits par le diagramme de Jablonski de la figure I.1.

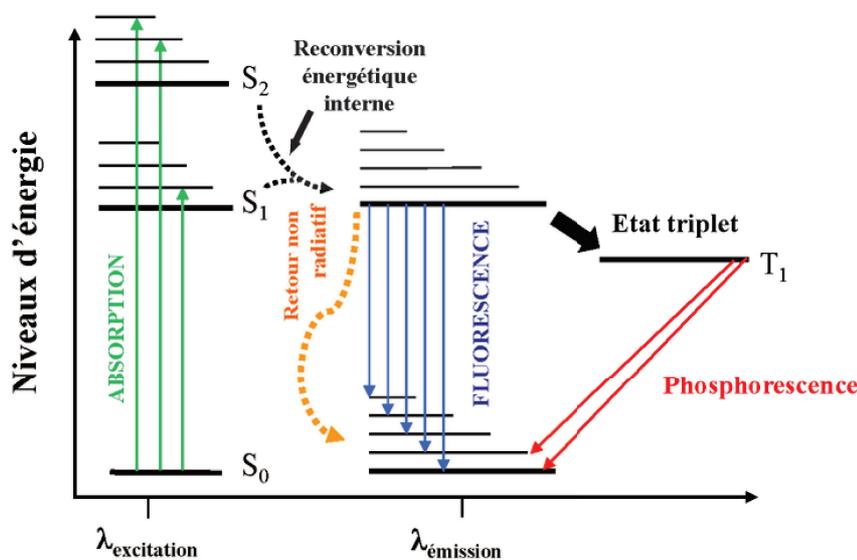


FIGURE I.1 – Diagramme de Jablonski simplifié correspondant aux processus de fluorescence (durée de vie de l'état excité : quelques nanosecondes) et de phosphorescence (durée de vie de l'état excité : de la microseconde à plusieurs heures). L'état S_0 est l'état singulet fondamental de la molécule, S_1 est le premier état singulet excité et T_1 le premier état triplet excité. Les états vibrationnels de plus haute énergie sont représentés par les traits horizontaux plus fins. Les états singulet et triplet se distinguent par l'orientation de leurs spins électroniques (anti-parallèles pour l'état singulet et parallèles pour l'état triplet)¹.

1. Figure extraite du site internet http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Diagramme_de_Jablonski.png

Ce diagramme montre que suivant l'énergie du photon incident, différentes transitions énergétiques sont permises depuis l'état fondamental S_0 de la molécule jusqu'aux niveaux d'énergie S_1 et S_2 (transitions $S_0 \rightarrow S_1$, $S_0 \rightarrow S_2$...). Seules les transitions conservant le nombre de spin électronique S sont permises ($\Delta S = 0$ dans ce cas).

Lorsque la molécule est dans son état excité, sur un niveau vibrationnel excité, elle commence par se désexciter non radiativement, en quelques picosecondes, jusqu'au bas du niveau excité. Ce processus se nomme conversion interne. Le retour à l'état fondamental peut alors s'effectuer selon trois voies de désexcitation : l'émission de fluorescence, la relaxation non radiative et le passage inter-systèmes. Notons qu'il existe des cas où le couplage spin-orbite autorise des transitions ne conservant pas le nombre de spin, comme c'est le cas pour le phénomène de phosphorescence, décrit plus loin dans le texte.

Processus de fluorescence

L'émission de fluorescence est un processus de relaxation radiative d'une molécule dans un état excité vers son état fondamental. Les molécules capables de réaliser ce phénomène sont nommées **fluorophores**. Ce processus radiatif de transfert d'énergie est incohérent, c'est-à-dire qu'il n'existe de relations de phase ni entre le photon absorbé et le photon de fluorescence émis, ni entre deux photons de fluorescence.

L'allure des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence est caractéristique de ces processus. À titre d'exemple, la figure I.2 présente les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de la fluorescéine. Du fait de la relaxation non radiative de la molécule vers son niveau excité de plus basse énergie avant émission, le photon de fluorescence a une énergie inférieure à celle du photon absorbé, ce qui explique le décalage entre la longueur d'onde d'absorption maximale, λ_{ex} , et la longueur d'onde d'émission maximale, λ_{em} . Ce décalage est qualifié de déplacement de Stokes en la mémoire du physicien britannique qui (re)découvrit ce phénomène en 1852, quelques années après le Français Edmond Becquerel [Valeur, 2005]. Cette propriété est à la base de la microscopie de fluorescence car elle permet de séparer, à l'aide de filtres appropriés, la fluorescence émise de la lumière excitatrice.

En outre, les spectres d'absorption et d'émission des molécules sont larges et continus. Ce continuum est la conséquence d'un élargissement des raies lié à la structure des fluorophores et à leur interaction avec le milieu environnant, entraînant la création d'états excités supplémentaires (notamment vibrationnels) et donc

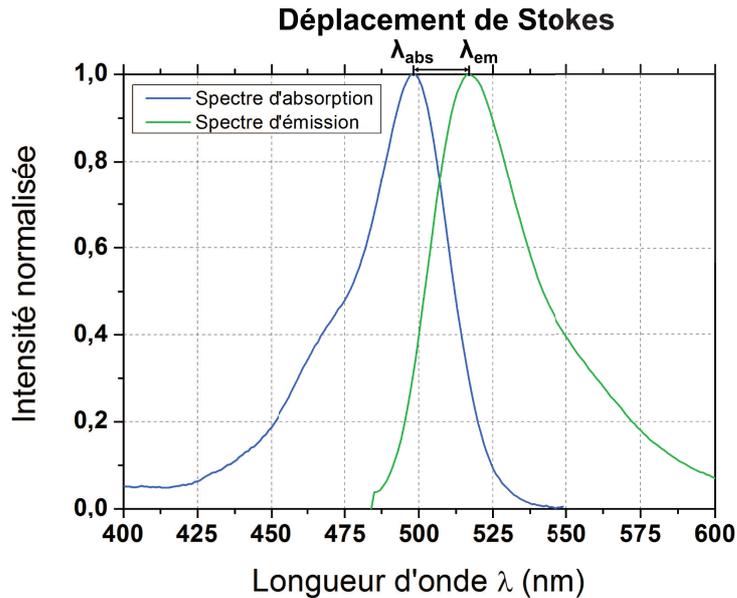


FIGURE I.2 – Spectres d'absorption et d'émission de la fluorescéine. L'émission est caractérisée par un maximum à 520 nm lui conférant sa couleur verte (données fournies par Life TechnologiesTM).

l'augmentation du nombre de transitions énergétiques permises. Nous pouvons également remarquer que les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence sont très souvent des spectres miroirs l'un de l'autre car l'espacement entre les différents niveaux d'énergie vibrationnelle est le même pour les états électroniques des niveaux fondamental et excité (les mêmes transitions sont donc favorisées pour l'absorption comme pour l'émission, avec des probabilités corrélées).

Trois paramètres servent à décrire l'efficacité avec laquelle une molécule est capable de générer de la fluorescence sous excitation optique :

- le **coefficient d'extinction molaire** $\epsilon(\lambda)$, qui décrit la capacité d'une molécule à absorber un photon de longueur d'onde λ .
- le **rendement quantique de fluorescence** Φ , qui est la probabilité pour qu'une molécule fluoresce consécutivement à l'absorption d'un photon.
- le **temps de vie de fluorescence** τ , qui caractérise la durée de l'émission de fluorescence. Ce temps est de l'ordre de la nanoseconde pour la fluorescence, et dépend à la fois de la molécule et de son environnement.

À noter que le produit $\epsilon\Phi$, couramment employé par les fournisseurs, est nommé **brillance** d'un fluorophore. C'est elle qui détermine l'intensité de fluorescence.

Quenching et relaxations non radiatives

En fonction de l'environnement du fluorophore, des transferts d'énergie peuvent s'effectuer entre molécules en dépit de l'existence d'une voie de relaxation radiative. C'est le cas lors de processus collisionnels entre fluorophores ou entre fluorophore et molécules du solvant. Ce phénomène est appelé "quenching de collision" et est utilisé par exemple dans les capteurs de concentration en oxygène, l'état triplet naturel de l'oxygène moléculaire rendant favorable un transfert d'énergie non radiatif [Amao et al., 2000]. Ce phénomène est d'autant plus important que la concentration des fluorophores est élevée, et se révèle problématique lorsque l'on veut mesurer le coefficient d'extinction molaire d'un fluorophore, par exemple.

Les fluorophores peuvent aussi subir des transformations chimiques les rendant non fluorescents, comme la complexation, parfois issue de réactions photochimiques. L'effet inverse est évidemment possible sous certaines conditions : des molécules non fluorescentes comme la CFDA peuvent subir une transformation enzymatique intracellulaire transformant leur groupe diacétate en un groupe ester, produisant ainsi la CFSE, une molécule fluorescente étudiée au cours de cette thèse (cf. section III.3).

Finalement, les relaxations non radiatives peuvent également être utilisées à des fins d'imagerie, comme c'est le cas pour l'imagerie de fluorescence par résonance Förster (FRET). Deux molécules sont nécessaires dans ce processus : le fluorophore dans un état excité, qui joue le rôle de donneur d'énergie, et le fluorophore à l'état fondamental, qui joue le rôle d'accepteur. Le spectre d'émission du donneur doit dans l'idéal être superposable au spectre d'absorption de l'accepteur. Lorsque le donneur est suffisamment proche de l'accepteur, il peut céder son énergie à ce dernier qui passe dans un état excité puis relaxe de manière radiative. Les distances nécessaires, dites "rayon de Förster", sont de l'ordre du nanomètre, ce qui permet de sonder l'environnement local d'un fluorophore à une échelle très petite devant la longueur d'onde. De nombreux couples "donneurs-accepteurs" existent et sont utilisés pour des applications très variées [Wallrabe et Periasamy, 2005].

Passage inter-systèmes et phosphorescence

Le passage inter-systèmes peut se produire lorsqu'une molécule a la possibilité de passer de l'état singulet excité à un état triplet. Ces deux états ne diffèrent que

par l'orientation de leurs spins électroniques. Ils sont anti-parallèles dans l'état singulet et parallèles dans l'état triplet. La transition d'un état à un autre est donc caractérisée par une augmentation du nombre de spin S ($S = 0$ dans une configuration anti-parallèle, et $S = 1$ dans une configuration parallèle), rendue possible par couplage spin-orbite. La désexcitation de cet état triplet à l'état fondamental peut se faire de manière radiative : on parle de phosphorescence. Les temps de vie de phosphorescence ($\tau \geq 1 \mu s$) sont supérieurs à ceux de fluorescence ($\tau \simeq 1 ns$), du fait de la faible probabilité de la transition de l'état triplet à l'état fondamental.

Environnement du fluorophore

L'environnement direct du fluorophore peut modifier ses propriétés de fluorescence. Les spectres d'absorption et d'émission, la durée de vie de fluorescence ainsi que le rendement quantique de fluorescence sont directement affectés par les interactions entre le fluorophore et les espèces chimiques avoisinantes. Certaines espèces chimiques, comme les marqueurs lipophiles styryliques, sont très peu fluorescentes en solution aqueuse, du fait d'un rendement quantique de fluorescence faible, mais leur fluorescence est accrue lorsqu'elles pénètrent les membranes plasmiques des cellules. Un décalage dans les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de plusieurs dizaines de nanomètres peut être observé lorsque ce type de fluorophores passe d'un solvant comme le méthanol à la membrane plasmique d'une cellule, comme l'illustre la figure I.3.

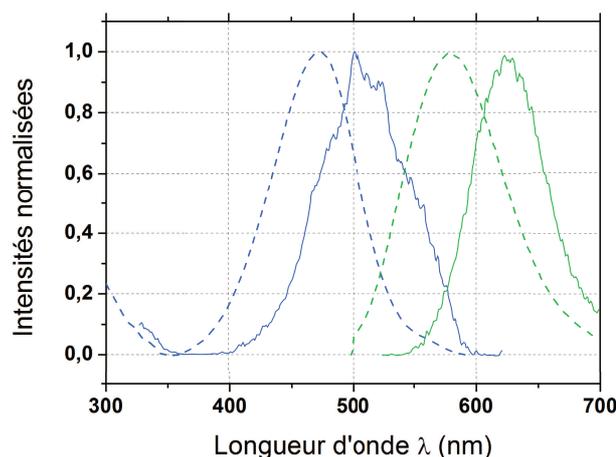


FIGURE I.3 – Spectres d'absorption et d'émission du FM1[®]-43, un marqueur lipophile styrylique utilisé dans le cadre de cette thèse (cf. section III.3). En traits pleins, les spectres normalisés lorsque la molécule est en solution dans le méthanol. En pointillés, lorsqu'elle est greffée à une bicouche lipidique (membrane cellulaire).

D'autres effets modifient les propriétés de fluorescence. Il peut s'agir de la pré-

sence d'un ion particulier (Ca^{2+} et H_3O^+ associé au pH d'une solution, entre autres), permettant d'étudier des modifications intracellulaires de manière spécifique [Betz et al., 1992].

Photoblanchiment

Une difficulté propre aux procédés basés sur la fluorescence est la relative fragilité des molécules sous excitation répétée, qui peuvent subir des transformations photochimiques irréversibles dont les produits sont souvent non fluorescents et parfois toxiques pour leur environnement. Ce mécanisme indirect est connu sous le nom de photo-toxicité. L'intensité de fluorescence diminue à mesure que le temps d'éclairage augmente : on parle de **photoblanchiment**. Peu d'études fondamentales ont été réalisées sur la théorie du photoblanchiment, notamment parce que ce phénomène complexe est très dépendant de la structure moléculaire du fluorophore étudié et de la composition chimique de son environnement. Les passages inter-systèmes présentés précédemment ainsi que le photoblanchiment sont décrits dans [Xu et al., 2002].

Le photoblanchiment est un problème quand on désire observer un signal fluorescent constant sur des durées importantes. Une stratégie pour diminuer cet effet est de remplacer l'oxygène présent dans les préparations et souvent responsable du photoblanchiment, par un produit *ad hoc* nommé agent anti-fading. L'innocuité de cet agent n'est cependant pas garantie, et son utilisation doit se faire avec précaution.

Si peu de données existent sur le photoblanchiment lui-même, son existence a permis de développer de nouvelles stratégies d'observation à l'échelle moléculaire. Le FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) utilise le photoblanchiment pour étudier les dynamiques moléculaires dans des systèmes vivants, particulièrement depuis le développement des Fluorescent Proteins (FP) et notamment de la GFP (Green FP). Ces protéines codées à partir de l'ADN de cellules génétiquement modifiées permettent d'étudier par exemple les temps caractéristiques de circulation des fluides intracellulaires via le remplacement par des protéines intactes de protéines fluorescentes ayant subi le phénomène de photoblanchiment [Reits et Neefjes, 2001].

I.2.2 Processus non linéaire incohérent : la fluorescence non linéaire

"Lorsqu'un atome peut absorber un quantum de lumière d'énergie E , il existe une probabilité non nulle qu'il puisse absorber deux quanta de lumière tels que la somme de leurs énergies soit égale à E ". Cette démonstration de Maria Göppert-Mayer [Göppert-Mayer, 1931] est à l'origine de nombreux concepts d'optique non linéaire, et notamment du mécanisme d'absorption simultanée de plusieurs photons par un même atome ou une même molécule.

Ce phénomène est peu probable dans les conditions usuellement rencontrées dans la nature. En effet, une molécule possédant une bonne section efficace d'absorption à un photon peut absorber en moyenne un photon provenant de la lumière du soleil par seconde. En revanche, le phénomène d'absorption simultanée de deux photons par cette molécule n'arrive environ qu'une fois tous les dix millions d'années [Denk et Svoboda, 1997]. La faible probabilité de cet événement doit donc être compensée par une concentration importante de photons dans le temps et dans l'espace. Le confinement temporel des photons justifie l'utilisation de sources lasers à impulsions ultra-brèves. Il aura ainsi fallu attendre trente ans et le développement des premiers lasers impulsions pour vérifier expérimentalement cette théorie [Franken et al., 1961; Kaiser et Garrett, 1961].

L'interaction entre une onde électromagnétique et le cortège électronique d'un atome ou d'une molécule induit une polarisation microscopique $\boldsymbol{\mu}$. Cette grandeur peut s'écrire sous la forme d'un développement de Taylor suivant le champ électrique de l'onde \mathbf{E} :

$$\boldsymbol{\mu} = \boldsymbol{\mu}_0 + \alpha \mathbf{E} + \frac{1}{2} \beta \mathbf{E} \mathbf{E} + \frac{1}{6} \gamma \mathbf{E} \mathbf{E} \mathbf{E} + \dots \quad , \quad (\text{I.3})$$

où α est le tenseur de polarisabilité linéaire, β et γ les tenseurs d'hyperpolarisabilité non linéaires du premier et deuxième ordre respectivement.

À l'échelle macroscopique, les moments dipolaires moléculaires induits $\boldsymbol{\mu}$ s'ajoutent pour former le vecteur de polarisabilité macroscopique \mathbf{P} qui peut se développer de la même manière suivant le champ électrique \mathbf{E} :

$$\mathbf{P} = \epsilon_0 [\chi^{(1)}] \mathbf{E} + \epsilon_0 [\chi^{(2)}] \mathbf{E} \mathbf{E} + \epsilon_0 [\chi^{(3)}] \mathbf{E} \mathbf{E} \mathbf{E} + \dots \quad (\text{I.4})$$

$$= \mathbf{P}_L + \mathbf{P}_{NL} \quad (\text{I.5})$$

Les tenseurs de susceptibilité $[\chi^{(1)}]$, $[\chi^{(2)}]$ et $[\chi^{(3)}]$ sont les contreparties macroscopiques des tenseurs α , β et γ respectivement. Les termes $\mathbf{P}_L = \epsilon_0 [\chi^{(1)}] \mathbf{E}$ et $\mathbf{P}_{NL} = \epsilon_0 [\chi^{(2)}] \mathbf{E} \cdot \mathbf{E} + \epsilon_0 [\chi^{(3)}] \mathbf{E} \cdot \mathbf{E} \cdot \mathbf{E} + \dots$ sont les termes de polarisabilité linéaire et non linéaire. Ces tenseurs permettent de décrire les phénomènes non linéaires comme par exemple la génération de second harmonique ($[\chi^{(2)}]$), l'absorption à deux photons (partie imaginaire de $[\chi^{(3)}]$) et la génération de troisième harmonique (partie réelle de $[\chi^{(3)}]$).

Fluorescence produite par absorption multiphotonique

Nous avons vu précédemment que le phénomène de fluorescence est une relaxation radiative d'une molécule d'un état excité à son état fondamental. Dans le cas de la fluorescence linéaire, ceci est produit par l'absorption d'un photon. Pour un processus non linéaire, la fluorescence est produite par l'absorption d'au moins deux photons. Le diagramme simplifié de Jablonski de la figure I.4 compare ces deux phénomènes.

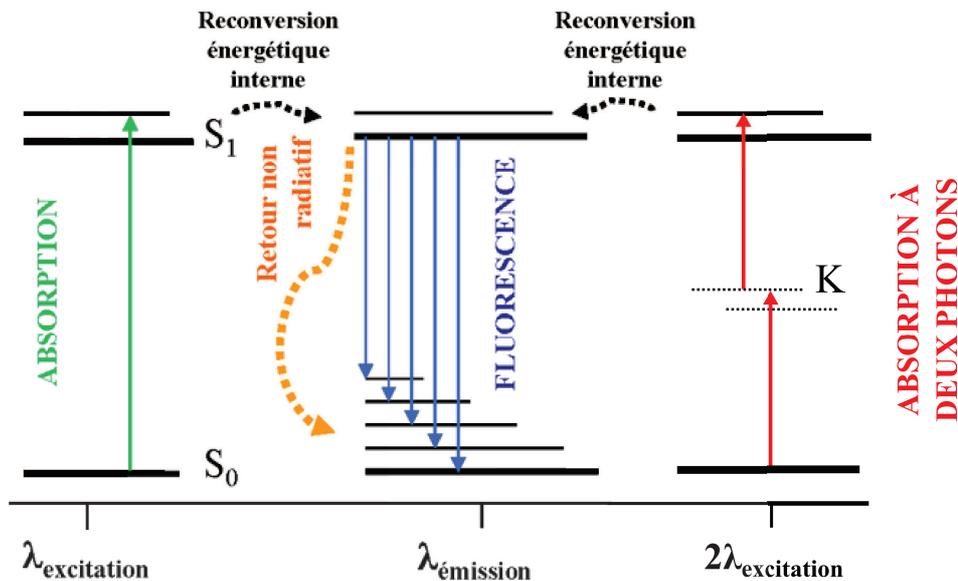


FIGURE I.4 – Diagramme de Jablonski simplifié illustrant les processus d'absorption à un et deux photons avant émission de fluorescence. K est un état virtuel de durée de vie très faible, de l'ordre de 10^{-15} s, qui ne correspond à aucun état électronique autorisé.

Les deux photons absorbés par la molécule peuvent ne pas avoir la même énergie. Il faut cependant qu'ils interagissent quasi-simultanément avec le fluorophore pour assurer son passage à l'état excité. La propension d'une molécule à absorber simultanément deux photons est caractérisée par la section efficace d'absorption

à deux photons $\sigma_{abs}^{(2)}$ (unité : $\text{cm}^4.\text{s}/\text{photon}$), dont une approximation est donnée par [Diaspro, 2002] :

$$\sigma_{abs}^{(2)} \simeq \sigma_{S_0K} \times \sigma_{KS_1} \times \tau_K \quad , \quad (\text{I.6})$$

où σ_{S_0K} et σ_{KS_1} représentent les sections efficaces d'absorption à un photon entre les niveaux $S_0 - K$ et $K - S_1$ respectivement. K est un état virtuel situé entre les états S_0 et S_1 . τ_K est la durée de vie de l'état virtuel K , de l'ordre de 10^{-15}s . Il correspond à l'intervalle de temps pendant lequel le deuxième photon peut être absorbé par la molécule dans son état K . L'unité de $\sigma_{abs}^{(2)}$ est le Göppert-Mayer, de symbole GM, avec la conversion $1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4.\text{s}/\text{photon}$.

La quantité de fluorescence générée via ce processus dépend de nombreux paramètres. Pour la déterminer nous devons d'abord exprimer le nombre moyen de photons p de longueur d'onde λ dans un volume donné. En assimilant le volume d'une molécule fluorescente à un cube de côté s , ce nombre peut s'écrire comme [Andrews, 1985; Diaspro, 2002] :

$$p = \frac{IV_m\lambda}{N_a hc^2} \quad , \quad (\text{I.7})$$

où I est l'intensité correspondant à la traversée de la surface du cube de côté s par les p photons, V_m est le volume molaire et N_a le nombre d'Avogadro. La probabilité P_n de trouver n photons dans le volume du fluorophore est décrite par une distribution de Poisson de moyenne p telle que :

$$P_n = \frac{p^n}{n!} e^{-p} \quad (\text{I.8})$$

Pour les sources conventionnelles, le nombre moyen de photons contenus dans le volume d'un fluorophore est très inférieur à 1. Le développement de Taylor à l'ordre 1 de l'exponentielle dans l'expression précédente permet d'écrire :

$$P_n \simeq \frac{p^n}{n!} \propto I^n \quad (\text{I.9})$$

La probabilité d'absorber n photons dépend donc de la puissance n -ième de l'intensité incidente I^n .

Le nombre de photons $N_{abs}(t)$ absorbés par un ensemble de molécules par unité de temps suite à une excitation à n photons dépend en outre de la section efficace d'absorption à n photons $\sigma_{abs}^{(n)}$ et de la concentration en molécules absorbantes $C(\mathbf{r}, t)$

dans le volume V de l'excitation :

$$N_{abs}(t) = \int_V \sigma_{abs}^{(n)} C(\mathbf{r}, t) I^n(\mathbf{r}, t) d^3\mathbf{r} \quad (\text{I.10})$$

Supposons que l'absorption des n photons soit suivie d'une émission de fluorescence. Les molécules absorbantes sont alors des fluorophores dont le nombre dans l'état d'énergie fondamental peut être considéré comme constant en l'absence de photoblanchiment et de déplétion du niveau fondamental. Il en est de même pour la concentration C . L'intensité d'excitation est quant à elle décomposable en parties temporelle $I_0^n(t)$ et spatiale $S^n(\mathbf{r})$. L'expression précédente devient alors :

$$N_{abs}(t) = C \sigma_{abs}^{(n)} I_0^n(t) \int_V S^n(\mathbf{r}) d^3\mathbf{r} \quad (\text{I.11})$$

En l'absence d'émission stimulée et de quenching, le nombre de photons de fluorescence collectés par unité de temps $F(t)$ est donné par :

$$F(t) = \frac{1}{n} \Phi \eta_{coll} N_{abs}(t) \quad , \quad (\text{I.12})$$

avec Φ le rendement quantique de fluorescence et η_{coll} l'efficacité de collection du système de collection. Le facteur $\frac{1}{n}$ prend en compte le fait que n photons sont nécessaires pour chaque événement d'excitation d'ordre n . En microscopie de fluorescence, seul le nombre moyen de photons de fluorescence collectés par unité de temps importe. Ce nombre s'écrit :

$$\langle F(t) \rangle = \frac{1}{n} \Phi \eta_{coll} C \sigma_{abs}^{(n)} \langle I_0^n(t) \rangle \int_V S^n(\mathbf{r}) d^3\mathbf{r} \quad (\text{I.13})$$

Notons que $\langle F(t) \rangle$ est proportionnelle à la moyenne de la puissance n -ième de l'intensité $\langle I_0^n(t) \rangle$ et non à la puissance n -ième de l'intensité moyenne $\langle I_0(t) \rangle^n$, quantités égales dans le cas de l'excitation de fluorescence à un photon ($n = 1$).

Étant donné que la chaîne de mesure d'un microscope de fluorescence en mode imagerie fournit un signal proportionnel à $\langle I_0(t) \rangle$, nous pouvons réécrire l'expression précédente sous la forme :

$$\langle F(t) \rangle = \frac{1}{n} g^{(n)} \Phi \eta_{coll} C \sigma_{abs}^{(n)} \langle I_0(t) \rangle^n \int_V S^n(\mathbf{r}) d^3\mathbf{r} \quad (\text{I.14})$$

où $g^{(n)}$ est la cohérence temporelle au n -ième ordre de la source d'excitation :

$$g^{(n)} = \frac{\langle I_0(t)^n \rangle}{\langle I_0(t) \rangle^n} \quad (\text{I.15})$$

Ce facteur est lié à la structure temporelle de la source d'excitation. Par exemple, pour une source continue, $g^{(n)} = 1$ car l'intensité moyenne et l'intensité instantanée sont identiques, aux fluctuations près. Pour une source impulsionnelle, il faut prendre en compte à la fois la fréquence ou cadence de répétition des impulsions f (en Hertz) et la durée d'impulsion τ (en secondes). Le produit $f\tau$ est le rapport cyclique de la source laser. Le facteur $g^{(n)}$ peut s'exprimer en fonction du rapport cyclique et de la quantité sans dimensions $g_p^{(n)}$:

$$g^{(n)} = \frac{g_p^{(n)}}{(f\tau)^{(n-1)}} \quad (\text{I.16})$$

$$g_p^{(n)} = \tau^{(n-1)} \int_{-1/2f}^{1/2f} I_0^n(t) dt / \left[\int_{-1/2f}^{1/2f} I_0(t) dt \right]^n \quad (\text{I.17})$$

En microscopie de fluorescence à deux photons, l'intensité de fluorescence moyenne $\langle I^{2PEF} \rangle$, en fonction des longueurs d'onde d'excitation λ_{ex} et d'émission de fluorescence λ_{em} , peut s'écrire :

$$\langle I^{2PEF}(t, \lambda_{ex}, \lambda_{em}) \rangle = \frac{g_p^{(2)}}{2} \frac{\langle P(t, \lambda_{ex}) \rangle^2}{f(\lambda_{ex})\tau(\lambda_{ex})} \Phi C \sigma_{abs}^{(2)}(\lambda_{ex}) f_{det}(t, \lambda_{em}) \quad (\text{I.18})$$

$$\Leftrightarrow \langle I^{2PEF}(t) \rangle = f_{exc}(t, \lambda_{ex}) \times f_{det}(t, \lambda_{em}) \quad , \quad (\text{I.19})$$

où $\langle P(t, \lambda_{ex}) \rangle$ est la puissance lumineuse moyenne incidente sur la molécule à la longueur d'onde λ_{ex} . $f_{exc}(t, \lambda_{ex})$ regroupe tous les paramètres propres à l'excitation, et $f_{det}(t, \lambda_{em})$ ceux propres à la détection des photons de fluorescence. Cette dernière grandeur est détaillée en section III.5.3.

I.2.3 Processus non linéaire cohérent : la génération d'harmoniques

Principe

Lors de l'interaction non linéaire entre une onde électromagnétique de fréquence ν et certains milieux, il est possible de produire une onde électromagnétique dont la fréquence est exactement le double de la fréquence de l'onde électromagnétique

incidente. Ce phénomène est connu sous le nom de génération de second harmonique (ou SHG, pour Second Harmonic Generation) [Franken et al., 1961; Maker et al., 1962]. Il a servi à visualiser des surfaces minérales [Hellwarth et Christensen, 1974] et des tissus biologiques [Roth et Freund, 1979] avant même l'avènement des premiers microscopes non linéaires, puis a été délaissé jusqu'à ce que de nouvelles molécules spécifiques générant ce signal de second harmonique soient développées pour la microscopie des milieux biologiques [Campagnola et al., 1999; Moreaux et al., 2001].

La génération de second harmonique est un processus cohérent. Elle se base sur un processus de diffusion non linéaire à l'échelle moléculaire appelé *diffusion hyper-Rayleigh* (ou HRS pour Hyper-Rayleigh Scattering). Les molécules capables de générer un tel phénomène sont appelées chromophores. Le diagramme simplifié de Jablonski de la figure I.5 schématise sous forme de transitions énergétiques le processus d'HRS. L'absence d'absorption dans ce processus implique que l'état d'excitation dans lequel se trouve la molécule est un état virtuel.

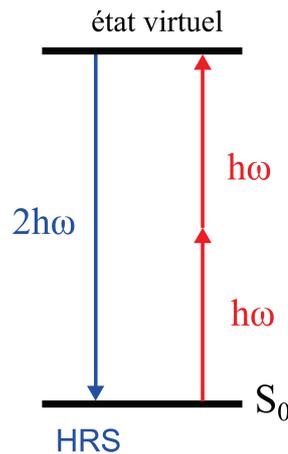


FIGURE I.5 – Diagramme de Jablonski simplifié illustrant le processus de diffusion hyper-Rayleigh d'une molécule. La pulsation de l'onde incidente est ω , celle de l'onde diffusée est de 2ω .

Diffusion non linéaire produite par une molécule

La diffusion par la molécule de l'onde incidente en une onde de fréquence doublée suppose une oscillation anharmonique asymétrique du cortège électronique de la molécule. L'anharmonicité est rendue possible par l'application de champs électriques intenses. La polarisation induite présente alors une réponse non linéaire en champ électrique \mathbf{E} et suit la loi décrite par l'équation I.3.

Cette équation montre par ailleurs qu'il est nécessaire que la molécule présente une asymétrie de son cortège électronique. En effet, si le cortège électronique de la molécule est centrosymétrique, la polarisation microscopique induite μ doit respecter :

$$\boldsymbol{\mu}(-\mathbf{E}) = -\boldsymbol{\mu}(\mathbf{E}) \quad (\text{I.20})$$

Cette condition n'est respectée que si le tenseur β est nul, interdisant la génération d'une fréquence double.

En revanche, une molécule dont le cortège électronique est asymétrique peut parvenir à générer ce signal. Ce genre de molécule peut être modélisée par une partie donneuse (D) et une partie acceptrice (A) d'électrons à ses extrémités.

SHG d'un ensemble de molécules non centrosymétriques

Le raisonnement précédent est valable à l'échelle macroscopique pour la polarisabilité d'un ensemble de molécules dans le cas de la génération du signal de second harmonique. Seuls les matériaux présentant une structure non centrosymétrique à la fois à l'échelle moléculaire (ou microscopique) et à l'échelle macroscopique sont ainsi capables de produire un signal cohérent de second harmonique. Si l'on nomme I_ω l'intensité d'un faisceau lumineux de pulsation ω incident sur l'ensemble de molécules, l'intensité de SHG I_{SHG} émise par cet ensemble de molécules respecte $I_{SHG} \propto I_\omega^2$ [Moreaux et al., 2000], ce qui se traduit par une localisation intrinsèque de l'émission de SHG dans le volume focal de l'objectif de microscope, d'une manière analogue à l'excitation multiphotonique de la fluorescence.

Les effets d'orientation des molécules entre elles sont essentiels pour interpréter les signaux de second harmonique. Lorsque l'on s'intéresse à ces phénomènes de diffusion non linéaire sur un ensemble de N molécules, deux cas peuvent être distingués. Les molécules peuvent être orientées aléatoirement l'une par rapport à l'autre (molécules en solution, par exemple) et la phase du champ électrique de l'onde de second harmonique $E_{(n)}^{2\omega}$ générée par la $n^{\text{ème}}$ molécule est également aléatoire. Le champ électrique $E^{2\omega}$ résultant provient de la somme des champs électriques générés par toutes les molécules. En l'absence de relation de phase entre les ondes HRS ainsi émises, les phénomènes d'interférences peuvent être négligés et l'intensité totale est la somme des intensités HRS produites par chacune des molécules. Dans ce cas, l'intensité produite à la fréquence double dépend linéairement du nombre N de molécules et est émise de façon isotrope, comme la fluorescence.

En revanche, si toutes les molécules sont orientées dans la même direction, l'amplitude et la phase de l'onde générée ne dépendent que du champ électrique incident et de la position des molécules les unes par rapport aux autres : les ondes HRS interfèrent cette fois constructivement dans la limite de l'accord de phase, et l'amplitude totale du signal SHG est la somme des amplitudes HRS issues de chacune des molécules. Dans ce cas, le champ total $E^{2\omega}$ est proportionnel au nombre N de chromophores présents dans le volume d'excitation. L'intensité SHG résultante est alors proportionnelle à N^2 .

Lorsque les molécules sont en position anti-parallèle deux à deux, les signaux de fréquence 2ω produits par chacune des paires de molécules sont en opposition de phase et interfèrent destructivement, annihilant le signal SHG. Ainsi, suivant l'orientation des molécules, les effets de phase entre les émissions HRS de chaque molécule modifient l'intensité du signal SHG. La figure I.6 illustre, dans des cas extrêmes, l'effet de l'orientation moléculaire sur le signal SHG.

Dans le cas d'une onde plane incidente sur cet ensemble de molécules, la loi de conservation de l'impulsion (accord de phase) implique que la SHG est le plus souvent générée de manière co-propageante avec l'onde incidente. Le système de détection doit donc être placé dans la direction de propagation de l'onde de pompe. Il est important de remarquer que si le signal de second harmonique est généré par un faisceau convergent, comme c'est le cas en microscopie, la phase de l'onde subit un déphasage de π lors du changement de signe du rayon de courbure, c'est-à-dire dans un domaine axial plus ou moins étendu, centré sur le foyer géométrique de l'objectif. C'est le déphasage de Gouy caractérisé par le paramètre ξ [Born et Wolf, 1999]. La figure I.7 présente ce phénomène. Les conditions d'accord de phase conduisent dans ce cas à trouver que la SHG est produite dans deux lobes symétriques par rapport à l'axe optique de la pompe et séparés angulairement de l'axe de propagation du faisceau de pompe d'un angle $2\theta_{pic}$ tel que [Mertz et Moreaux, 2001] :

$$\theta_{pic} = \pm \arccos \left(\xi \frac{n_\omega}{n_{2\omega}} \right) \quad (\text{I.21})$$

n_ω et $n_{2\omega}$ sont ici les indices de réfraction du milieu de propagation aux pulsations ω et 2ω respectivement.

Remarquons que sous certaines conditions, le signal de second harmonique peut être généré vers l'arrière [Tian et al., 2010]. La taille des diffuseurs et leur orientation jouent un rôle important dans le rapport entre les intensités de second harmonique

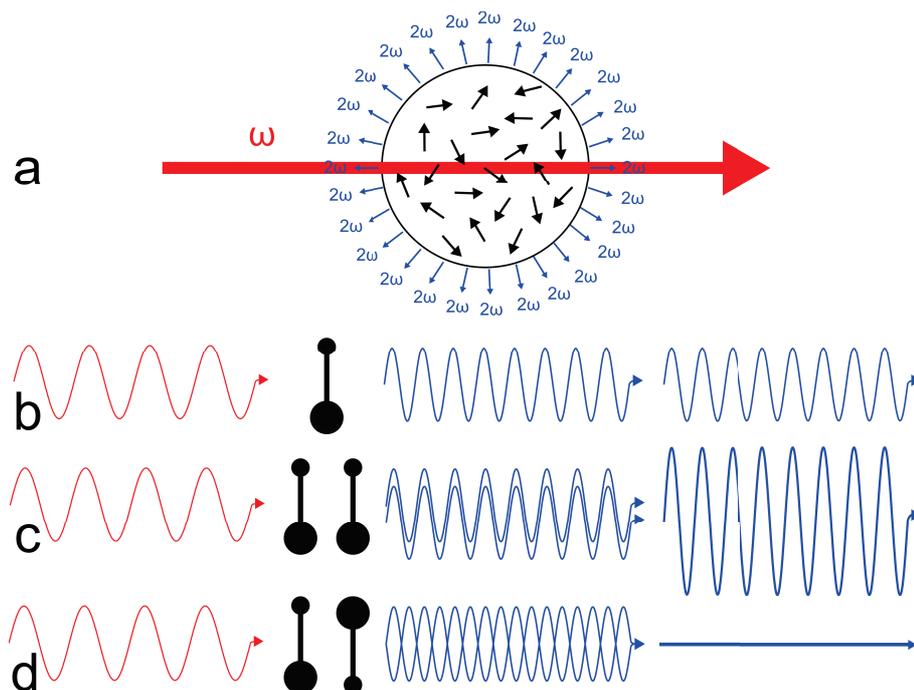


FIGURE I.6 – Effet de l'orientation des chromophores sur la génération de second harmonique. (a) Ensemble de N molécules orientées aléatoirement. La diffusion hyper-Rayleigh est dans ce cas incohérente et l'intensité du signal de second harmonique émis est proportionnelle à N . (b) Une molécule non centrosymétrique excitée par un champ électrique périodique intense de fréquence ω produit un signal périodique co-propageant de fréquence 2ω (oscillation anharmonique) en plus du signal à ω provenant de la diffusion linéaire. (c) et (d) Cas de deux molécules situées à une distance beaucoup plus petite que la longueur d'onde : (c) interférences constructives des signaux à 2ω pour des orientations parallèles et (d) destructives pour des orientations anti-parallèles des chromophores, résultant en un signal total d'amplitude nulle.

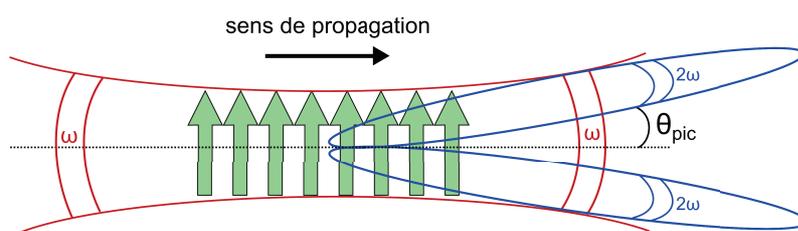


FIGURE I.7 – Génération de second harmonique à partir d'un faisceau focalisé dans une distribution uniforme de chromophores. Dans ce cas, le signal de second harmonique se propage hors axe selon deux lobes symétriques séparés de l'angle $2\theta_{pic}$. Les fronts d'onde sont représentés.

émises vers l'avant (*forward*) et vers l'arrière (*backward*) [Zipfel et al., 2003b]. Ce phénomène peut être utilisé pour détecter la SHG dans une configuration expérimentale autre qu'en transmission, comme ce doit être le cas en endoscopie.

Les techniques de microscopie se basant sur les trois phénomènes décrits précédemment (fluorescence linéaire, 2PEF et SHG) font l'objet de la section suivante.

I.3 Techniques de microscopie de fluorescence

I.3.1 Microscopie à champ large

La microscopie de fluorescence à champ large est la forme la plus ancienne de microscopie de fluorescence puisqu'elle découle directement de la microscopie à fond clair inventée il y a plus de 400 ans. Elle permet une observation visuelle (imagerie parallèle) d'échantillons le plus souvent marqués en fluorescence. Elle s'est donc développée au fur et à mesure des progrès en matière de sondes et de techniques de fluorescence.

Appliquée à l'étude des milieux biologiques, cette technique a permis d'imager des structures cellulaires spécifiques que la microscopie classique à fond clair ne parvient pas à révéler. Par exemple, un marquage par internalisation du DAPI, une molécule dont le spectre d'émission de fluorescence présente un pic situé dans le bleu, a permis d'imager pour la première fois l'ADN présent dans les noyaux cellulaires [Otto et al., 1991]. Un immunomarquage peut être requis pour mettre en évidence certaines protéines, notamment des protéines appartenant à la membrane plasmique d'une cellule [Buchwalow et al., 2005]. Le recours à des organismes génétiquement modifiés pour exprimer la GFP ou une molécule analogue a permis d'évaluer les processus de diffusion moléculaires *in vivo* [Zerangue et al., 2001; Reits et Neefjes, 2001].

L'un des principaux atouts de la microscopie de fluorescence en champ large est sa rapidité, qui n'est limitée que par les détecteurs et/ou le rapport signal à bruit, puisque tous les points de l'image sont enregistrés simultanément. Cet avantage est déterminant dans l'étude de phénomènes transitoires rapides [Vermot et al., 2008]. La contrepartie de cette rapidité est l'absence de sectionnement optique, qui pose un problème majeur s'agissant d'imagerie en profondeur dans les milieux biologiques notamment. L'absence de sectionnement optique limite la profondeur d'imagerie à la profondeur de champ de l'objectif du microscope. La profondeur de champ limitée

par la diffraction Δz est définie par :

$$\Delta z = \frac{2n\lambda}{NA^2} \quad , \quad (\text{I.22})$$

où λ est la longueur d'onde d'émission, n est l'indice de réfraction du milieu d'immersion de l'objectif et $NA = n \sin(\theta_{NA})$ est l'ouverture numérique de l'objectif. θ_{NA} est le demi-angle d'ouverture du cône de convergence de l'objectif. Le paramètre NA décrit la capacité d'un objectif à focaliser le faisceau excitateur ou à collecter la lumière en provenance du plan focal image. Pour un objectif à immersion d'eau ($n = 1,33$), d'ouverture numérique $NA = 0,9$, la profondeur de champ, à une longueur d'onde $\lambda = 0,52 \mu\text{m}$, est $\Delta z \simeq 1,71 \mu\text{m}$.

Pour des échantillons dont l'épaisseur est supérieure à la profondeur de champ, l'image obtenue est la superposition de l'image nette du plan focal et des images floues provenant des plans de fluorescence situés en-deçà et au-delà du plan focal. La résolution latérale des images $r_{rés}$, définie selon le critère de Rayleigh, est donnée par :

$$r_{rés} = \frac{1,22\lambda}{2NA} \quad (\text{I.23})$$

Dans les conditions précédentes, $r_{rés} \simeq 350 \text{ nm}$. Si l'on veut une forte résolution latérale (fort NA) en champ large, il faut utiliser des échantillons très minces car la profondeur de champ est faible (coupes histologiques de 5 à 10 μm). Si l'on veut obtenir des images en profondeur de résolution limitée par diffraction, il faut utiliser d'autres stratégies d'imagerie : microscopie en champ large à illumination contrôlée [Neil et al., 1997], microscopie confocale, etc.

Outre ce problème de sectionnement optique, l'imagerie de fluorescence en champ large n'est pas robuste à la diffusion. En effet, seuls les photons balistiques produisent des images de résolution limitée par la diffraction. Il existe des techniques en champ large permettant de sélectionner les photons balistiques et d'imager en milieu diffusant, comme l'imagerie par temps de vol [Das et al., 1993] ou l'imagerie holographique cohérente [Dunsby et French, 2003]. Ces techniques sont cependant dépourvues de sectionnement optique et doivent donc se limiter à une faible résolution latérale (faible NA, forte profondeur de champ) si l'échantillon est épais.

I.3.2 Microscopie confocale à balayage

La technique de microscopie confocale fut proposée pour la première fois par Minsky dans le but d'imager dans les milieux épais [Minsky, 1957].

La microscopie confocale renonce à l'imagerie parallèle qui est à la base de la technique de microscopie en champ large, au profit de l'imagerie par balayage (séquentielle). L'image est reconstruite point par point, à la manière d'une image vidéo. L'échantillon est balayé spatialement par le faisceau lumineux produit par l'objectif de microscope. Le faisceau est soit statique et la translation XY de l'échantillon assure le balayage du plan focal à imager ou, comme c'est le cas pour les microscopes confocaux modernes, le faisceau est balayé angulairement autour de la pupille d'entrée de l'objectif, à l'aide de miroirs galvanométriques (ou tout autre scanner permettant une déflexion de la lumière dans 2 plans orthogonaux).

La fluorescence émise est épicollectée puis acheminée optiquement vers une ouverture circulaire conjuguée du point focal de l'objectif et appelée trou confocal, dont le diamètre correspond au diamètre estimé ou mesuré de la tâche focale de l'objectif à travers le système collecteur. Comme le trou confocal est fixe, le faisceau de lumière épicollectée doit repasser par le scanner pour être "débalayé" ("descanné") afin de permettre son filtrage spatial. La fluorescence produite en dehors du volume focal de l'objectif est alors rejetée, ce qui permet d'imager à une profondeur supérieure à la profondeur de champ du microscope et de reconstruire des images 3D à partir de piles d'images 2D. Cette technique s'est véritablement développée à partir des années 70 avec la banalisation des sources laser (continue et impulsionnelle) et les progrès de la micro-informatique.

Les performances de la microscopie confocale sont bien connues. La tâche focale vue à travers le système de microscopie est appelée *Point Spread Function*, ou PSF. La taille de cette tâche définit la résolution du système. En utilisant le critère de Rayleigh, les résolutions latérale et axiale d'un microscope confocal sont approchées par les expressions suivantes [Jokman et Stelzer, 2002] :

$$w_{x,y}^{conf} = \frac{0,4\lambda_{em}}{NA} \quad (I.24)$$

$$w_z^{conf} = \frac{1,4n\lambda_{em}}{NA^2} \quad (I.25)$$

Dans les mêmes conditions qu'en microscopie de fluorescence en champ large, les

résolutions du microscope confocal sont $w_{x,y}^{conf} \simeq 230$ nm et $w_z^{conf} \simeq 1,2$ μ m.

La microscopie confocale est cependant limitée sur au moins deux plans. D'une part, les photons issus du volume focal qui sont diffusés avant de sortir du milieu n'ont pas plus de chance de passer par le trou confocal que les photons issus du reste de l'échantillon, ce qui limite la profondeur d'imagerie à typiquement une longueur de diffusion, soit environ 50 μ m dans les milieux biologiques. D'autre part, des sources d'excitation émettant dans le bleu ou le proche UV sont souvent employées pour exciter les fluorophores, ce qui peut endommager les tissus (phototoxicité cellulaire) qui sont éclairés par tout le diaphragme d'excitation de l'objectif pendant l'acquisition d'une image. Ce phénomène est encore plus important pendant l'acquisition d'une séquence d'images (3D, time-lapse). Notons enfin que, dans une moindre mesure, le filtrage spectral de l'excitatrice, au profit de la fluorescence produite par excitation à un photon, peut s'avérer délicat lorsque les fluorophores utilisés présentent un faible déplacement de Stokes. La microscopie multiphotonique, dont le principe est décrit dans la section suivante, peut être utilisée afin de pallier ces différentes limitations.

I.3.3 Microscopie multiphotonique à balayage

Principe

La microscopie multiphotonique est basée sur les phénomènes non linéaires de génération de la lumière. Seules les microscopies 2PEF et SHG seront utilisées dans ce travail de thèse, bien que d'autres contrastes existent (CARS, 3PEF, THG...).

Nous avons vu dans les sections I.2.2 et I.2.3 comment les interactions non linéaires dépendaient du confinement spatial et temporel des photons excitateurs. Une efficacité d'excitation importante peut alors être obtenue en focalisant très fortement dans le milieu des impulsions ultra-brèves. Dans ces conditions, on assiste à un confinement intrinsèque de l'excitation dans un volume focal limité par la diffraction. Ceci permet d'éviter une détection confocale de la lumière émise, au profit d'une détection en champ large, beaucoup plus efficace en présence de diffusion. C'est essentiellement cette efficacité de collection supérieure en présence de diffusion qui fournit à la microscopie non linéaire sa plus grande propension à imager dans les milieux turbides. Il a récemment été montré que la microscopie de fluorescence à 2 photons pouvait, dans certains tissus, atteindre des profondeurs d'imagerie de l'ordre du *mm* avec une résolution spatiale préservée [Parra et al., 2012]. La figure I.8 illustre cet aspect de confinement propre à une excitation multiphotonique.

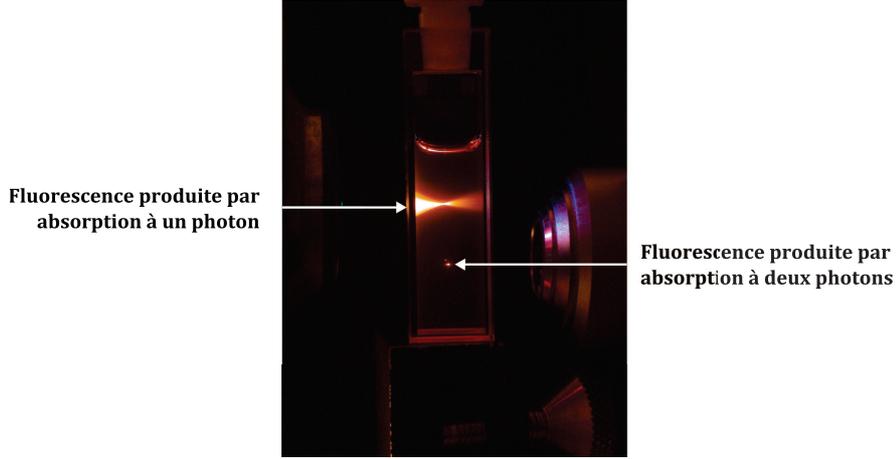


FIGURE I.8 – Confinement intrinsèque de l'émission de fluorescence produite par absorption à deux photons. La cuve contient une solution de fluorescéine de concentration $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. L'excitation linéaire est assurée par un laser continu visible ($\lambda = 488 \text{ nm}$) alors que l'excitation biphotonique est générée par un laser impulsionnel femtoseconde infrarouge ($\lambda = 1032 \text{ nm}$) (image extraite de [Leray, 2005]).

Résolution spatiale

Dans un modèle de faisceau gaussien fortement convergent, il est possible de montrer que les dimensions caractéristiques (taille du waist ou pincement à $1/e$) de la PSF non linéaire en absorption à 2 photons pouvaient être approximées par les expressions suivantes [Zipfel et al., 2003b] :

$$w_{x,y}^{2PEF} = \begin{cases} \frac{0,320\lambda_{exc}}{\sqrt{2}NA} & \text{pour } NA \leq 0,7 \\ \frac{0,325\lambda_{exc}}{\sqrt{2}NA^{0,91}} & \text{pour } NA > 0,7 \end{cases} \quad (\text{I.26})$$

$$w_z^{2PEF} = \frac{0,532\lambda_{exc}}{\sqrt{2}} \frac{1}{n - \sqrt{(n^2 - NA^2)}} \quad (\text{I.28})$$

Si on reprend les conditions d'éclairage précédentes ($\lambda_{exc} = 0,52 \mu\text{m}$, $NA = 0,9$, $n = 1,33$), les expressions précédentes fournissent des tailles de waist latérale et axiale $w_{x,y}^{2PEF} \simeq 210 \text{ nm}$ et $w_z^{2PEF} \simeq 890 \text{ nm}$, qui peuvent être assimilées aux résolutions latérale et axiale optimales du microscope à deux photons utilisé dans ces conditions. Notons que même si l'approximation d'un volume focal gaussien est suffisante dans beaucoup de simulations, ce volume ne correspond qu'à environ 68% du

volume réel obtenu par intégration numérique des approches vectorielles [Richards et Wolf, 1959].

De nombreuses techniques permettent d'améliorer la résolution spatiale. Celles-ci emploient des méthodes améliorant soit la collection de la lumière (microscopie thêta [Lindek et al., 1999], développement de nouvelles voies de collection [Zinter et Levene, 2011]), soit le processus d'excitation (microscopie par émission stimulée STED [Moneron et Hell, 2009], modification de front d'onde (pulse shaping) [Labroille, 2011], faisceau de Bessel [Fahrbach et al., 2013],...). Certaines de ces techniques ne sont cependant applicables qu'à des échantillons minces, car la lumière doit pouvoir traverser la préparation.

Intérêt de l'excitation à deux photons

Outre l'augmentation de l'efficacité de collection consécutive à l'absence de trou confocal en collection, les principaux avantages de la microscopie multiphotonique par rapport à la microscopie confocale sont les suivants :

– **Séparation des longueurs d'onde d'excitation et d'émission :**

L'émission de fluorescence et l'absorption à deux photons sont deux phénomènes séparés spectralement de quelques centaines de nanomètres. Le filtrage spectral de l'excitatrice au profit du signal utile est ainsi facilité.

– **Excitation dans le proche infrarouge :**

• **Augmentation de la profondeur d'imagerie :**

Dans l'intervalle de longueurs d'onde compris entre 0,8 et 1,3 μm environ, le coefficient de diffusion des milieux biologiques est plus faible que dans le visible. Le nombre de photons balistiques parvenant au foyer de l'objectif, en fonction de la profondeur d'imagerie, diminue ainsi moins vite en microscopie 2PEF qu'en microscopie 1PEF, d'autant plus que la longueur d'onde d'excitation est grande. De plus, l'efficacité de collection de la fluorescence, qui s'effectue en champ large, est sensiblement améliorée.

• **Diminution de la phototoxicité :**

La lumière infrarouge est considérablement moins toxique vis-à-vis des milieux vivants que les lumières bleue et proche UV souvent utilisées en microscopie confocale. La diminution de la phototoxicité est possiblement liée à

la réduction de la génération d'espèces oxygénées réactives [Squirrell et al., 1999], responsables en partie des procédés de mort cellulaire. Les éventuels photo-dommages sont en outre confinés dans le volume focal, de l'ordre de 1 femtolitre ($10^{-15}L$). Notons cependant que les forts champs électriques instantanés associés aux impulsions femtosecondes peuvent conduire à la génération de plasmas ainsi qu'à des effets photo-thermiques liés à l'absorption par les molécules d'eau, entraînant la destruction des cellules [König et Tirlapur, 2002].

– **Résolution spatiale conservée en milieu diffusant :**

Seuls les photons excitateurs balistiques participent à la génération de fluorescence, les photons diffusés n'étant plus corrélés temporellement et/ou spatialement aux photons non diffusés parvenant au plan focal de l'objectif. Dans ces conditions, une résolution proche de la limite de diffraction peut être conservée jusqu'à une profondeur correspondant à $\mu_s z_0 \simeq 5$ [Dunn et al., 2000], avec μ_s le coefficient de diffusion du milieu fluorescent et z_0 la profondeur d'imagerie.

La technique de microscopie non linéaire permet donc d'atteindre des profondeurs d'imagerie importantes et d'imager avec une résolution tri-dimensionnelle les milieux fluorescents épais et diffusants. Par ailleurs, de nombreux fluorophores déjà utilisés pour leurs propriétés de fluorescence linéaire répondent favorablement à une excitation à deux photons, ce qui permet de garder les protocoles de marquage classiques des échantillons biologiques.

I.4 Dispositif expérimental

Le microscope multiphoton utilisé durant ce travail est basé sur un microscope confocal commercial Olympus FV300/BX51WI (Olympus France, Rungis), modifié afin d'obtenir un système permettant de passer rapidement d'une conformation adaptée à l'imagerie de fluorescence linéaire à une configuration adaptée à une excitation non linéaire [Leray, 2005]. Avant de présenter le montage expérimental utilisé pour toutes les études abordées dans ce manuscrit, nous commençons par décrire le fonctionnement général d'un microscope à balayage.

I.4.1 Caractéristiques générales

Nous décrivons dans cette section le fonctionnement général d'un microscope confocal à balayage, la technique de microscopie non linéaire partageant la plupart

de ses éléments. Les figures I.9 et I.10 donnent un aperçu du principe.

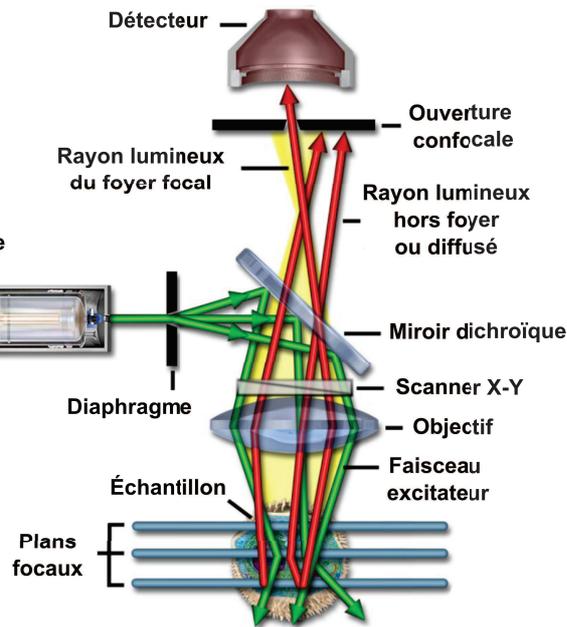


FIGURE I.9 – Principe de la microscopie confocale à épifluorescence. La fluorescence émise au point focal est collectée par le même objectif qui a servi à l'excitation².

La source d'excitation souvent employée en microscopie confocale est un laser continu. Ses caractéristiques peuvent différer selon les expériences (laser continu à longueurs d'onde fixes ou accordable). Les lasers continus peuvent aussi bien être des lasers à gaz ou solides, ces derniers étant de plus en plus appréciés pour leurs capacités permettant de placer plusieurs sources dans un volume réduit.

L'utilisation de miroirs galvanométriques orthogonaux, conjugués optiquement de la pupille d'entrée de l'objectif imageur, pour balayer angulairement le faisceau laser excitateur constitue la méthode de balayage la plus répandue. Un des miroirs balaie rapidement et continûment le faisceau selon un axe X (balayage de l'ordre de quelques millisecondes) alors que l'autre miroir tourne par incréments, à la fin de chaque ligne de l'image, dans la direction orthogonale Y . Typiquement, la durée d'acquisition d'une image est de l'ordre de la seconde, même si cette durée peut varier sensiblement selon la définition souhaitée et l'intensité de fluorescence disponible.

2. Image extraite du document en ligne [http : //www.olympusconfocal.com/theory/LSCMIntro.pdf](http://www.olympusconfocal.com/theory/LSCMIntro.pdf)

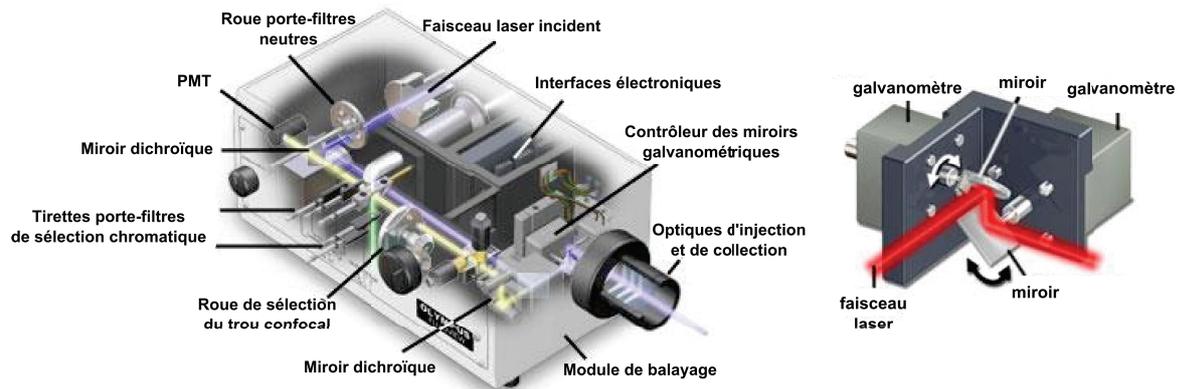


FIGURE I.10 – À gauche, détails du module de balayage du microscope confocal mis en oeuvre au cours de cette thèse (modèle FV300, Olympus). À droite, schéma des miroirs galvanométriques constituant le scanner du microscope³.

Dans notre microscope, l'angle de déflexion du faisceau laser est de l'ordre de $\pm 20^\circ$ maximum par rapport à l'axe optique à la sortie du scanner et de l'ordre $\pm 5^\circ$ au niveau du plan conjugué, confondu avec la pupille d'entrée de l'objectif. La taille linéaire de l'image est alors obtenue en multipliant la distance focale de l'objectif par le double de la tangente de cet angle.

L'une des difficultés de la microscopie à balayage est la recherche d'un compromis entre la vitesse d'acquisition des images (mode d'acquisition séquentiel) et l'intensité des signaux optiques. Pour fixer les idées, lorsqu'on réalise une image de 512×512 points en 1 seconde (conditions typiques), le temps de résidence par point ou pixel (pixel dwell-time en anglais) est de l'ordre de $4 \mu\text{s}$. Une étude du signal de photodétection (signal d'image) en microscopie 2PEF fait alors clairement apparaître une statistique poissonnienne qui montre que le rapport signal à bruit dans l'image est principalement limité par le bruit de photo-électrons. Un élément essentiel dans la chaîne d'acquisition du signal lumineux en microscopie à deux photons notamment est donc, outre l'efficacité de collection de la lumière générée, dont on aura l'occasion de parler dans la suite, l'efficacité quantique (EQ) des photo-détecteurs employés. Les photomultiplicateurs (PMT) à photocathode bialcaline qui équipent notre instrument ont une efficacité quantique d'au mieux 15% environ, alors que les PMTs à photocathode GaAsP des dernières générations de microscopes confocaux et multiphoton ont une EQ supérieure à 45% dans le jaune-rouge, idéal pour les fluorophores répondant dans le proche infrarouge (NIR) développés depuis peu [Pansare et al., 2012]. Certains microscopes montés en laboratoire intègrent même des pho-

3. Images extraites du site internet :
[http : //www.olympusconfocal.com/theory/confocalscanningsystems.html](http://www.olympusconfocal.com/theory/confocalscanningsystems.html)

todiodes à avalanche en mode comptage de photons dont le rendement quantique peut approcher les 100%, avec en contrepartie une surface photosensible qui les rend inutilisables dans le mode non descanné de la microscopie multiphotonique et qui posent problème lorsque les signaux sont forts (microscopie confocale notamment) du fait de leur fréquence de comptage limitée à quelques MHz.

I.4.2 Les éléments du dispositif

La figure I.11 présente une image du microscope à balayage mis en œuvre au laboratoire.

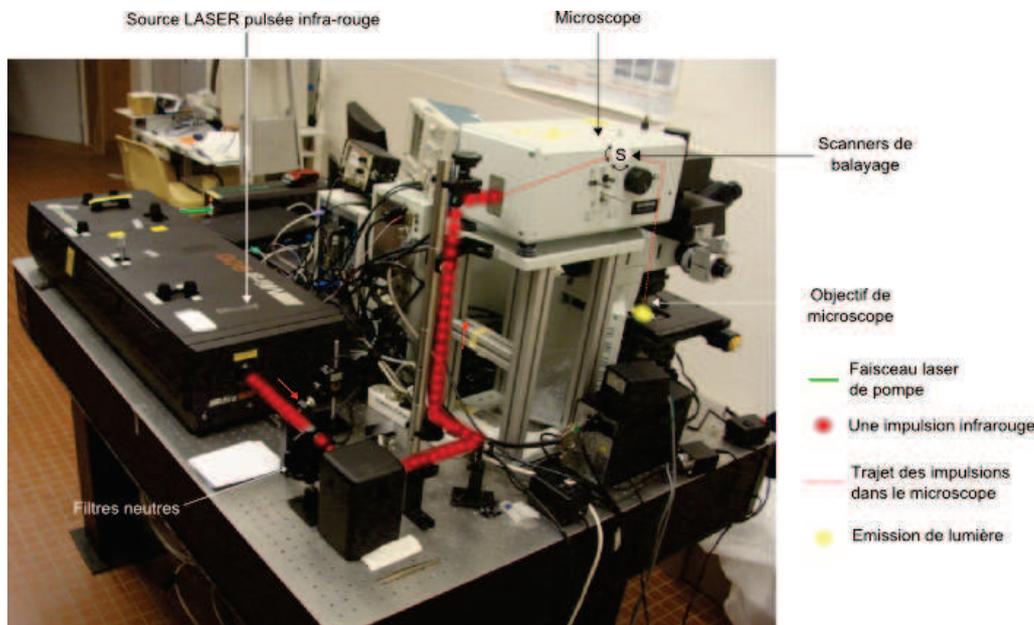


FIGURE I.11 – Dispositif expérimental développé au LSOL. On reconnaît sur l'image : à gauche, l'oscillateur laser femtoseconde $Ti :Sa$ (Coherent Mira900F, le faisceau en pointillés rouges symbolise le train des impulsions infrarouge émises) et au fond son laser de pompe de type $Nd :YVO_4$ émettant le faisceau vert continu de 5 W à 532 nm (Coherent Verdi5) ; sur la partie avant droite de la table optique, le module confocal (Olympus, FV300), cachant en partie le statif du microscope droit (Olympus, BX51WI). Les impulsions, volontairement rapprochées, devraient en réalité être espacées d'une distance de 4 mètres et mesurer environ $60 \mu m$ de long.

L'ensemble des éléments du dispositif expérimental est montré sur le schéma de la figure I.12.

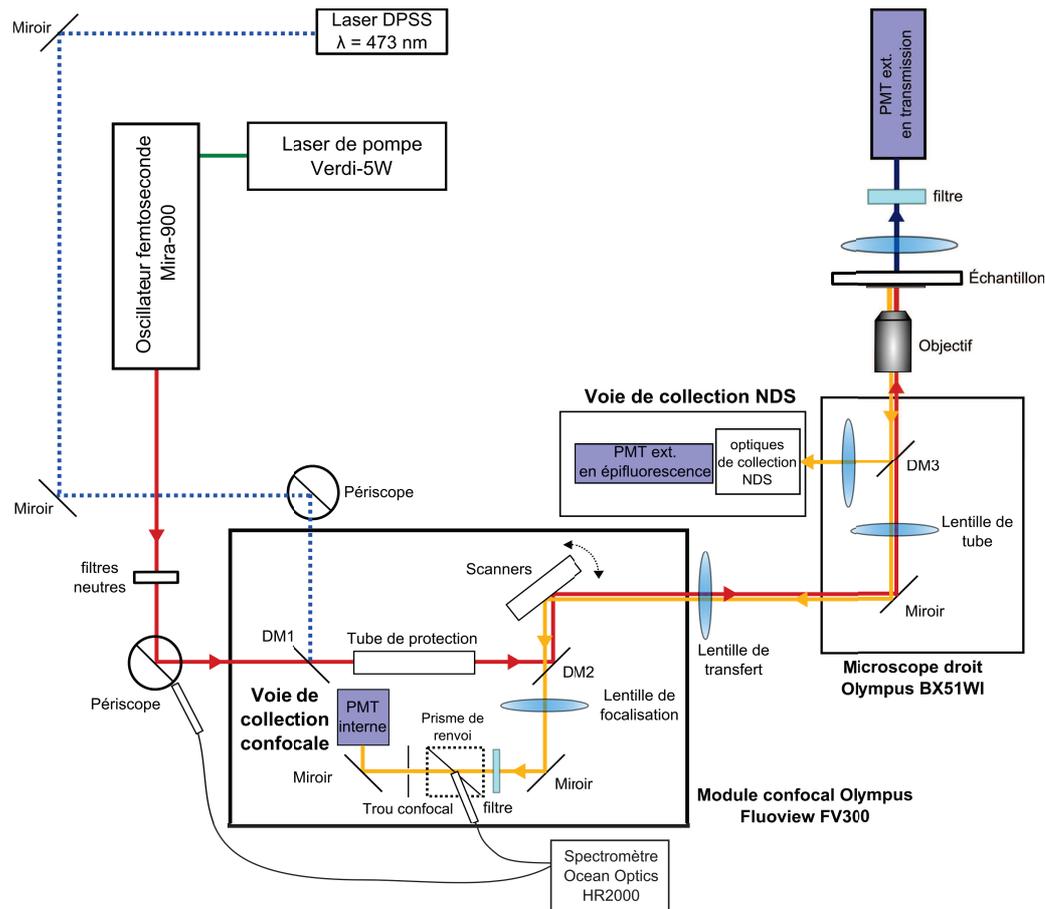


FIGURE I.12 – Schéma du montage expérimental (DM : Dichroic Mirror).

Sources laser

La source continue utilisée dans le mode confocal de notre microscope à balayage est un laser continu monomode transverse ($M^2 < 1,2$) émettant sur la raie à 473 nm (Shanghai Dream Lasers Co., Ltd, Modèle SDL 473 010T). Cette raie est issue du doublage intracavité par un cristal de BBO de la raie secondaire à 946 nm d'un cristal de $Nd:YAG$ pompé par une diode émettant à 808 nm. La puissance moyenne donnée par le constructeur est de 10 mW, mais notre laser délivre en réalité environ 20 mW (mesure effectuée par un puissance-mètre Thorlabs PM100A, tête de lecture S142C).

La source impulsionnelle mise en oeuvre dans toutes nos expériences de microscopie non linéaire est un laser titane-saphir, noté $Ti:Sa$ dans la suite (Coherent France, Les Ulis). Ce laser comporte un oscillateur femtoseconde (Mira 900F) à blocage de mode passif par effet Kerr dans le cristal de $Ti:Sa$ et associé à une fente placée dans la cavité (brevet "magic mode-locking" de Coherent). Le cristal est

pompé par un laser continu monomode transverse et longitudinal émettant 5 W dans la raie à 532 nm obtenue par doublage de fréquence intracavité (cristal de BBO) de la raie à 1064 nm du néodyme dans un cristal de $Nd :YVO_4$. Ce laser femtoseconde est accordable manuellement et sans purge à l'azote entre 700 et 900 nm environ, ce qui est suffisant pour la plupart des expériences de microscopie à deux photons.

La cadence de tir est de 76 MHz (intervalle spectral libre de la cavité de l'oscillateur). La puissance laser moyenne au pic d'émission (~ 800 -830 nm) est de l'ordre de 800 mW et la durée des impulsions comprise entre 150 et 200 fs en sortie d'oscillateur. L'impulsion s'élargit ensuite par dispersion chromatique (impulsion de 10 nm de large environ, limitée par transformée de Fourier) dans le microscope et sa largeur mesurée par auto-corrélation optique atteint environ 250 fs au foyer de l'objectif [Leray, 2005].

Injection du laser dans le microscope

La puissance du faisceau laser $Ti :Sa$ est contrôlée par un jeu de filtres de densités optiques différentes. Par exemple, la puissance laser moyenne en sortie du filtre de densité optique (OD) 0,3 est typiquement de 340 mW à 830 nm, et de 190 mW après le filtre de OD 0,6. Cette puissance est mesurée par un puissance-mètre adapté pour l'infrarouge (Gentec TPM310, tête de lecture PSV3103).

La mesure de la longueur d'onde d'émission du laser $Ti :Sa$ s'effectue au niveau d'une "fuite" de lumière à travers l'un des miroirs d'injection dans le module de balayage du microscope. Cette fuite est collectée par une fibre optique couplée à un spectromètre (HR2000, Ocean Optics Inc, Dunedin, FL, USA).

Le miroir dichroïque DM1 est un miroir Olympus FVX-DM488 (miroir dichroïque d'excitation par défaut). Il transmet près de 90% de la lumière aux longueurs d'onde supérieures à 500 nm, et réfléchit les longueurs d'onde inférieures. Ceci permet de passer très rapidement du mode linéaire (confocal) au mode non linéaire (2PEF et SHG), puisque les deux sources sont disponibles simultanément à l'entrée du microscope (figure I.12).

Chacun des faisceaux lasers traverse ensuite le module confocal avant d'atteindre un second miroir dichroïque (DM2) qui doit être changé pour passer d'un mode à l'autre. Les miroirs DM2 sont ainsi montés sur des supports en queue d'aronde qui viennent se fixer sur une glissière que l'on peut actionner de l'extérieur. DM2

est un modèle Olympus FVX488-568 pour le mode confocal et un modèle Chroma 675DCXRU pour le mode non linéaire. Le faisceau laser réfléchi par DM2 tombe immédiatement sur les miroirs galvanométriques du scanner, qui sont traités à l'argent qui est plus réfléchissant que l'aluminium dans l'infrarouge proche. Le faisceau réfléchi par le scanner sort du module confocal et rencontre un premier groupe de lentille (noté lentille de transfert sur la figure I.12).

Cette optique, de courte distance focale et d'angle d'acceptance élevé ($\pm 20^\circ$ minimum) constitue un télescope, en association avec la lentille de tube, de plus grande distance focale ($f_{tube} = 180$ mm), placée dans le statif du microscope. C'est cette lentille de tube qui intervient dans le grossissement des objectifs Olympus. Ce télescope a un double rôle. Tout d'abord, il permet d'élargir le faisceau laser (grandissement transverse de l'ordre de 3,3) de sorte qu'il remplisse la pupille d'entrée de l'objectif (on peut ainsi espérer s'approcher de la limite de diffraction). Ensuite il permet de ré-imager le scanner sur cette pupille d'entrée, ce qui est nécessaire au processus de balayage. Le miroir dichroïque DM3 est également un modèle Chroma 675DCXRU, utilisé pour collecter la lumière de fluorescence en mode non descanné (NDS).

I.4.3 Voies de collection des signaux optiques

Nous avons utilisé 3 objectifs de microscope de marque Olympus dans ce travail. Leurs caractéristiques sont données dans le tableau suivant :

Objectif	Grossissement	Immersion	NA	W.D.(mm)	$\phi_{FOV}^{DS}(\mu\text{m})$	$\phi_{FOV}^{NDS}(\mu\text{m})$
UPLSAPO	4X	air	0,16	13	500 ± 50	8700 ± 50
UPLSAPO	20X	air	0,75	0.6	90 ± 5	1700 ± 10
LUMPLFLN	60X	eau	0,90	2.0	30 ± 5	640 ± 10

TABLE I.1 – Caractéristiques des trois objectifs utilisés dans nos expériences.

W.D. est la distance de travail (*working distance*); elle représente la distance entre le plan focal de l'objectif et sa lentille frontale. Elle constitue donc une limite physique à la profondeur d'imagerie.

Les spectres de transmission des trois objectifs sont reportés sur la figure I.13.

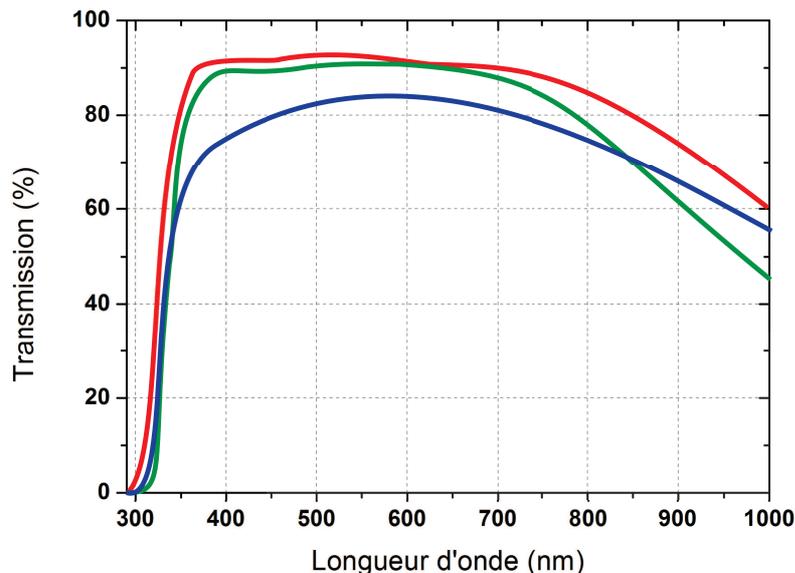


FIGURE I.13 – Spectres de transmission des objectifs 4X (rouge), 20X (vert) et 60X (bleu) référencés dans le tableau I.1 (données d'Olympus Corp.).

En l'absence de diffusion, l'efficacité d'épi-collection de la fluorescence produite dans le volume focal de l'objectif du microscope 2PEF, ne dépend que de l'ouverture numérique de cet objectif et de l'indice de réfraction du milieu d'immersion : $\eta_{bal} = \frac{1}{2}(1 - \cos\theta_{NA})$. En présence de diffusion, le problème de la collection de la fluorescence émise depuis le volume focal, est beaucoup plus compliqué et fait intervenir à la fois l'ouverture numérique et le champ de vue effectif du microscope ϕ_{FOV} . Ce dernier dépend directement du mode de collection de la fluorescence, il est beaucoup plus important pour la voie NDS que pour la voie DS. Le problème de l'efficacité de collection de la fluorescence en milieu diffusant a été abordé de manière théorique (théorie de la diffusion et simulations Monte Carlo) et expérimentalement par plusieurs groupes, et fait l'objet d'une attention particulière au chapitre II de ce manuscrit.

Notre microscope possède deux voies de collection de la fluorescence en mode non linéaire (figure I.14) : la voie de collection interne, dans laquelle la lumière de fluorescence repasse par les scanners de balayage (voie descannée (DS) en l'absence de trou confocal) et une voie de collection externe placée à proximité de la source d'émission de fluorescence (voie non descannée, notée NDS). Le développement et la mise en oeuvre de cette voie NDS, non commerciale, a fait l'objet d'une partie de la thèse d'A. LERAY et d'un article associé [Le Grand et al., 2008]. Les diamètres de ces champs de vue ϕ_{FOV}^{DS} et ϕ_{FOV}^{NDS} (et leurs rayons associés r_{FOV}^{DS} et r_{FOV}^{NDS}) ont été déterminés au laboratoire pour les trois objectifs en imageant des mires micro-

métriques à travers le microscope et en mesurant la partie de la mire effectivement détectée. Ces grandeurs sont résumées par le schéma de la figure I.14.

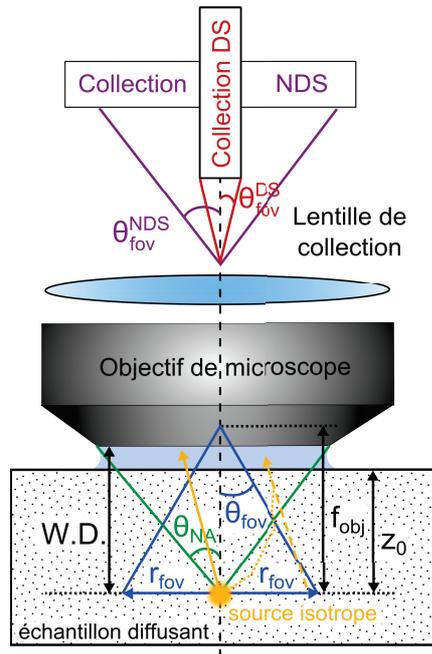


FIGURE I.14 – Grandeurs associées au système de collection du microscope.

Le champ de vue du système de collection est limité de façon ultime par celui de l'objectif lui-même. Des éléments optiques de la voie de collection le réduisent généralement, de façon drastique dans le cas de la voie DS qui comporte une détection lointaine de la fluorescence. La lumière repasse en effet par les scanners puis doit traverser le support d'un des trous confocaux volontairement retiré lorsqu'on passe du mode confocal au mode non linéaire de notre microscope. Le champ de vue angulaire $2\theta_{FOV}$ de la voie DS est ainsi environ 30 fois inférieur à celui des objectifs Olympus utilisés dans ce travail ($0,5^\circ$ environ contre 13 à 14°).

En mode confocal, il est nécessaire d'utiliser un trou de taille adaptée à la dimension transverse de la PSF si on souhaite obtenir un sectionnement optique dans les milieux fluorescents épais et une bonne résolution transverse en présence de diffusion. Typiquement on choisit l'ouverture confocale dont l'image dans le plan focal de l'objectif a une dimension comparable à celle de la PSF calculée pour l'objectif utilisé (valeur de la résolution transverse théorique, formule I.24). Le passage du plan confocal au plan focal (plan optiquement conjugué) met en jeu un grandissement transversal, qui est le produit du grossissement G de l'objectif utilisé (rapport des distances focales de la lentille de tube et de l'objectif) et du rapport des distances focales de la lentille de focalisation sur le trou confocal et de la lentille de transfert

(ce rapport vaut 3,55 dans le cas de notre microscope Olympus). La table I.2 donne les rayons r_p et r'_p des trous confocaux et de leur image dans le plan focal des objectifs utilisés au cours dans cette thèse, et les compare à la résolution théorique de ces objectifs, à la longueur d'onde de 520 nm.

$r_p(\mu\text{m})$	$r'_p(4X)(\mu\text{m})$	$r'_p(20X)(\mu\text{m})$	$r'_p(60X)(\mu\text{m})$
30	2,1	0,42	0,14
50	3,5	0,70	0,23
75	5,3	1,1	0,35
100	7,0	1,4	0,47
2600	183,1	36,6	12,2
$w_{x,y}^{conf}(\mu\text{m})$	1,30	0,28	0,23
$w_{x,y}^{2PEF}(\mu\text{m})$	1,17	0,25	0,21

TABLE I.2 – Comparaisons entre les rayons des trous confocaux r_p rapportés au plan focal des objectifs 4X, 20X et 60X et les résolutions latérales en mode confocal. La longueur d'onde d'émission de fluorescence utilisée pour le calcul des résolutions est de 520 nm. La dernière ligne du tableau donne, à titre de comparaison, les résolutions latérales théoriques dans le mode 2PEF de notre microscope (formules I.26 et I.27). La longueur d'onde d'excitation est ici de 830 nm.

En mode confocal, il est ainsi recommandé d'utiliser le trou #2 avec l'objectif 60X de NA 0,9 ($w_{x,y}^{conf} \simeq r'_p(\#2)$) et le trou #1 lorsqu'on utilise l'objectif 20X.

Notons que le module confocal (Olympus FV300) de notre microscope est équipé de deux PMTs du type Hamamatsu R928 (PMT à photocathode "side-on") dont l'efficacité quantique est comprise entre 10 et 20% dans la bande d'émission des fluorophores standards (400-600 nm). En mode confocal, un filtre passe-haut en transmission (Semrock BLP01-473) permet de rejeter l'excitatrice du laser $Nd:YAG$ doublée à 473 nm (OD 6). En mode non linéaire 2PEF, des filtres IR du type Schott BG39 (jusqu'à 7 mm de filtres, avec un OD5/mm à 830 nm) sont rajoutés en détection pour absorber l'excitatrice du laser $Ti:Sa$ qui est partiellement réfléchiée par la lamelle couvre-objet ou la surface de l'échantillon et non filtrée spatialement en l'absence de trou confocal.

Voie de collection en épifluorescence non descannée

L'efficacité de collection d'un microscope 2PEF, lorsqu'on cherche à imager en profondeur dans un milieu diffusant, dépend typiquement du carré du champ de vue du système de collection [Beaurepaire et Mertz, 2002]. Dans ce domaine, il y a donc beaucoup à gagner à collecter la fluorescence dans l'angle solide le plus grand possible à la sortie de l'objectif de microscope.

La collection non descannée (NDS) est basée sur ce principe. Le microscope à balayage du LSOL est équipé d'un dispositif de collection NDS entièrement conçu dans le cadre d'une thèse précédente [Leray, 2005]. En résumé, le système associe un miroir dichroïque, 3 lentilles et un PMT analogique (photographie et schéma de la figure I.15). Le miroir dichroïque (Chroma - modèle DCRXU675, DM3 sur le schéma I.12), placé dans la tourelle porte-cubes fluorescents du microscope, est transmissif pour le laser $Ti : Sa$ dans la bande 690-1100 nm et réfléchissant pour la fluorescence dans la bande 350-650 nm. Les 3 lentilles ont une double fonction : celle de collecter la fluorescence dans l'angle solide le plus grand possible au niveau de la pupille d'entrée de l'objectif et celle de ré-imager entièrement cette pupille, quelque soit sa taille (variable selon l'objectif) sur la photocathode du PMT. Ce dernier est du type analogique (Hamamatsu - H7710-13), à photocathode bialcaline, comme les PMTs internes du microscope ; son efficacité quantique est de l'ordre de 10% entre 400 et 600 nm.

La sortie en courant du PMT est connectée à un amplificateur transimpédance (C7319, Hamamatsu). Trois gains transimpédances sont disponibles : 10^5 , 10^6 et 10^7 volts/ampères. La valeur de 10^6 V/A est généralement utilisée car elle correspond à celle des PMTs internes du microscope et produit ainsi des signaux d'images comparables. Un jeu de filtres BG39 d'une épaisseur totale de 5 mm est inséré entre les deux dernières lentilles du module de collection NDS (OD15 à 830 nm) pour absorber le faisceau excitateur infrarouge résiduel. Le champ de vue de cette voie NDS est environ 20 fois supérieur à celui de la voie DS interne (cf. tableau I.1), ce qui permet d'améliorer l'efficacité de collection d'un facteur de l'ordre de 400 dans la limite diffusive. Notons que cette limite n'est jamais atteinte dans la pratique, puisque dans ce cas l'excitation de la fluorescence au foyer de l'objectif n'a pas lieu, en l'absence de photons balistiques l'atteignant. Des gains en efficacité de collection de l'ordre de 10 sont néanmoins couramment obtenus lorsque la profondeur d'imagerie atteint quelques libres parcours moyens de diffusion [Le Grand et al., 2008].

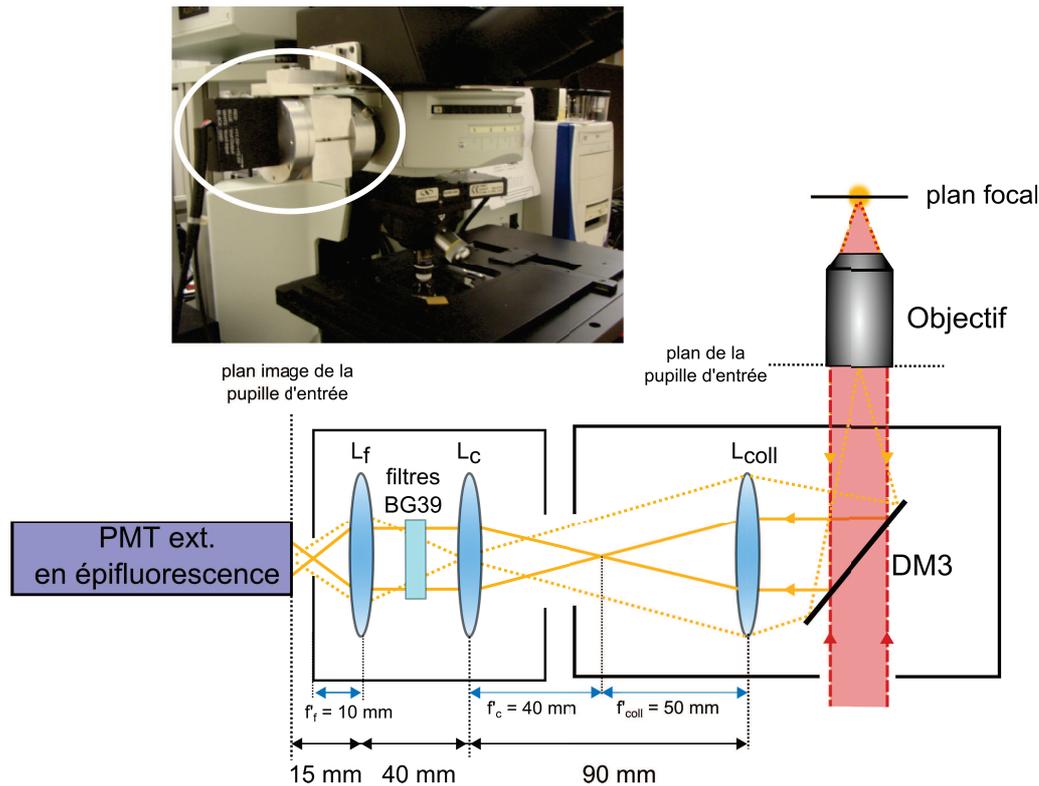


FIGURE I.15 – Schéma de la voie de collection non descannée. La partie du dispositif, comportant les deux lentilles et le filtre BG39 est extérieure au microscope, et est entourée en blanc sur la photographie.

Voie de collection SHG

Le signal de second harmonique est quant à lui détecté en transmission car il est produit essentiellement de façon co-propageante avec le faisceau de pompe. Nous verrons que cette conformation est particulièrement bien adaptée à l'étude de lames minces (coupes histologiques de foie fibrosé du chapitre IV). En revanche, des échantillons comme les explants de peau étudiés au chapitre III, d'une épaisseur de l'ordre du mm, rendent peu efficace la collection en transmission. Le schéma de la figure I.16 donne les éléments principaux de la voie de collection SHG.

Le signal SHG est collecté par un condenseur d'ouverture numérique NA supérieure ou égale à celle de l'objectif de focalisation du faisceau laser excitateur, du fait de la structure en lobes de l'émission SHG (cf. section I.2.3). L'association d'un filtre IR BG39 de 3 mm d'épaisseur et d'un filtre interférentiel à 415 nm (bande passante de 10 nm, modèle NT65-680 d'Edmund Optics), permet d'isoler le signal SHG à 415 nm (lorsque l'excitatrice est à 830 nm).

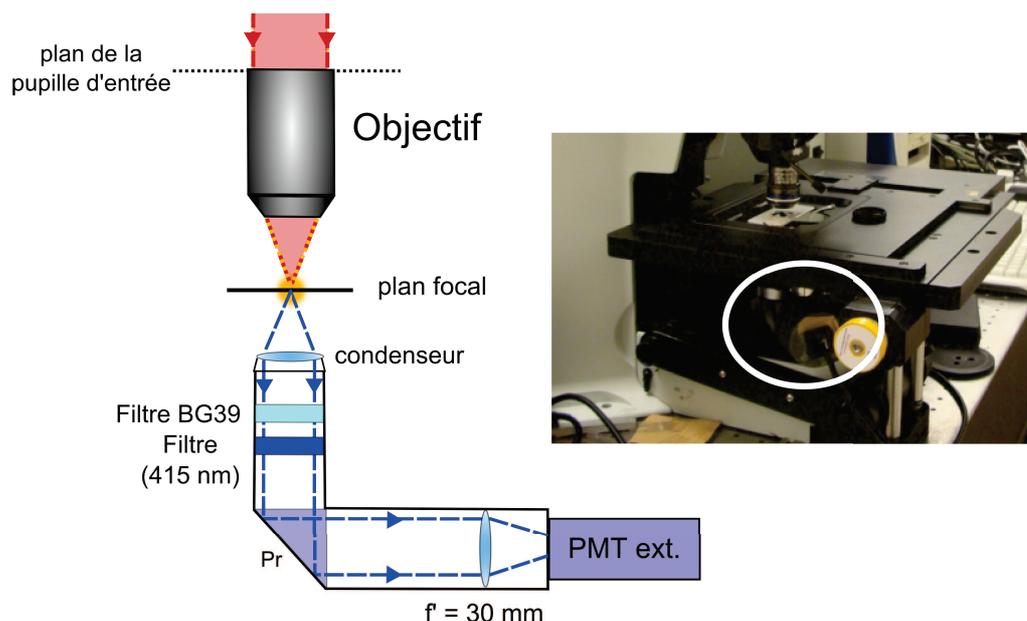


FIGURE I.16 – Schéma de la voie de collection SHG, entourée en blanc sur la photographie.

Le signal SHG filtré est alors renvoyé à 45° par un prisme à réflexion totale qui évite tout dichroïsme de polarisation à la réflexion, contrairement à un miroir métallique par exemple [Sevrain, 2010]. Le signal est finalement focalisé par une lentille d'une distance focale 30 mm sur un PMT analogique à photocathode de type "head-on" (H5783-01, Hamamatsu Photonics, Massy, France), choisi pour sa compacité (cf. figure I.16) et sa bonne efficacité quantique dans le bleu (détection de l'harmonique 2 du laser $Ti :Sa$). Ce PMT est connecté au même amplificateur transimpédance que celui de la voie NDS. Cependant, puisque cet amplificateur ne possède qu'une seule entrée, il n'est pas possible de réaliser une acquisition en parallèle sur la voie NDS et sur la voie SHG.

L'une des particularités remarquables de la SHG est qu'elle est très dépendante de la polarisation du faisceau de pompe car elle est produite de manière cohérente par des milieux anisotropes. Une manière d'exploiter cet effet pour mesurer l'orientation des objets qui génèrent ce signal à partir des images SHG acquises par un microscope non linéaire, est alors de modifier la polarisation du faisceau de pompe. Sur notre microscope, nous avons implémenté un dispositif de contrôle de la polarisation basé sur une lame demi-onde tournante dont la rotation est contrôlée informatiquement. En outre, la rotation peut être électroniquement activée par le signal de fin d'image fourni par notre microscope, ce qui permet d'acquérir automatiquement des piles d'images SHG sous différentes polarisations en une seule séquence, en utilisant la fonction "Image Stack" du logiciel du microscope.

Bibliographie

A

- Y. Amao, K. Asai, et I. Okura. Fluorescence quenching oxygen sensor using an aluminum phthalocyanine–polystyrene film. *Analytica Chimica Acta*, 407(1–2) : 41–44, 2000.
- D. L. Andrews. A simple statistical treatment of multiphoton absorption. *American Journal of Physics*, 53 :1001, 1985.

B

- E. Beaufort et J. Mertz. Epifluorescence collection in two-photon microscopy. *Applied optics*, 41(25) :5376–5382, September 2002.
- K. Berland. Basics of fluorescence. 2001.
- W. J. Betz, F. Mao, et G. S. Bewick. Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. *J. Neurosci*, 12(2) :363–375, 1992.
- M. Born et E. Wolf. Principles of optics : electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light. 1999.
- I. B. Buchwalow, E. A. Minin, et W. Boecker. A multicolor fluorescence immunostaining technique for simultaneous antigen targeting. *Acta Histochemica*, 107(2) : 143–148, 2005.

C

- P. J. Campagnola, M.-d. Wei, A. Lewis, et L. M. Loew. High-resolution nonlinear optical imaging of live cells by second harmonic generation. *Biophysical Journal*, 77(6) :3341–3349, 1999.

D

- B. B. Das, K. M. Yoo, et R. R. Alfano. Ultrafast time-gated imaging in thick tissues : a step toward optical mammography. *Optics Letters*, 18(13) :1092–1094, 1993.
- D. Debarre. Microscopie par génération de troisième harmonique appliquée à la biologie (thèse). 2006.
- W. Denk et K. Svoboda. Photon upmanship : why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron*, 18(3) :351–357, 1997.
- W. Denk, J. H. Strickler, et W. W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951) :73–76, 1990.
- A. Diaspro. Confocal and two-photon microscopy : foundations, applications, and advances. 2002.
- A. K. Dunn, V. P. Wallace, M. Coleno, M. W. Berns, et B. J. Tromberg. Influence of optical properties on two-photon fluorescence imaging in turbid samples. *Applied Optics*, 39(7) :1194–1201, 2000.
- C. Dunsby et P. M. W. French. Techniques for depth-resolved imaging through turbid media including coherence-gated imaging. *Journal of Physics D : Applied Physics*, 36(14) :R207, 2003.

F

- F. O. Fahrbach, V. Gurchenkov, K. Alessandri, P. Nassoy, et A. Rohrbach. Light-sheet microscopy in thick media using scanned bessel beams and two-photon fluorescence excitation. *Optics Express*, 21(11) :13824, 2013.
- P. A. Franken, A. E. Hill, C. W. Peters, et G. Weinreich. Generation of optical harmonics. *Physical Review Letters*, 7(4) :118–119, 1961.

G

- M. Göppert-Mayer. Über elementarakte mit zwei quantensprüngen. *Annalen der Physik*, 401(3) :273–294, 1931.

H

- P. Hanninen, S. Hell, J. Salo, E. Soini, et C. Cremer. Two-photon excitation 4Pi confocal microscope : Enhanced axial resolution microscope for biological research. *Applied Physics Letters*, 66(13) :1698–1700, 1995.
- S. W. Hell et J. Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission : stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics letters*, 19(11) :780–782, 1994.
- R. Hellwarth et P. Christensen. Nonlinear optical microscopic examination of structure in polycrystalline ZnSe. *Optics Communications*, 12(3) :318–322, 1974.

J

- J. Jokman et E. Stelzer. Resolution and contrast in confocal and two-photon microscopy. 2002.

K

- W. Kaiser et C. Garrett. Two-photon excitation in $\text{CaF}_2 : \text{Eu}^{2+}$. *Physical Review Letters*, 7(6) :229–231, 1961.
- K. König et U. Tirlapur. Confocal and two-photon microscopy : Foundations, applications and advances. 2002.

L

- G. Labroille. Imagerie tridimensionnelle multiphotonique des tissus biologiques à l'aide d'impulsions façonnées (thèse). 2011.
- Y. Le Grand, A. Leray, T. Guilbert, et C. Odin. Non-descanned versus descanned epifluorescence collection in two-photon microscopy : Experiments and monte carlo simulations. *Optics Communications*, 281(21) :5480–5486, 2008.
- A. Leray. Microscopie multiphotonique appliquée à la biologie (thèse). 2005.
- S. Lindek, J. Swoger, et E. H. K. Stelzer. Single-lens theta microscopy : Resolution, efficiency and working distance. *Journal of Modern Optics*, 46(5) :843–858, 1999.

M

- P. Maker, R. Terhune, M. Nisenoff, et C. Savage. Effects of dispersion and focusing on the production of optical harmonics. *Physical Review Letters*, 8(1) :21, 1962.
- J. Mertz et L. Moreaux. Second-harmonic generation by focused excitation of inhomogeneously distributed scatterers. *Optics communications*, 196(1) :325–330, 2001.
- J. D. Mills, J. R. Stone, D. G. Rubin, D. E. Melon, D. O. Okonkwo, A. Periasamy, et G. A. Helm. Illuminating protein interactions in tissue using confocal and two-photon excitation fluorescent resonance energy transfer microscopy. *Journal of biomedical optics*, 8(3) :347–356, 2003.
- M. Minsky. Confocal patent focal scanning microscope. *US patent, serial*, (3,013,467), 1957.
- G. Moneron et S. W. Hell. Two-photon excitation STED microscopy. *Optics Express*, 17(17) :14567–14573, 2009.
- L. Moreaux, O. Sandre, et J. Mertz. Membrane imaging by second-harmonic generation microscopy. *Journal of the Optical Society of America B*, 17(10) :1685–1694, 2000.
- L. Moreaux, O. Sandre, S. Charpak, M. Blanchard-Desce, et J. Mertz. Coherent scattering in multi-harmonic light microscopy. *Biophysical Journal*, 80(3) :1568–1574, 2001.
- J.-E. Moser. Processus photochimiques (notes de cours). 2000.

N

- M. Neil, R. Juskaitis, et T. Wilson. Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope. *Optics letters*, 22(24) :1905–1907, 1997.

O

- F. Otto, Z. Darzynkiewicz, et H. A. Crissman. *Methods in cell biology : flow cytometry*. 1991.

P

- V. J. Pansare, S. Hejazi, W. J. Faenza, et R. K. Prud'homme. Review of long-wavelength optical and NIR imaging materials : Contrast agents, fluorophores, and multifunctional nano carriers. *Chemistry of Materials*, 24(5) :812–827, 2012.
- S. G. Parra, S. S. Vesuna, T. A. Murray, et M. J. Levene. Multiphoton microscopy of cleared mouse brain expressing YFP. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (67) :e3848, 2012.

R

- E. A. J. Reits et J. J. Neefjes. From fixed to FRAP : measuring protein mobility and activity in living cells. *Nature Cell Biology*, 3(6) :E145–E147, 2001.
- B. Richards et E. Wolf. Electromagnetic diffraction in optical systems. II. structure of the image field in an aplanatic system. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 253(1274) :358–379, 1959.
- S. Roth et I. Freund. "Second harmonic generation in collagen". *The Journal of Chemical Physics*, 70(4) :1637–1643, 1979.

S

- D. Sevrain. Mise en place d'une expérience de microscopie multiphotonique (stage de master). 2010.
- J. M. Squirrell, D. L. Wokosin, J. G. White, et B. D. Bavister. Long-term two-photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability. *Nature biotechnology*, 17(8) :763–767, 1999.

T

- L. Tian, J. Qu, Z. Guo, Y. Jin, Y. Meng, et X. Deng. Microscopic second-harmonic generation emission direction in fibrillous collagen type I by quasi-phase-matching theory. *Journal of Applied Physics*, 108(5) :054701–054701–9, 2010.

V

- B. Valeur. Lumière et luminescence : ces phénomènes lumineux qui nous entourent. 2005.
- J. Vermot, S. E. Fraser, et M. Liebling. Fast fluorescence microscopy for imaging the dynamics of embryonic development. *HFSP journal*, 2(3) :143–155, 2008.
- A. Volkmer. Vibrational imaging and microspectroscopies based on coherent anti-stokes raman scattering microscopy. *Journal of Physics D : Applied Physics*, 38 (5) :R59, 2005.

W

- H. Wallrabe et A. Periasamy. Imaging protein molecules using fret and flim microscopy. *Current opinion in biotechnology*, 16(1) :19–27, 2005.

X

- C. Xu, W. Webb, et J. Lakowicz. Multiphoton excitation of molecular fluorophores and nonlinear laser microscopy. 2002.

Z

- N. Zerangue, M. J. Malan, S. R. Fried, P. F. Dazin, Y. N. Jan, L. Y. Jan, et B. Schwappach. Analysis of endoplasmic reticulum trafficking signals by combinatorial screening in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(5) :2431–2436, 2001.
- J. P. Zinter et M. J. Levene. Maximizing fluorescence collection efficiency in multiphoton microscopy. *Optics Express*, 19(16) :15348–15362, 2011.
- W. R. Zipfel, R. M. Williams, R. Christie, A. Y. Nikitin, B. T. Hyman, et W. W. Webb. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12) :7075–7080, 2003a.
- W. R. Zipfel, R. M. Williams, et W. W. Webb. Nonlinear magic : multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotech*, 21(11) :1369–1377, 2003b.

Chapitre II

Mesure des paramètres de diffusion dans les milieux turbides

II.1 Introduction

La mesure non invasive des propriétés optiques des tissus biologiques offre des possibilités et des perspectives intéressantes en termes de diagnostic de certaines pathologies (carcinome, fibrose) [Germer et al., 1998] et d'évaluation de l'état métabolique ou de la dose lumineuse à administrer (thérapie photodynamique, photocoagulation) [Tuchin, 1997]. La caractérisation des processus d'absorption et de diffusion de la lumière au sein d'un tissu passe par la mesure de paramètres physiques qui lui sont associés. La détermination de ces paramètres est délicate et repose en général sur la combinaison d'au moins deux mesures indépendantes, alourdissant les protocoles expérimentaux.

Au cours de cette thèse, nous avons développé une nouvelle méthode de mesure des paramètres de diffusion (coefficient de diffusion et facteur d'anisotropie) des milieux turbides. Cette méthode est basée sur une seule expérience de microscopie 2PEF. Elle exploite de façon différentielle les modes de collection DS et NDS de notre microscope non linéaire pour accéder aux paramètres de diffusion d'un milieu épais par épi-fluorescence, ceci indépendamment de l'absorption. Nous introduisons dans un premier temps les paramètres physiques que nous cherchons à mesurer, et les techniques connues pour les déterminer. Nous validons ensuite le principe de notre méthode à l'aide de simulations Monte-Carlo et d'un modèle analytique simple, puis nous mesurons les paramètres de diffusion de milieux biomimétiques de propriétés optiques contrôlées et de milieux biologiques réels.

II.2 Milieux turbides et processus de diffusion

Lorsqu'une onde lumineuse traverse un milieu matériel, plusieurs effets peuvent être observés dont l'importance varie généralement avec la fréquence de cette onde, et dans certains cas avec son amplitude (effets non linéaires) et sa polarisation (réponse anisotrope). De manière générale, nous pouvons classer ces phénomènes en deux catégories :

- **les processus élastiques** : processus qui conservent l'énergie des photons et ne participent qu'à la redistribution de l'énergie électromagnétique associée, dans l'espace et le temps. Les processus de diffusion de Rayleigh et de Mie en font partie.
- **les processus inélastiques** : processus qui modifient l'énergie des photons et redistribuent l'énergie électromagnétique associée, dans l'espace et le temps. Il s'agit notamment des processus de diffusion inélastique (Brillouin, Raman, hyper-Rayleigh) et de fluorescence ou de phosphorescence.

A ces phénomènes de diffusion, s'ajoutent ceux d'absorption, linéaire (à un photon) et non linéaire (à deux photons notamment). Notons que les effets de diffusion sont exacerbés aux fréquences pour lesquelles l'absorption est forte. Ces phénomènes sont à l'origine de méthodes d'investigation des milieux turbides à différentes échelles, et peuvent par exemple être utilisés à des fins d'analyse et de diagnostic médical [Balas, 2009]. Les paramètres macroscopiques qui les caractérisent (le coefficient d'absorption, le coefficient de diffusion et le facteur d'anisotropie) sont définis dans la suite du manuscrit.

Absorption et coefficient d'absorption

Nous avons présenté dans le chapitre I le processus d'absorption de la lumière en considérant la capacité d'une molécule à absorber des photons. Nous pouvons également décrire ce phénomène en définissant le coefficient d'absorption μ_a , exprimé en cm^{-1} . Ce paramètre est proportionnel au nombre de particules absorbantes dans le milieu ρ_a , et à leur section efficace d'absorption à un photon $\sigma_a(\lambda)$ pour une longueur d'onde λ donnée :

$$\mu_a(\lambda) = \rho_a \times \sigma_a(\lambda) \quad (\text{II.1})$$

Ce coefficient caractérise ainsi la capacité d'un milieu à absorber la lumière incidente à l'échelle macroscopique. L'atténuation d'un faisceau lumineux d'intensité

initiale I_0 et traversant un milieu homogène d'épaisseur L , linéairement absorbant et non diffusant est décrit par la loi de Beer-Lambert :

$$I(L) = I_0 e^{-\mu_a L} \quad (\text{II.2})$$

Coefficient de diffusion

La diffusion est un processus lié à la présence d'hétérogénéités locales d'indice de réfraction dans un milieu. Elle dépend à la fois de la taille caractéristique D des diffuseurs, de la longueur d'onde λ et de la polarisation de la lumière se propageant dans ce milieu, de la concentration en diffuseurs et du rapport entre les indices de réfraction des diffuseurs et de leur environnement. On distingue deux régimes de diffusion :

- lorsque $D < \lambda/10$, le régime de diffusion est qualifié de régime de Rayleigh, décrit pour la première fois par Lord Rayleigh en 1871 [Rayleigh, 1871]. Ce processus privilégie la diffusion des courtes longueurs d'onde, l'intensité de diffusion variant comme $1/\lambda^4$. C'est dans ce régime que diffusent les molécules de l'atmosphère, ce qui explique la couleur bleue du ciel.
- lorsque $D \geq \lambda$, la diffusion est décrite sur la base des équations de Maxwell. On parle dans ce cas de diffusion de Mie [Mie, 1908]. On observe alors que la diffusion a lieu d'autant plus vers l'avant que la particule est plus grande devant la longueur d'onde (diffusion anisotrope), l'intensité diffusée variant comme $1/\lambda$. Cette diffusion est donc moins sensible à la longueur d'onde et explique la couleur blanche des nuages.
- lorsque $D \gg \lambda$, les lois de la théorie de la diffraction suffisent à modéliser la distribution angulaire de l'intensité diffusée.

Dans le cas d'un tissu biologique, de nombreuses structures de tailles très dispersées (figure II.1) interagissent avec la lumière. On définit alors un coefficient de diffusion moyen μ_s , qui rend compte de la distribution des tailles des diffuseurs à l'échelle du volume sondé par la lumière. Ce coefficient est de l'ordre de la centaine de cm^{-1} dans les tissus biologiques [Cheong et al., 1990; Tuchin]. L'inverse de ce coefficient est le libre parcours moyen de diffusion $l_s = \mu_s^{-1}$, qui caractérise la distance moyenne entre deux événements de diffusion.

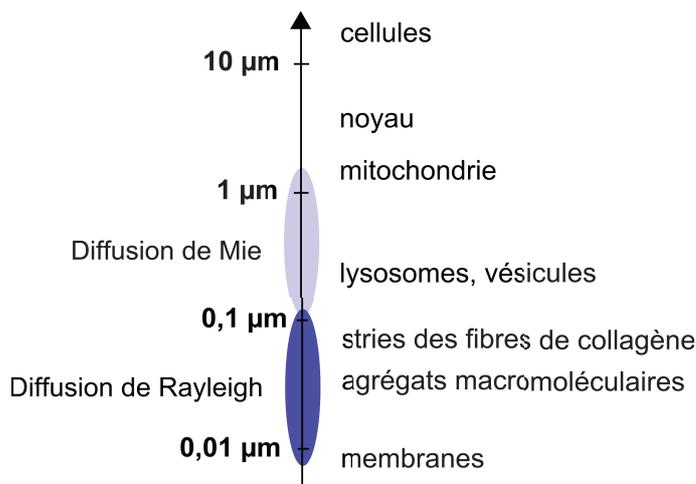


FIGURE II.1 – Tailles caractéristiques de différentes structures biologiques (extrait de <http://omlc.ogi.edu/classroom/ece532/class3/scatterers.html>).

Lorsque la diffusion domine l'absorption, le milieu étudié est qualifié de **turbide**. Dans l'intervalle de longueur d'onde compris entre $0,6 \mu\text{m}$ et $1,3 \mu\text{m}$, les tissus biologiques diffusent plus qu'ils n'absorbent. Ce domaine spectral est appelé fenêtre thérapeutique [Anderson et Parrish, 1981] (figure II.2). Notons que dans le cas des milieux biologiques, la diffusion est un mélange des régimes de Rayleigh et de Mie (figure II.2(b)).

Comme pour l'absorption, on peut définir une section efficace de diffusion :

$$\sigma_s(\mathbf{s}) = \frac{P_s}{I_0} \quad (\text{II.3})$$

où \mathbf{s} est la direction de l'onde plane incidente par rapport à la particule diffusante, I_0 son intensité ($\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$) et P_s la puissance totale diffusée (W). La dépendance en longueur d'onde est implicite pour alléger l'écriture. Le coefficient de diffusion μ_s est relié à la section efficace de diffusion par l'expression :

$$\mu_s = \rho_s \times \sigma_s \quad , \quad (\text{II.4})$$

où ρ_s est la concentration en particules diffusantes.

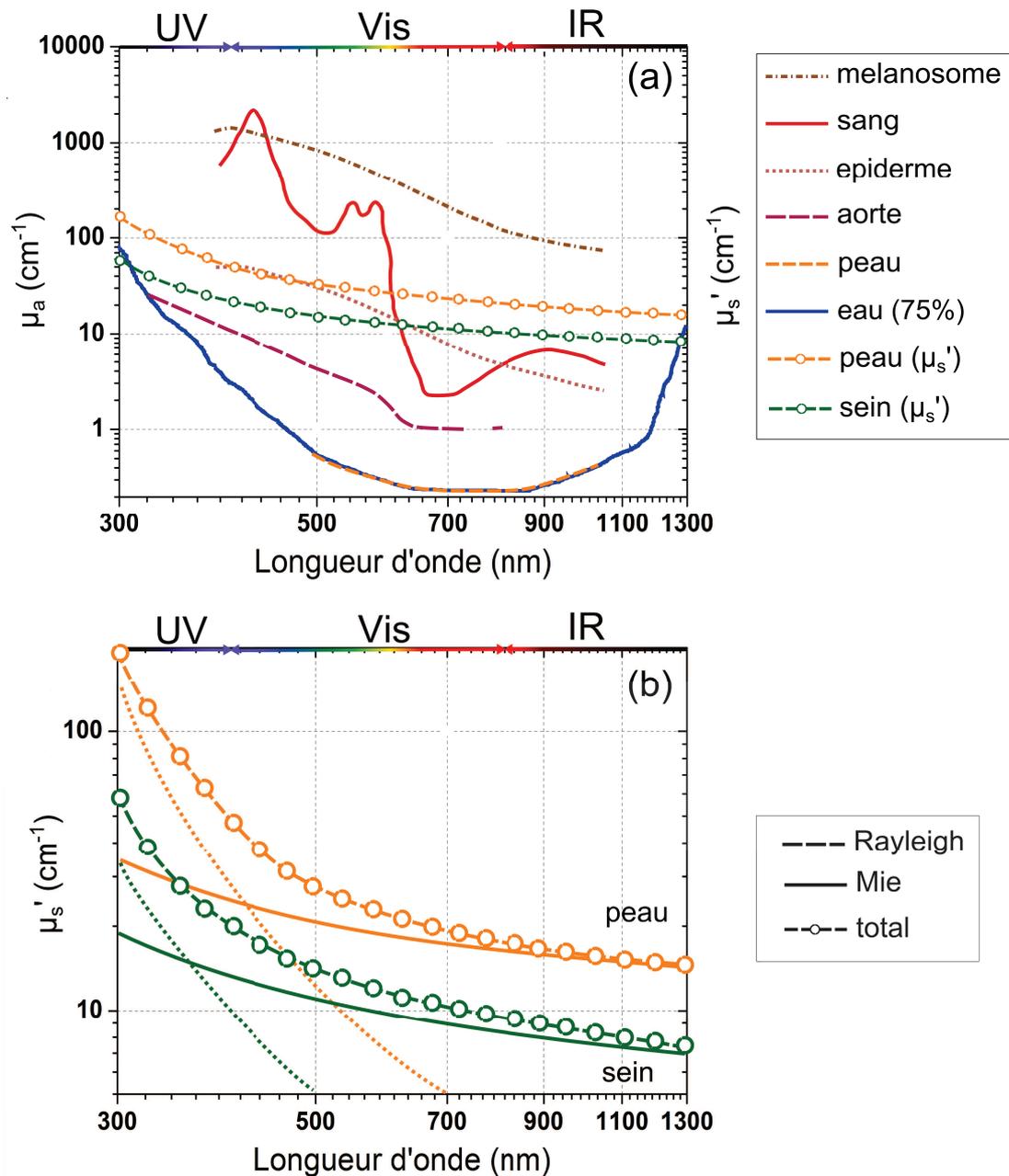


FIGURE II.2 – (a) Coefficients d'absorption μ_a et coefficients de diffusion réduits μ'_s des principaux constituants des tissus biologiques et de quelques structures du vivant. Les échelles de μ_a et de μ'_s sont identiques. UV : ultraviolet, Vis : visible et IR : infrarouge (données extraites du site internet de l'Oregon Medical Laser Center, <http://omlc.ogi.edu/classroom/ece532/class3/muaspectra.html>). (b) Agrandissement de la représentation des coefficients de diffusion réduit μ'_s de (a) (extrait et modifié de [Jacques, 2013]).

De la même manière que pour l'absorption, l'intensité lumineuse associée aux photons balistiques en sortie d'un milieu de coefficient de diffusion μ_s et d'épaisseur L peut s'écrire en fonction de l'intensité incidente sous la forme d'une loi de Beer-Lambert :

$$I(L) = I_0 e^{-\mu_s L} \quad (\text{II.5})$$

Le rapport $I(L)/I_0$ est aussi la probabilité de non diffusion d'un photon à la traversée d'un milieu diffusant d'épaisseur optique $\mu_s L$, ou probabilité que le photon reste balistique. Elle est complémentaire de la probabilité de diffusion \mathcal{P} , c'est-à-dire la probabilité qu'un photon diffuse au moins une fois à la traversée du milieu. Cette probabilité peut être obtenue en sommant la probabilité p_n qu'un photon diffuse n fois si le nombre moyen de diffusions est $m = \mu_s L$:

$$\mathcal{P} = \sum_{n=1}^{\infty} p_n = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{m^n}{n!} e^{-m} \quad (\text{II.6})$$

L'efficacité de la diffusion Q_s est définie par :

$$Q_s = \frac{\sigma_s}{A} \quad , \quad (\text{II.7})$$

où A est l'aire géométrique de la particule diffusante [Van de Hulst].

Si le milieu est à la fois diffusant et absorbant, on introduit un coefficient d'atténuation total μ_t tel que :

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s \quad , \quad (\text{II.8})$$

et le libre parcours moyen total l_t par $l_t = \frac{1}{\mu_t} = \frac{l_a l_s}{l_a + l_s}$.

Facteur d'anisotropie

Après avoir subi un événement de diffusion, un photon voit sa direction de propagation incidente \mathbf{s} changée en \mathbf{s}' (figure II.3). Dans le référentiel de la particule diffusante et de \mathbf{s} , on introduit usuellement, en coordonnées sphériques, les angles polaires θ et d'azimut Ψ .

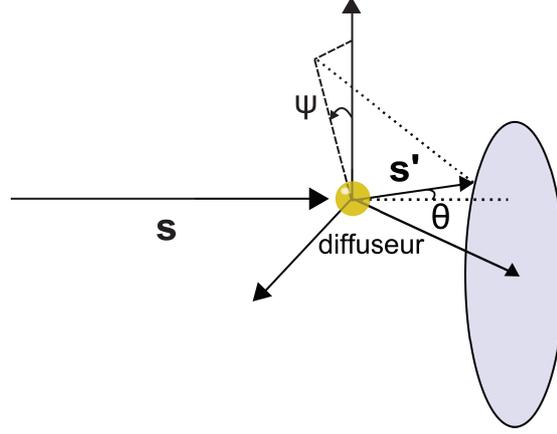


FIGURE II.3 – Grandeurs angulaires associées au processus de diffusion.

θ est l'angle entre les directions de propagation \mathbf{s} et \mathbf{s}' de l'onde provenant de la source avant et après la diffusion respectivement, et Ψ est l'angle azimutal. La probabilité qu'un photon incident dans la direction \mathbf{s} soit diffusé dans la direction \mathbf{s}' après diffusion est donnée par la fonction de phase $p(\mathbf{s}, \mathbf{s}')$:

$$p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') = \frac{1}{\sigma_s} \frac{d\sigma_s}{d\Omega}(\mathbf{s}, \mathbf{s}') \quad , \quad (\text{II.9})$$

où $d\Omega$ est l'angle solide élémentaire porté par la direction \mathbf{s}' et $\frac{d\sigma_s}{d\Omega}(\mathbf{s}, \mathbf{s}')$ représente la section efficace de diffusion différentielle.

Dans le cas d'un diffuseur sphérique, cette fonction prend la forme :

$$p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') = p(\mathbf{s} \cdot \mathbf{s}') = p(\cos\theta) \quad (\text{II.10})$$

Par ailleurs, la condition de normalisation de la densité de probabilité sur l'angle solide total (4π sr) implique que $\int_{4\pi} p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') d\Omega = 1$, soit :

$$\int_{4\pi} p(\cos\theta) \sin\theta d\theta d\Psi = 2\pi \int_0^\pi p(\cos\theta) \sin\theta d\theta = 1 \quad , \quad (\text{II.11})$$

en considérant la symétrie axiale de la diffusion du fait de la symétrie sphérique du diffuseur. L'espérance de la densité de probabilité angulaire $p(\cos\theta)$ est donnée par :

$$g = \langle \cos\theta \rangle = \int_{4\pi} p(\cos\theta) \cos\theta d\Omega \quad (\text{II.12})$$

g est nommé facteur d'anisotropie. Sa valeur indique la tendance de la diffusion.

Dans le cas d'une particule sphérique (symétrie azimutale), ce facteur se réécrit sous la forme :

$$g = 2\pi \int_0^\pi p(\cos\theta) \cos\theta \sin\theta d\theta \quad (\text{II.13})$$

Si la diffusion a lieu plutôt vers l'avant, g est proche de 1, si c'est plutôt vers l'arrière, g est proche de -1, et si la diffusion est aussi forte vers l'avant que vers l'arrière, g est nul. Notons toutefois qu'une valeur nulle de g ne signifie pas forcément que la diffusion est isotrope, alors que si la diffusion est isotrope, g est nécessairement nul.

Dans le cas du régime de Rayleigh et pour une lumière incidente non polarisée, la fonction de phase $p(\cos\theta)$ prend la forme [Rayleigh, 1871] :

$$p(\cos\theta) = \frac{3}{16\pi} (1 + \cos^2\theta) \quad (\text{II.14})$$

Il en résulte que $g = 0$, même si la diffusion est anisotrope, comme le montre le premier diagramme de rayonnement de la figure II.4 tracé à partir de l'expression II.14. Si la particule diffusante est de dimension proche de la longueur d'onde ou plus grande que celle-ci (régime de diffusion de Mie), la fonction de phase est complexe (présence de lobes secondaires), mais la diffusion vers l'avant domine, comme le montre le diagramme de rayonnement du bas de la figure II.4.

Dans les milieux biologiques, où nous rappelons que le régime de diffusion est un mélange des régimes de Rayleigh et de Mie, il est commode d'utiliser une fonction de phase approchée. Dans ce contexte, la fonction de phase de Henyey-Greenstein, initialement introduite en astrophysique pour décrire la diffusion par les nuages de poussière interstellaire, s'avère particulièrement bien adaptée aux milieux biologiques [Wang et al., 1995; Prahl, 1988], pour lesquels $0,75 < g < 0,99$ [Cheong et al., 1990; Tuchin]. Intégrée en azimut, cette fonction s'écrit [Henyey et Greenstein, 1941] :

$$p_{HG}(\cos\theta) = \frac{1}{2} \frac{1 - g^2}{[1 + g^2 - 2g\cos\theta]^{3/2}} \quad (\text{II.15})$$

L'intérêt de cette fonction est qu'elle ne dépend que d'un paramètre moyen, le facteur d'anisotropie. L'allure de cette fonction pour différentes valeurs de g est donnée à la figure II.5. Nous utiliserons cette distribution pour décrire la répartition angulaire de l'onde lumineuse ayant subi une diffusion dans toute la suite du manuscrit.

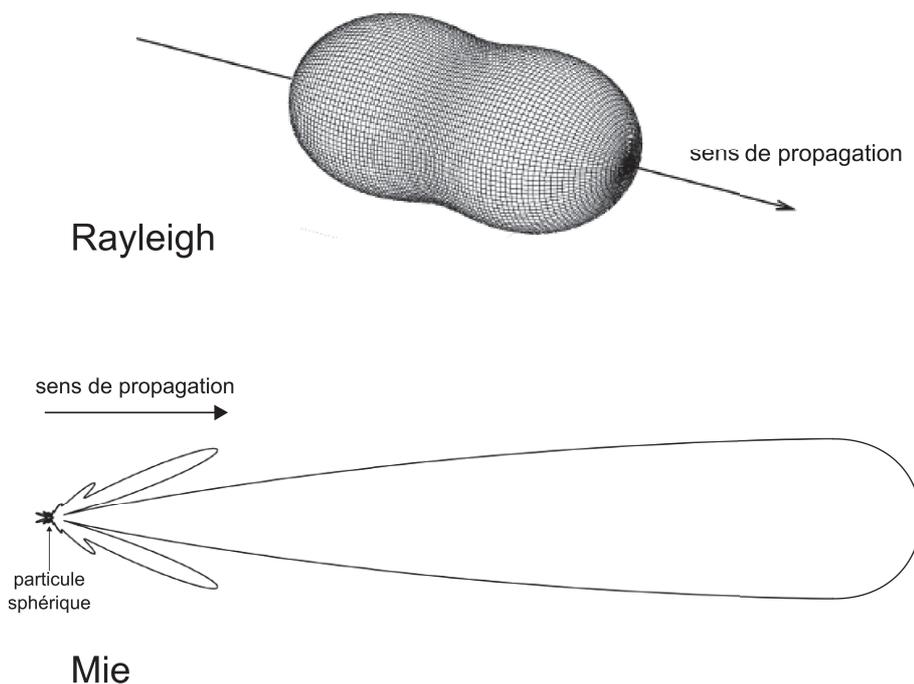


FIGURE II.4 – Fonctions de phase de Rayleigh pour une onde incidente non polarisée (en haut) pour une particule sphérique de rayon r à la longueur d’onde λ . En bas : fonction de phase de Mie dans le cas où $r/\lambda \simeq 1,60$ (figures extraites du cours en ligne : http://www.geo.mtu.edu/scarn/teaching/GE4250/scattering_lecture_slides.pdf).

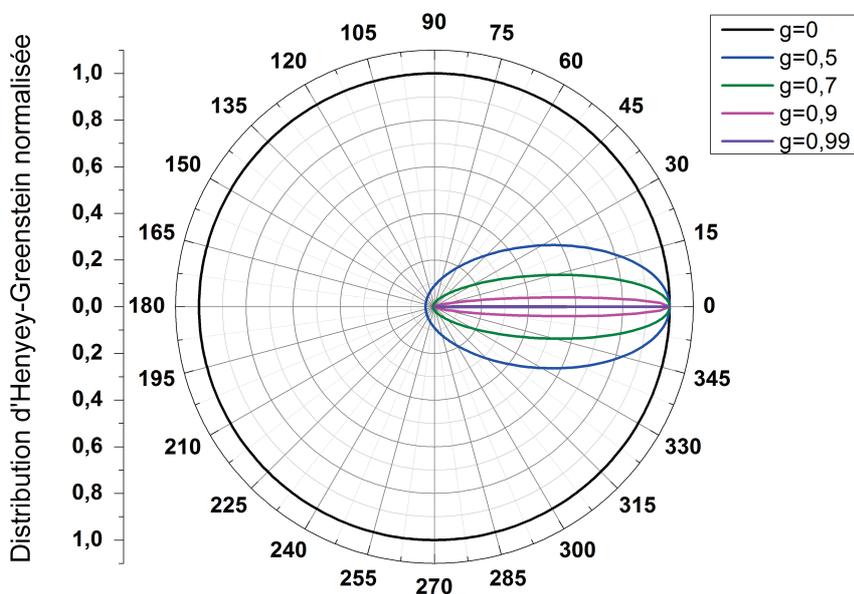


FIGURE II.5 – Distribution normalisée d’Henyey-Greenstein représentée en coordonnées polaires pour différentes valeurs de g .

II.3 Bases théoriques de la mesure des paramètres optiques des milieux diffusants

II.3.1 Théorie de la diffusion

La diffusion multiple dans les milieux turbides et épais du point de vue de la diffusion, tels les milieux biologiques, et la décohérence qui en résulte éliminent les effets d'interférence caractéristiques de la nature ondulatoire de la lumière. Il est ainsi possible de ne s'intéresser qu'au transport de l'énergie lumineuse dans le milieu plutôt que de décrire la propagation des champs.

Dans ce cas, les processus de diffusion peuvent être décrits par la théorie du transfert radiatif (TTR). Cette théorie repose sur la propagation de proche en proche de l'énergie lumineuse, ce qui permet de prendre en compte les variations locales d'indices de réfraction, plus difficiles à appréhender par les équations de Maxwell. La TTR admet que la luminance $L(t, \mathbf{r}, \mathbf{s})$, grandeur photométrique décrivant la puissance lumineuse par unité de surface et par unité d'angle solide, au point $\mathbf{r}(x, y, z)$ et dans la direction de vecteur unité $\mathbf{s}(\theta, \Psi)$ peut, au temps t :

- diminuer à cause des phénomènes d'absorption et de diffusion, mais aussi de la divergence intrinsèque de la luminance.
- augmenter grâce à la diffusion, dans la direction \mathbf{s} , de la luminance initialement dirigée en \mathbf{s}' .

Ceci aboutit à l'équation de transfert radiatif (ETR) [Wang et Wu, 2007] :

$$\frac{1}{c} \frac{\partial L(t, \mathbf{r}, \mathbf{s})}{\partial t} = -\mathbf{s} \cdot \nabla L(t, \mathbf{r}, \mathbf{s}) - \mu_t L(t, \mathbf{r}, \mathbf{s}) + \mu_s \int L(t, \mathbf{r}, \mathbf{s}') \cdot p(\mathbf{s} \cdot \mathbf{s}') d\Omega' + S(t, \mathbf{r}, \mathbf{s}) \quad (\text{II.16})$$

où :

1. $\frac{1}{c} \frac{\partial L(t, \mathbf{r}, \mathbf{s})}{\partial t}$ représente la variation temporelle du flux d'énergie lumineuse.
2. $-\mathbf{s} \cdot \nabla L(t, \mathbf{r}, \mathbf{s})$ est le terme relatif à la divergence de la luminance. Le signe négatif rend compte d'une perte d'énergie.
3. $-\mu_t L(t, \mathbf{r}, \mathbf{s})$ est le terme d'extinction de la luminance, associé aux pertes par absorption et par diffusion.

4. $\mu_s \int L(t, \mathbf{r}, \mathbf{s}') \cdot p(\mathbf{s} \cdot \mathbf{s}') d\Omega'$ est le terme relatif au gain de flux lors de la redirection de \mathbf{s}' à \mathbf{s} d'une partie du flux lumineux.

5. $S(t, \mathbf{r}, \mathbf{s})$ est le terme source.

μ_t est le coefficient d'atténuation total du milieu de propagation, $d\Omega'$ l'élément d'angle solide porté par la direction \mathbf{s}' et $p(\mathbf{s} \cdot \mathbf{s}')$ la fonction de phase de diffusion.

L'équation II.16 possède 6 variables indépendantes ; elle n'admet pas de solution analytique dans le cas général. Dans l'approximation de la diffusion, qui suppose un milieu à fort albédo ($W = \mu_s/(\mu_s + \mu_a)$ est proche de 1), c'est-à-dire un milieu dans lequel la lumière diffuse beaucoup avant d'être absorbée de sorte que la luminance puisse être considérée comme quasi-isotrope, l'ETR peut s'exprimer en fonction du flux $\phi(\mathbf{r}, t)$ (luminance intégrée sur 4π sr) et non plus de la luminance :

$$\frac{\partial \phi(\mathbf{r}, t)}{c \partial t} + \mu_a \phi(\mathbf{r}, t) - D \nabla^2 \phi(\mathbf{r}, t) = S(\mathbf{r}, t) \quad (\text{II.17})$$

Cette hypothèse de quasi-isotropie de la luminance implique de remplacer le coefficient de diffusion réel μ_s par le coefficient réduit $\mu'_s = \mu_s(1 - g)$, et de supposer des sources de lumière isotropes (S ne dépend plus de \mathbf{s}). Dans ces conditions, une nouvelle constante de diffusion $D = [3(\mu'_s + \mu_a)]^{-1}$ apparaît et des solutions analytiques de l'équation de la diffusion sont obtenues loin des sources et des interfaces (milieu infini en théorie). Il est possible d'utiliser ces solutions dans le cas d'un milieu semi-infini, cas très important en optique biomédicale puisqu'il décrit bien la diffusion dans un milieu biologique optiquement épais, à condition de respecter les conditions aux limites à l'interface milieu semi-diffusant/milieu non diffusant. Ces solutions sont à la base de méthodes de mesure des paramètres optiques (μ'_s et μ_a) des milieux turbides optiquement épais.

Une belle démonstration de la pertinence de la théorie de la diffusion dans le contexte de l'optique biomédicale est sa capacité à rendre compte du phénomène de réflexion diffuse (rétrodiffusion) par un milieu épais à fort albédo éclairé par un pinceau lumineux fin, à condition de rester loin du point d'impact de ce faisceau sur le milieu [Wang et Wu, 2007]. Néanmoins cette méthode basée sur la théorie de la diffusion fournit seulement μ'_s et μ_a , et ne peut en aucun cas mesurer μ_s et g indépendamment l'un de l'autre. Pour ce faire, il est nécessaire de recourir à d'autres méthodes qui permettent d'accéder soit à la somme $\mu_a + \mu_s$, soit au facteur d'anisotropie g .

II.3.2 Mesure des paramètres optiques des milieux diffusants

Il existe de nombreuses méthodes permettant de remonter aux paramètres optiques μ_a , μ_s et g . On peut classer ces méthodes en deux catégories [Cheong et al., 1990; Wang et Wu, 2007] : celles qui se basent sur une mesure directe de ces paramètres (méthodes directes), et celles qui nécessitent des modèles inverses pour les obtenir (mesures indirectes).

Méthodes directes

Les méthodes directes sont basées soit sur la mesure de la lumière non diffusée (mesure de la transmission collimatée), permettant d'obtenir le coefficient d'extinction total $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ à partir de la loi de Beer-Lambert, soit sur la mesure de la lumière diffusée en utilisant une sphère intégrante, et fournissant μ_a ou μ_s seul, soit sur la mesure goniométrique de la lumière diffusée une seule fois (milieu optiquement fin) pour obtenir le facteur d'anisotropie g à travers la détermination de la fonction de phase de diffusion $p(\theta)$ [Yoon, 1988; Hlavac, 2013]. Ces différentes méthodes sont résumées par les schémas de la figure II.6.

La mesure du coefficient effectif $\mu_{eff} = (3\mu_a(\mu_a + \mu'_s))^{1/2}$ est classée par [Cheong et al., 1990; Wang et Wu, 2007] parmi les mesures directes car il dépend directement des trois paramètres μ_a , μ_s et g . Ce coefficient est souvent déterminé au sein même des milieux diffusants par détection du flux lumineux *in situ* [Chin et al., 2007].

Méthodes indirectes

Les méthodes indirectes sont basées sur un modèle théorique plus évolué que les modèles utilisés pour les mesures directes. Elles se divisent en deux sous-catégories : les mesures indirectes non itératives et les mesures indirectes itératives.

Les méthodes indirectes non itératives mesurent les propriétés optiques des milieux diffusants par résolution du problème inverse à partir de quantités physiques simples à mesurer (réflectance, transmittance). Le problème inverse est associé à des équations comme celles de Kubelka-Munk ou l'équation de la diffusion.

La théorie de Kubelka-Munk décrit la propagation d'un faisceau diffus (par opposition à collimaté) à travers un milieu d'épaisseur infiniment fine en l'absence de réflexion aux interfaces. Sa forme de base (théorie de Kubelka-Munk à deux flux) est

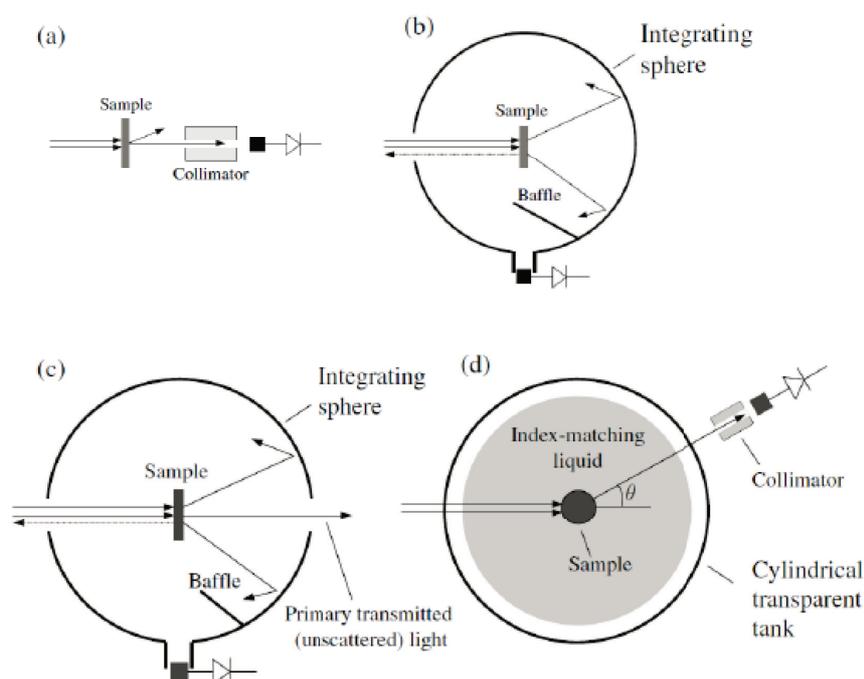


FIGURE II.6 – Méthodes directes appliquées à des échantillons fins. Ces montages expérimentaux permettent de mesurer (a) le coefficient d’atténuation total μ_t , (b) le coefficient d’absorption μ_a , (c) le coefficient de diffusion μ_s et (d) la fonction de phase $p(\theta)$. Cette figure est extraite de [Welch et Gemert, 2011]

équivalente à un processus de diffusion possédant une fonction de phase présentant deux pics, un vers l’avant et un vers l’arrière [Van de Hulst, 1980]. Ces équations relient de manière simple les paramètres de diffusion S_{KM} et d’absorption A_{KM} aux coefficients de réflectance diffuse et de transmission diffuse R_d et T_d mesurés. Il est cependant difficile de retrouver les paramètres μ_a , μ_s et g à partir de ceux de Kubelka-Munk. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées suivant la configuration de l’expérience. De plus, les hypothèses de la théorie de Kubelka-Munk, à savoir une diffusion isotrope et la conservation de l’indice de réfraction aux interfaces et l’utilisation d’une source diffuse sont peu représentatives de l’interaction d’un faisceau laser avec un milieu biologique.

Les méthodes indirectes itératives se basent sur des simulations numériques afin de déterminer de manière récursive le jeu de paramètres capable de décrire les mesures expérimentales de réflectance et de transmittance. Il peut s’agir de simulations de l’équation de la diffusion, de type Monte-Carlo ou encore d’adding-doubling.

Ce type de méthode permet de simuler de nombreuses configurations expérimen-

tales complexes. Il est ainsi possible de prendre en compte les différences d'indice de réfraction aux interfaces, ou encore de simuler des couches de propriétés optiques différentes au sein du matériau (principe de l'adding-doubling).

Les méthodes indirectes itératives ne peuvent cependant pas se suffire à elles-mêmes. De plus, de nombreuses sources d'erreurs existent selon que l'on prenne en compte, dans les simulations, les conditions de préparation des échantillons, la géométrie de l'éclairage, le modèle théorique utilisé pour résoudre le problème inverse etc. Ces méthodes sont donc à utiliser avec précaution lorsque l'on veut déterminer les paramètres de diffusion. La figure II.7 récapitule ces méthodes en indiquant les modèles utilisés, la géométrie des expériences et les paramètres pouvant être extraits. Cette figure montre qu'il est nécessaire de réaliser au moins deux expériences différentes (mesures de T_c ou de g et de $\{R_d; T_d\}$) pour remonter à μ_a , μ_s et g séparément, ce qui n'est pas une tâche facile. Dans la suite, nous présentons une nouvelle méthode, basée sur une expérience unique de microscopie à deux photons, qui permet dans un premier temps d'accéder au coefficient de diffusion μ_s indépendamment de μ_a , puis connaissant μ_s , de remonter à g .

II.4 Microscopie 2PEF adaptée à la mesure des paramètres optiques de diffusion

II.4.1 Mesure du coefficient de diffusion μ_s

L'efficacité de collection η du microscope de fluorescence à deux photons est définie par le rapport du nombre de photons de fluorescence N_{coll} collecté par le microscope au nombre de photons émis par la source de fluorescence supposée localisée dans le volume focal (PSF) de l'objectif. Les processus de collection et d'excitation de la fluorescence étant décorrélés [Leray et al., 2008], les signaux de fluorescence collectés par les voies confocale et NDS du microscope (décrites à la section I.4) peuvent s'écrire :

$$F_{conf}^{coll} = f_{exc} \times \eta_{conf} \quad (\text{II.18})$$

$$F_{NDS}^{coll} = f_{exc} \times \eta_{NDS} \quad (\text{II.19})$$

η_{conf} et η_{NDS} sont les efficacités de collection des voies de détection confocale et NDS, respectivement. f_{exc} est la fonction d'excitation, qui dépend des paramètres expérimentaux associés au processus d'excitation à deux photons introduits équation I.19.

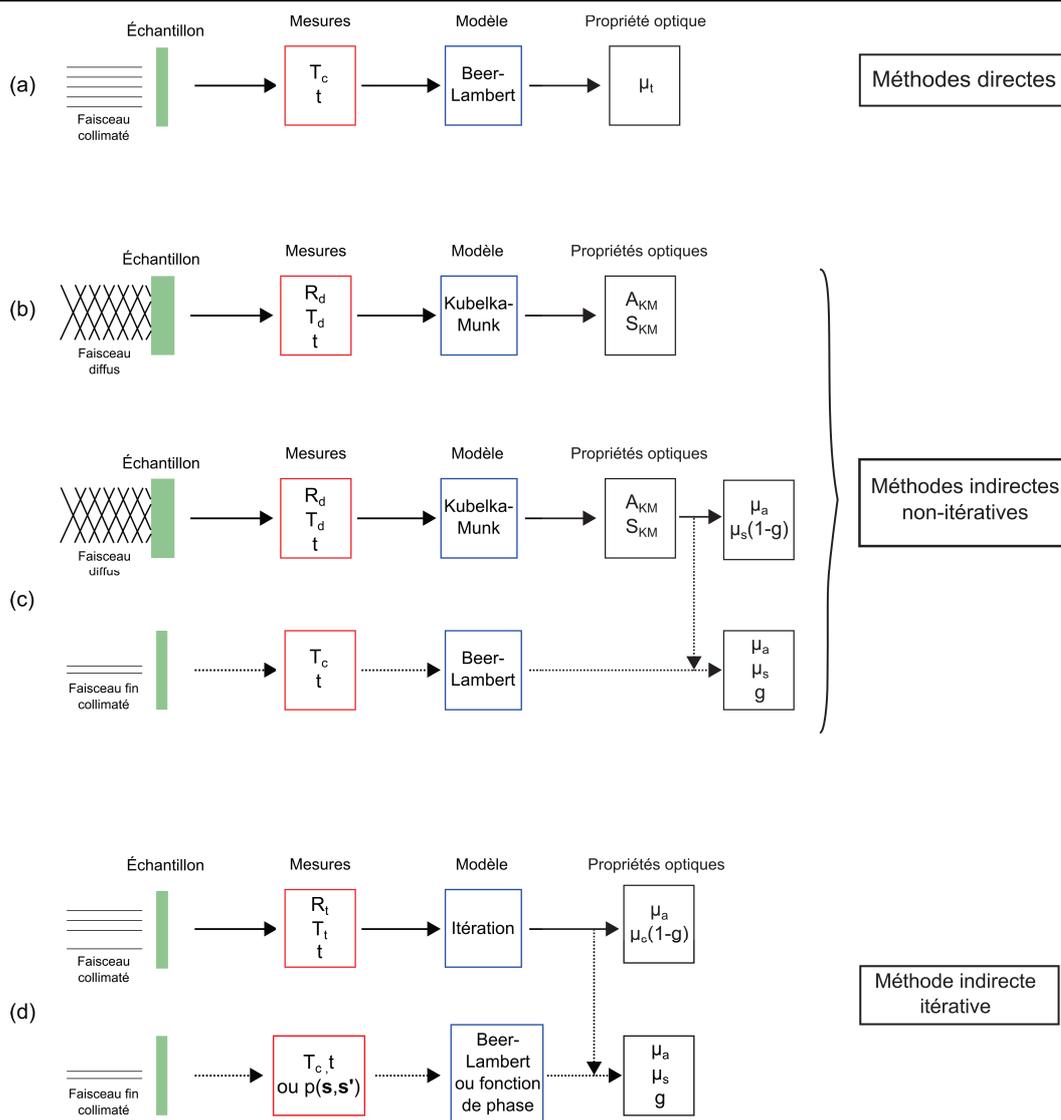


FIGURE II.7 – Récapitulatif des méthodes utilisées pour déterminer les paramètres optiques de diffusion. (a) Mesure du coefficient de transmission collimatée T_c à travers une coupe fine d'échantillon. La loi de Beer-Lambert suffit pour obtenir la valeur du coefficient d'atténuation total μ_t . (b) Mesures des coefficients de réflectance diffuse R_d et de transmission diffuse T_d d'un échantillon d'épaisseur t connue, pour déterminer les coefficients d'absorption et de diffusion A_{KM} et S_{KM} à partir des équations de Kubelka-Munk. (c) Les coefficients A_{KM} et S_{KM} peuvent être convertis en coefficient d'absorption et de diffusion si la configuration expérimentale le permet [Cheong et al., 1990; Wang et Wu, 2007]. Une mesure supplémentaire (coefficient de transmission collimatée T_c) permet de séparer μ_s et g . (d) Dans le cas des méthodes itératives, la mesure des coefficients de réflexion totale R_t et de transmission totale T_t d'un échantillon d'épaisseur t connue suffit pour remonter aux coefficients d'absorption et au coefficient de diffusion réduit. Une mesure supplémentaire du coefficient de transmission collimatée ou de la fonction de phase permet de séparer les trois paramètres μ_a , μ_s et g . Cette figure est modifiée à partir de [Cheong et al., 1990; Wang et Wu, 2007]

La voie confocale ne collectant que les photons balistiques, son efficacité de collection suit une loi de Beer-Lambert. Dans le cas d'un milieu purement diffusant, l'efficacité de collection, en mode confocal, peut s'écrire :

$$\eta_{conf} \propto e^{-\mu_s^{app} z_0} \quad , \quad (II.20)$$

où z_0 est la profondeur d'imagerie et μ_s^{app} le coefficient de diffusion apparent du milieu. Ce coefficient n'est pas le coefficient réel car les photons balistiques peuvent être collectés dans tout l'angle d'ouverture de l'objectif. Ces photons traversent donc en moyenne une épaisseur de milieu diffusant supérieure à la profondeur d'imagerie z_0 . On s'attend donc à ce que μ_s^{app} soit plus grand que μ_s réel (voir section II.5.3). La mesure du logarithme de η_{conf} en fonction de la profondeur d'imagerie z_0 doit donc permettre de remonter au coefficient μ_s^{app} à partir d'une simple régression linéaire.

La voie NDS possède quant à elle un champ de vue beaucoup plus important, ce qui lui permet de collecter à la fois les photons balistiques et les photons diffusés. En outre, comme l'a montré pour la première fois l'équipe de J. MERTZ [Beaurepaire et Mertz, 2002], cette efficacité de collection a la particularité de rester quasiment constante jusqu'à une profondeur d'imagerie égale au rayon du champ de vue de la voie de collection, rapporté au plan focal de l'objectif, dans les conditions où l'interface entre milieux diffusant et non diffusant est lisse (situation respectée dans nos expériences) et où le facteur d'anisotropie est grand ($g > 0,8$ typiquement). Par exemple, le rayon de champ de vue r_{FOV} de l'objectif 60X à immersion d'eau ($NA = 0,9$) décrit à la section I.4.3 est de $320 \mu\text{m}$, ce qui constitue la limite ultime que peut atteindre le champ de vue de la voie NDS, si les éléments optiques de collection se trouvant en aval de l'objectif ont une ouverture suffisante. Aux profondeurs d'imagerie relevant des hypothèses de la théorie de la diffusion ($z_0 > 1/\mu'_s$), les mêmes auteurs ont montré que l'efficacité de collection de la voie NDS décroît en $1/z_0^2$.

La fonction d'excitation du microscope est indépendante du mode de collection de la fluorescence. Comme on l'a vu précédemment, elle est dépendante à la fois des caractéristiques des impulsions laser excitatrices (puissance, durée, profil temporel, longueur d'onde, fréquence de répétition) et de la réponse des fluorophores (section efficace d'absorption à deux photons, rendement de fluorescence, concentration) mais pas de l'ouverture de l'objectif dans le processus à deux photons [Diaspro, 2002].

L'idée à la base de la méthode de mesure de μ_s développée au cours de cette thèse

est de s'affranchir de cette fonction d'excitation difficile à quantifier, en réalisant une mesure du rapport des intensités de fluorescence mesurées selon les voies confocale et NDS du microscope à deux photons. En effet, en posant ce rapport, il vient :

$$\frac{F_{conf}^{coll}}{F_{NDS}^{coll}} \propto \frac{\eta_{conf}}{\eta_{NDS}} \simeq e^{-\mu_s^{app} z_0} \quad (\text{II.21})$$

En présence d'absorption, l'efficacité de collection de la voie confocale diminue selon une loi de Beer-Lambert qui fait intervenir cette fois le coefficient d'extinction total μ_t :

$$\eta'_{conf} \propto e^{-\mu_t^{app} z_0} \quad (\text{II.22})$$

Quant à la voie NDS, si on considère que les photons collectés aux faibles profondeurs d'imagerie ($z_0 < r_{FOV}$) sont essentiellement des photons balistiques et peu diffusés (la diffusion a lieu vers l'avant dans les tissus biologiques), leur trajectoire et donc leur atténuation par absorption est proche de celle des photons purement balistiques. Dans ces conditions, on peut émettre l'hypothèse, qui sera vérifiée a posteriori, que l'efficacité de collection de la voie NDS est, aux faibles profondeurs d'imagerie, affectée par l'absorption de la même façon que la voie confocale et on peut donc écrire :

$$\eta'_{NDS} \propto e^{-\mu_a^{app} z_0} \quad (\text{II.23})$$

Finalement, la méthode consistant à mesurer le rapport des intensités de fluorescence collectées par les voies confocale et NDS d'un microscope à deux photons, doit permettre de s'affranchir en grande partie de l'absorption, dans l'hypothèse où c'est la diffusion qui domine.

II.4.2 Détermination du facteur d'anisotropie g

Nous avons décrit à la section I.4 la voie de collection descannée (DS) de notre microscope à 2 photons, obtenue en retirant le trou confocal de $300 \mu\text{m}$ de diamètre. L'ouverture ainsi obtenue est de $5200 \mu\text{m}$ de diamètre (ouverture #5). Le champ de vue associé à cette voie permet alors de collecter à la fois des photons balistiques et des photons diffusés.

L'intensité de fluorescence collectée en fonction de la profondeur d'imagerie z_0 a un comportement qui est alors intermédiaire entre celui de la voie confocale (décrois-

sance en $e^{-\mu_s^{app} z_0}$) et celui de la voie NDS (quasi-constance jusqu'à $z_0 = r_{FOV}$), qui doit dépendre de la valeur de g . On voit en effet que comme la voie DS possède un champ de vue réduit, la proportion de photons collectés par cette voie sera d'autant plus grand que g sera proche de 1. Nous verrons dans la suite que l'efficacité de collection de cette voie décroît aussi de façon remarquablement exponentielle avec la profondeur d'imagerie, mais que la constante caractéristique de cette décroissance dépend fortement de g , lorsque g est proche de 1.

Néanmoins le problème est difficile à modéliser théoriquement dès qu'il s'agit de photons peu diffusés, et nous devons recourir à la simulation Monte-Carlo pour obtenir des abaques qui nous permettront de remonter à la valeur de g . C'est donc clairement une méthode de mesure indirecte de ce paramètre de diffusion qui sera mise en œuvre, contrairement à la mesure directe de μ_s à partir d'une loi de type Beer-Lambert.

Notons cependant que ce n'est pas la première méthode de mesure indépendante du coefficient μ_s et du facteur d'anisotropie g d'un milieu turbide épais à l'aide d'une seule technique. Il a en effet été récemment démontré que la technique de microscopie de réflectance confocale à balayage permet d'y parvenir [Jacques et al., 2012]. En effet, l'intensité du signal rétrodiffusé collecté à travers un trou confocal décroît aussi de manière exponentielle avec la profondeur d'imagerie de la manière suivante :

$$R(z) \propto e^{-\mu z} \quad , \quad (\text{II.24})$$

où z est la profondeur d'imagerie corrigée de l'épaisseur de la lamelle couvre-objet et de la réfraction à l'interface du milieu imagé. μ est un coefficient d'extinction qui tient compte de l'excitation et de la collection (aller et retour de la lumière à la même longueur d'onde).

La détermination du coefficient de diffusion μ_s à partir du profil axial de cette intensité, qui fournit le coefficient d'extinction global μ , est cependant fortement dépendante du modèle utilisé. L'utilisation d'un objectif de collection de grande ouverture numérique nécessite en effet de prendre en considération les photons rétrodiffusés dont la trajectoire est inclinée par rapport à l'axe optique de l'objectif. Un facteur de correction géométrique prenant en compte les dépendances angulaires des sources lumineuses incidente (les photons excitateurs ne subissent pas la même atténuation par diffusion selon qu'ils sont sur l'axe ou en dehors de l'axe optique) et rétrodiffusée (contrairement à la fluorescence, la rétrodiffusion est un phénomène

très anisotrope et sa quantification est modèle-dépendant) doit être modélisé pour retrouver le coefficient de diffusion du milieu à partir de μ .

Une correction supplémentaire dépendant du facteur d'anisotropie g doit également être apportée, car en microscopie confocale les photons diffusés qui passent par le volume focal de l'objectif peuvent contribuer à l'excitation (effet linéaire). Cette fonction ne peut qu'être décrite de manière empirique par simulation Monte-Carlo afin de prendre en compte les photons provenant de la source qui aurait quand même atteint le foyer de l'objectif malgré de multiples diffusions. Enfin, l'absorption par le milieu est négligée par les auteurs bien que le coefficient μ en dépende. Notre méthode, qui permet de s'affranchir de l'absorption, de l'anisotropie de la diffusion et de la fonction d'excitation du microscope paraît dans ce contexte beaucoup plus robuste et simple à appliquer.

Dans la section suivante, nous vérifions par simulation Monte-Carlo les hypothèses à la base du principe de notre méthode de mesure de μ_s et g .

II.5 Simulations Monte-Carlo

II.5.1 Principe

La simulation Monte-Carlo est la méthode la plus rigoureuse pour décrire la propagation des photons en milieu diffusant, quelque soit le régime de diffusion. Il s'agit d'une méthode de calcul numérique qui, dans sa forme générale, décrit le résultat de phénomènes aléatoires à partir de l'état initial d'un système et d'un jeu d'équations et/ou de paramètres gouvernant les phénomènes étudiés. Ce type de simulation est applicable dans de nombreux domaines des sciences naturelles, mais également dans la finance ou les sciences sociales. Selon une traduction proposée par [Guilbert, 2010] de la définition de [Lux et Koblinger, 1991], *"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."*

L'un des éléments essentiels de la simulation Monte-Carlo est donc l'emploi d'un nombre aléatoire, généralement compris entre 0 et 1 et distribué uniformément. La

méthode Monte-Carlo étant avant tout un outil de simulation statistique, un seul tirage ne peut pas être suffisant pour obtenir un résultat recevable. L'algorithme que nous utilisons pour simuler les efficacités de collection des différentes voies du microscope est décrit à la figure II.8. Le programme utilisé dans ce travail est basé sur celui développé par S. Jacques [Jacques, 1998] pour décrire la diffusion de la lumière dans les milieux turbides. Il a été modifié pour obtenir le nombre de photons collectés par notre microscope à deux photons selon ses trois modes de collection (confocal, DS et NDS).

Plusieurs hypothèses ont été prises en compte pour réaliser ces simulations : le milieu diffusant est supposé homogène et semi-infini, et les phénomènes de phase et de polarisation sont ignorés [Ghosh et al., 2003]. Ces dernières hypothèses se justifient par la nature incohérente de la fluorescence émise depuis la tâche focale. Chaque photon est considéré comme un événement possédant une position, donnée par les coordonnées cartésiennes x, y, z , et une trajectoire donnée par les cosinus directeurs u_x, u_y, u_z .

Source d'émission

Plutôt que de considérer la source d'émission comme ponctuelle et isotrope, nous considérons que les photons de fluorescence sont émis de manière isotrope par le volume focal correspondant à la PSF d'illumination du microscope sous une excitation biphotonique, centré sur le point focal de l'objectif de microscope et considéré comme gaussien. Les coordonnées des photons issus de cette source sont échantillonnées de la façon suivante :

$$x_0 = w_{xy} \left(V_a \sqrt{\frac{-\log(S_a)}{(S_a)}} \right) \quad (\text{II.25})$$

$$y_0 = w_{xy} \left(V_b \sqrt{\frac{-\log(S_b)}{(S_b)}} \right) \quad (\text{II.26})$$

$$z_0 = w_z \left(V_c \sqrt{\frac{-\log(S_c)}{(S_c)}} \right) \quad , \quad (\text{II.27})$$

où w_{xy} et w_z sont les demi-largeurs à mi-hauteur telles que définies par les équations I.26, I.27 et I.28. V_α est un nombre aléatoire distribué uniformément dans l'intervalle $[-1;1]$ et S_α est un nombre aléatoire qui suit une distribution normale dans $[0;1]$ ($\alpha=a,b$ ou c). Cette dernière distribution est obtenue en suivant la méthode polaire de Marsaglia [Marsaglia et Bray, 1964]. La méthode est basée sur la

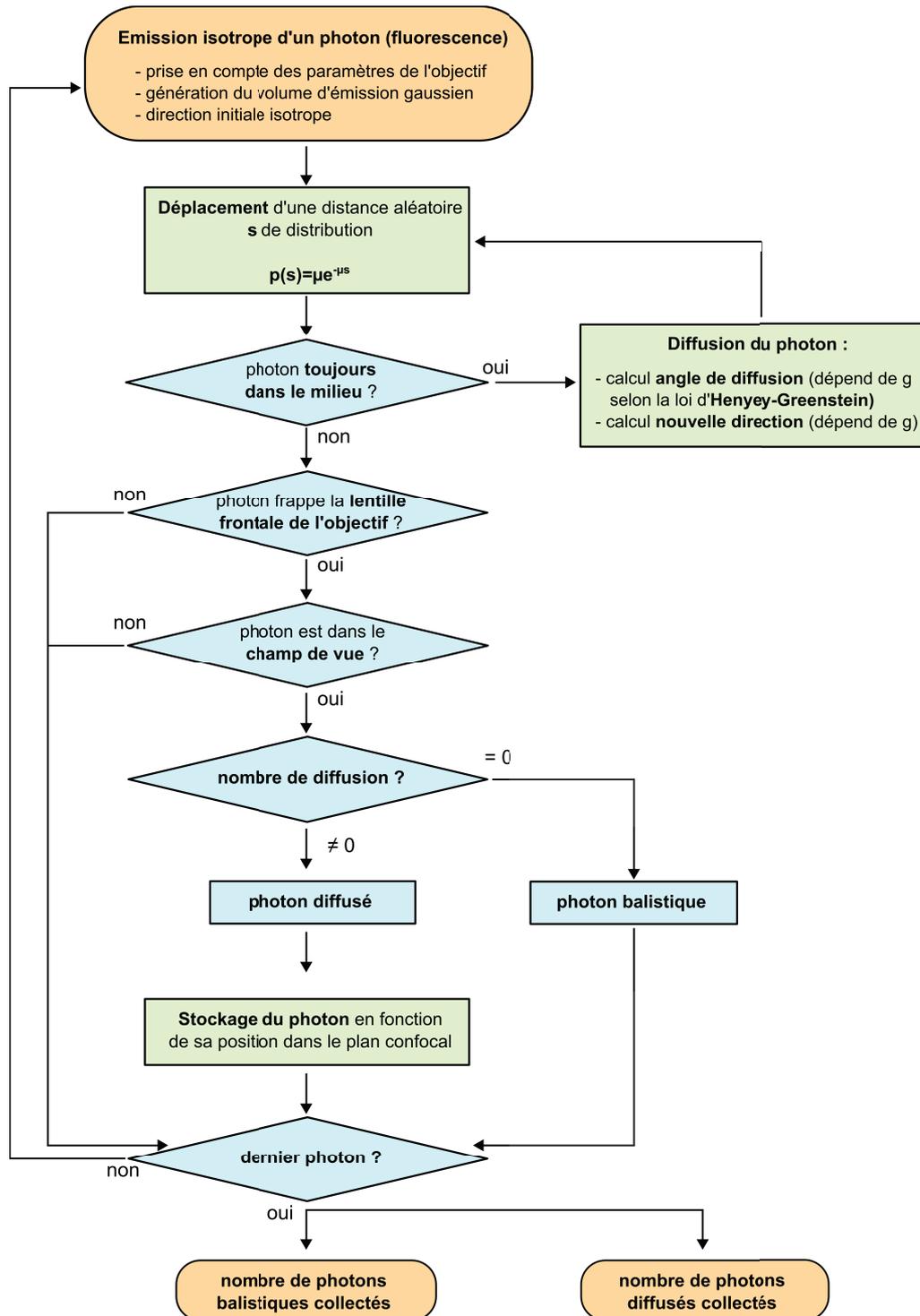


FIGURE II.8 – Algorithme informatique de la simulation de type Monte-Carlo. Le pas entre chaque diffusion ainsi que l'angle formé par la trajectoire du photon avant et après la diffusion sont échantillonnés à l'aide d'un nombre aléatoire et connaissant leurs densités de probabilités respectives.

génération de deux nombres aléatoires U et V uniformément distribués entre -1 et 1 et dont la somme des carrés n'excède pas 1 : $S = U^2 + V^2 < 1$. La paire (U, V) est donc incluse dans un disque de rayon 1 centré en 0, origine du repère. Une paire de variables aléatoires distribuées de manière normale X_1 et X_2 est créée par les opérations :

$$X_1 = U \sqrt{\frac{-\log(S)}{(S)}} \quad (\text{II.28})$$

$$X_2 = V \sqrt{\frac{-\log(S)}{(S)}} \quad (\text{II.29})$$

Le programme alterne ensuite entre ces deux variables, ce qui empêche la redondance entre chaque exécution de la simulation. En effet, les fonctions de base génératrices de nombres aléatoires implémentées dans certains compilateurs C/C++ du type Visual C++ (Microsoft Corp.) ne sont que des fonctions générant des nombres pseudo-aléatoires, c'est-à-dire que la séquence de nombre aléatoire généré est la même entre les différentes exécutions d'un programme.

Propagation et condition d'arrêt

La propagation des photons est simulée par tracé de rayons selon les lois de l'optique géométrique. Les paramètres géométriques associés au processus de diffusion sont ceux du schéma de la figure II.3. Le pas s entre chaque diffusion et l'angle de déflexion du rayon sont échantillonnés suivant les densités de probabilité issues respectivement de la loi de Beer-Lambert et de la fonction de phase d'Henyeey-Greenstein [Henyey et Greenstein, 1941]. Par exemple, la probabilité qu'un photon ne soit pas diffusé sur la distance s est donnée par :

$$p(s) = \mu_t e^{-\mu_t s} \quad (\text{II.30})$$

Le principe de l'échantillonnage est le suivant : on génère un nombre aléatoire ξ prenant uniformément des valeurs entre 0 et 1, puis l'on définit la variable d'échantillonnage s telle que la loi de conservation de la probabilité $\int_0^s p(s) ds = \xi$ soit respectée. On obtient alors :

$$s = \frac{-\ln(\xi)}{\mu_t} \quad (\text{II.31})$$

De même, en partant de la fonction de phase de Henyeey-Greenstein (équation

tion II.15), on obtient la loi d'échantillonnage de $\cos\theta$:

$$\cos\theta = \begin{cases} \frac{1+g^2}{2g} - \frac{1}{2g} \left(\frac{1-g^2}{1-g+2g\xi} \right)^2 & \text{si } g \neq 0 \\ 2\xi - 1 & \text{si } g = 0 \end{cases} \quad (\text{II.32})$$

L'angle azimutal ψ est considéré comme uniformément distribué dans l'intervalle $[0, 2\pi]$, et son échantillonnage est donc simplement donné par $\psi = 2\pi\xi$.

La direction du photon émis depuis le volume focal est définie par les cosinus directeurs u_x , u_y et u_z tels que :

$$u_x = \sin\theta \cos\psi \quad (\text{II.33})$$

$$u_y = \sin\theta \sin\psi \quad (\text{II.34})$$

$$u_z = \cos\theta \quad (\text{II.35})$$

La propagation de ce photon au sein du milieu est ensuite régie par les lois de probabilités définies précédemment. Ainsi, lorsque le processus de diffusion a lieu au bout du pas aléatoire s , il faut redéfinir les coordonnées de ce photon et lui attribuer une nouvelle trajectoire. Les nouvelles directions (u'_x, u'_y, u'_z) , qui remplacent les précédentes dans le programme, sont définies par :

$$u'_x = \frac{\sin\theta u_x u_y \cos\psi - u_y \sin\Psi}{\sqrt{1-u_z^2}} + u_x \cos\theta \quad (\text{II.36})$$

$$u'_y = \frac{\sin\theta u_y u_z \cos\psi + u_x \sin\Psi}{\sqrt{1-u_z^2}} + u_y \cos\theta \quad (\text{II.37})$$

$$u'_z = -\sqrt{1-u_z^2} \sin\theta \cos\psi + u_z \cos\theta \quad (\text{II.38})$$

et les anciennes coordonnées (x, y, z) sont remplacées par les nouvelles coordonnées :

$$x' = x + u'_x s \quad (\text{II.39})$$

$$y' = y + u'_y s \quad (\text{II.40})$$

$$z' = z + u'_z s \quad (\text{II.41})$$

Ce jeu de coordonnées et de directions est utilisé pour propager le photon jusqu'à ce qu'une des conditions d'arrêt soit remplie. Notons que le milieu est considéré comme homogène et l'interface comme lisse. De plus, nous supposons l'égalité d'indice entre le milieu diffusant et le milieu d'immersion de l'objectif, si bien que les phénomènes de réfraction et de réflexion à l'interface sont négligés. La trajectoire

du photon n'est donc pas modifiée à la traversée de l'interface. Les grandeurs propres à la collection sont données par la figure I.14. L'arrêt de la simulation de la propagation du photon ne s'effectue que si :

– **le photon est absorbé.**

Un photon est émis avec un poids initial égal à 1. Lorsque le coefficient d'absorption n'est pas nul, l'albédo du milieu W est différent de 1 ; plus l'absorption est importante, plus l'albédo est faible. Ainsi à chaque diffusion, le poids du photon est multiplié par l'albédo et diminue en conséquence. La simulation s'arrête lorsque le poids associé au photon passe en-dessous d'une certaine valeur seuil prédéfinie (0,01 dans notre cas).

– **le photon n'atteint pas la lentille frontale de l'objectif.**

Le photon sort du milieu à une position et sous un angle donnés. Si le photon ne parvient pas à la lentille frontale de l'objectif, alors il n'est pas détecté et est considéré comme perdu.

– **le photon atteint la lentille frontale de l'objectif, mais il sort du champ de vue du système de collection.**

Cette condition est évaluée en retraçant vers l'arrière la trajectoire du photon sortant et en déterminant la distance entre le point d'intersection de cette trajectoire et le plan focal de l'objectif avec l'axe optique. Évidemment, plus le champ de vue du système est grand, mieux on pourra collecter les photons diffusés loin de l'axe optique.

- Afin de limiter le temps de calcul lors de la simulation, le volume sondé par les photons est borné à environ 1cm^3 . Si un photon quitte ce volume, il est considéré comme perdu. Le choix de cette limite est fait empiriquement, en réduisant progressivement sa taille jusqu'à ce que l'erreur dans le résultat de la simulation sorte du bruit purement numérique (bruit de comptage poissonien).

Collection

Puisque nous considérons un volume focal d'émission limité par la diffraction, il est logique de considérer un volume de collection également limité par la diffraction, notamment en mode confocal. Nous avons donc assigné un poids à chaque photon collecté en fonction de sa distance par rapport à l'axe optique dans le plan focal image de l'objectif. Nous avons calculé ce poids en convoluant une fonction porte de

largeur égale au champ de vue du microscope (diamètre $2r_{FOV}$) dans le plan focal de l'objectif et une fonction gaussienne qui représente la réponse impulsionnelle du microscope à la longueur d'onde de collection de la fluorescence (PSF linéaire en collection). La figure II.9 montre un exemple de fonction de convolution pour les trous 1 et 4.

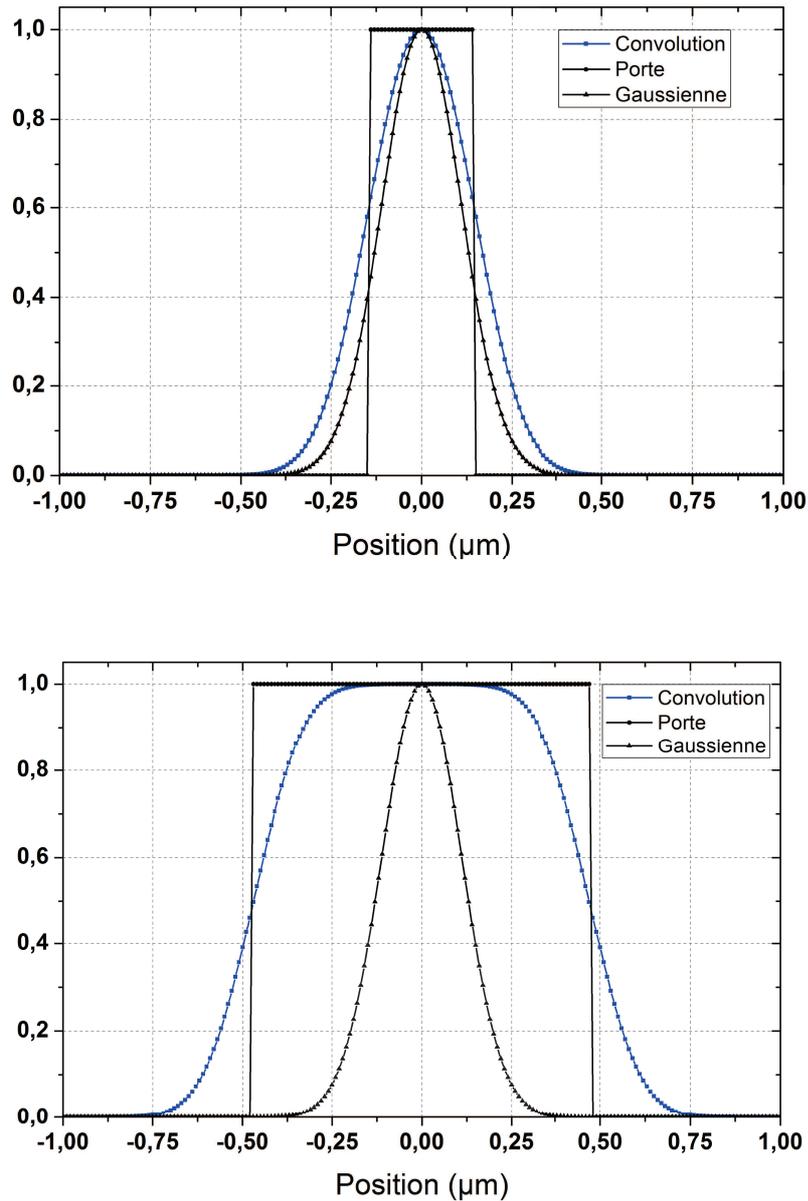


FIGURE II.9 – Représentations graphiques des fonctions porte, gaussienne et leur convolution suivant deux tailles de trou de sélection : en haut, le trou 1 (diamètre $60\ \mu\text{m}$), en bas le trou 4 (diamètre $200\ \mu\text{m}$). Les caractéristiques de la fonction gaussienne sont calculées par les relations I.26, I.27 et I.28.

Les diamètres des trous de sélection sont liés à leur champ de vue par la relation $r_{FOV} = \frac{\Phi_p}{2 \times 3,55 \times 60}$ pour l'objectif de grossissement 60X, soit $0,14 \mu\text{m}$ pour le trou #1 et $0,47 \mu\text{m}$ pour le trou #4 (cf. tableau I.2). Comme expliqué dans le chapitre I, le facteur 3,55 correspond au rapport entre les distances focales de la lentille de focalisation avant le trou confocal et la lentille de tube ($f_{tube} = 180 \text{ mm}$). Il est à noter que ces valeurs du champ de vue encadrent la résolution latérale de l'objectif de microscope 60X, $NA = 0,9$ à 830 nm ($w_{xy}^{2PEF} \simeq 0,21 \mu\text{m}$), ce qui est logique compte-tenu du fait que les diamètres des différents trous confocaux ont été calculés par le constructeur en fonction des PSF théoriques des différents objectifs de microscope dans le visible (mode confocal initial du microscope), les valeurs de la PSF² à 830 nm étant proches de celles de la PSF dans le visible (cf. table I.2 du chapitre I).

II.5.2 Simulations des efficacités de collection

Afin de valider le principe de mesure du coefficient de diffusion μ_s par la microscopie de fluorescence à deux photons que nous proposons (cf. section II.4), nous avons calculé le rapport des efficacités de collection des voies confocale et NDS à l'aide de la simulation Monte-Carlo.

Les simulations ont été réalisées en considérant un objectif de grossissement 60X à immersion d'eau ($n=1,33$) possédant un champ de vue de rayon $r_{FOV} = 320 \mu\text{m}$, une grande distance de travail (W.D. = 2 mm) et une ouverture numérique de 0,9. Ces paramètres sont ceux de l'objectif 60X utilisé dans les expériences correspondantes. Le coefficient de diffusion est fixé à 100 cm^{-1} , le coefficient d'absorption est soit nul, soit pris égal à 10 cm^{-1} . Cette dernière valeur correspond à 10% du coefficient de diffusion, ce qui représente, semble-t-il, une limite supérieure pour la plupart des tissus biologiques à la longueur d'onde de fluorescence considérée [Wang et Wu, 2007]. De même, les valeurs du facteur d'anisotropie considérées dans nos simulations sont 0,85 et 0,95, valeurs typiquement rencontrées dans les milieux biologiques pour le milieu du spectre visible.

Pour assurer des résultats fiables, en particulier pour des profondeurs z_0 supérieures au libre parcours moyen pour lesquelles l'efficacité de collection est très faible, notamment dans le mode confocal, 5×10^6 photons sont lancés successivement depuis la source pour chaque z_0 . Les simulations sont réalisées pour des profondeurs d'imagerie z_0 allant de 0 à $300 \mu\text{m}$ par pas de $25 \mu\text{m}$. Afin d'étudier l'effet du champ de vue du microscope à deux photons sur son efficacité de collection en mode confo-

cal, nous avons réalisé les simulations pour deux trous confocaux, le plus petit (#1, 60 μm de diamètre) et le plus grand (#4, 200 μm de diamètre), dont les valeurs des champs de vue r_{FOV} dans le plan focal image de l'objectif 60X sont, on l'a vu, respectivement 0,14 et 0,47 μm , alors que celui pour la voie NDS, on le rappelle, est de 320 μm . Nous rappelons également que l'efficacité de collection en milieu non diffusant et non absorbant est donnée par $\eta_{bal} = \eta_0 = \frac{1}{2}(1 - \cos\theta_{NA})$. La figure II.10 montre les rapports η/η_0 des voies de collection confocale et NDS en échelle semi-log.

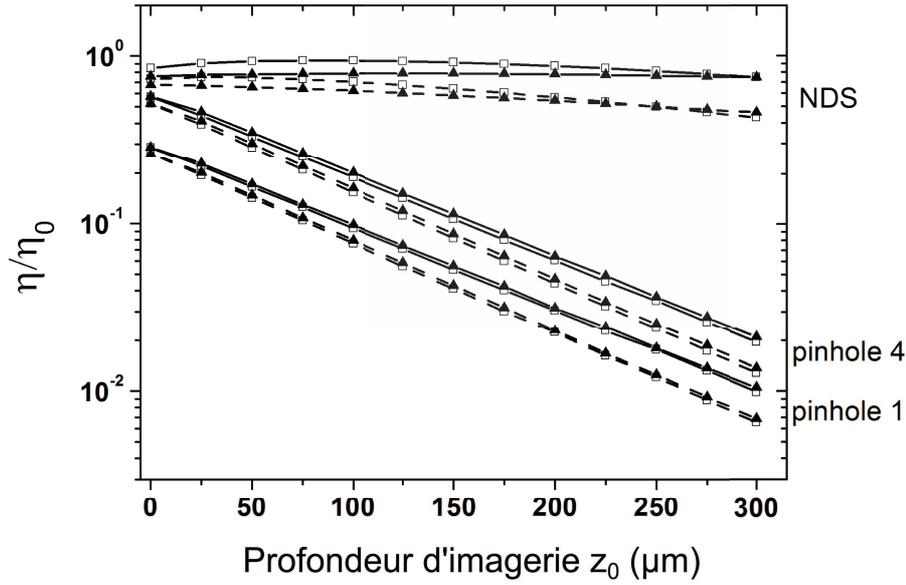


FIGURE II.10 – Simulations Monte-Carlo des efficacités de collection des voies confocale (trous #1 et #4) et non descannée, sans absorption (trait plein) et avec absorption (pointillés), pour $\mu_s = 100 \text{ cm}^{-1}$. Les carrés vides sont relatifs à $g = 0,85$, les triangles pleins à $g = 0,95$. L'échelle verticale est logarithmique.

La profondeur d'imagerie est volontairement limitée à 300 μm pour rester dans un domaine où l'efficacité de collection de la voie NDS est quasiment constante [Beau-repaire et Mertz, 2002]. Comme prévu dans la limite $z_0 < r_{FOV}$, la figure II.10 montre bien que l'efficacité de collection η_{NDS} est presque indépendante de la profondeur d'imagerie en l'absence d'absorption. Ce comportement est d'autant mieux vérifié que g est proche de 1. Pour $g = 0,85$, l'efficacité de collection de la voie NDS est légèrement supérieure à l'efficacité de collection en milieu non diffusant aux profondeurs inférieures à r_{FOV} (maximum pour $z_0 \sim 100 \mu\text{m}$). Ceci est la conséquence de la rétro-diffusion du milieu, d'autant plus marquée que g s'éloigne de 1 puisque dans ce cas les photons rétro-diffusent à une profondeur moyenne plus faible ($z_0 \sim [\mu_s(1 - g)]^{-1}$). La figure II.11 illustre ce phénomène.

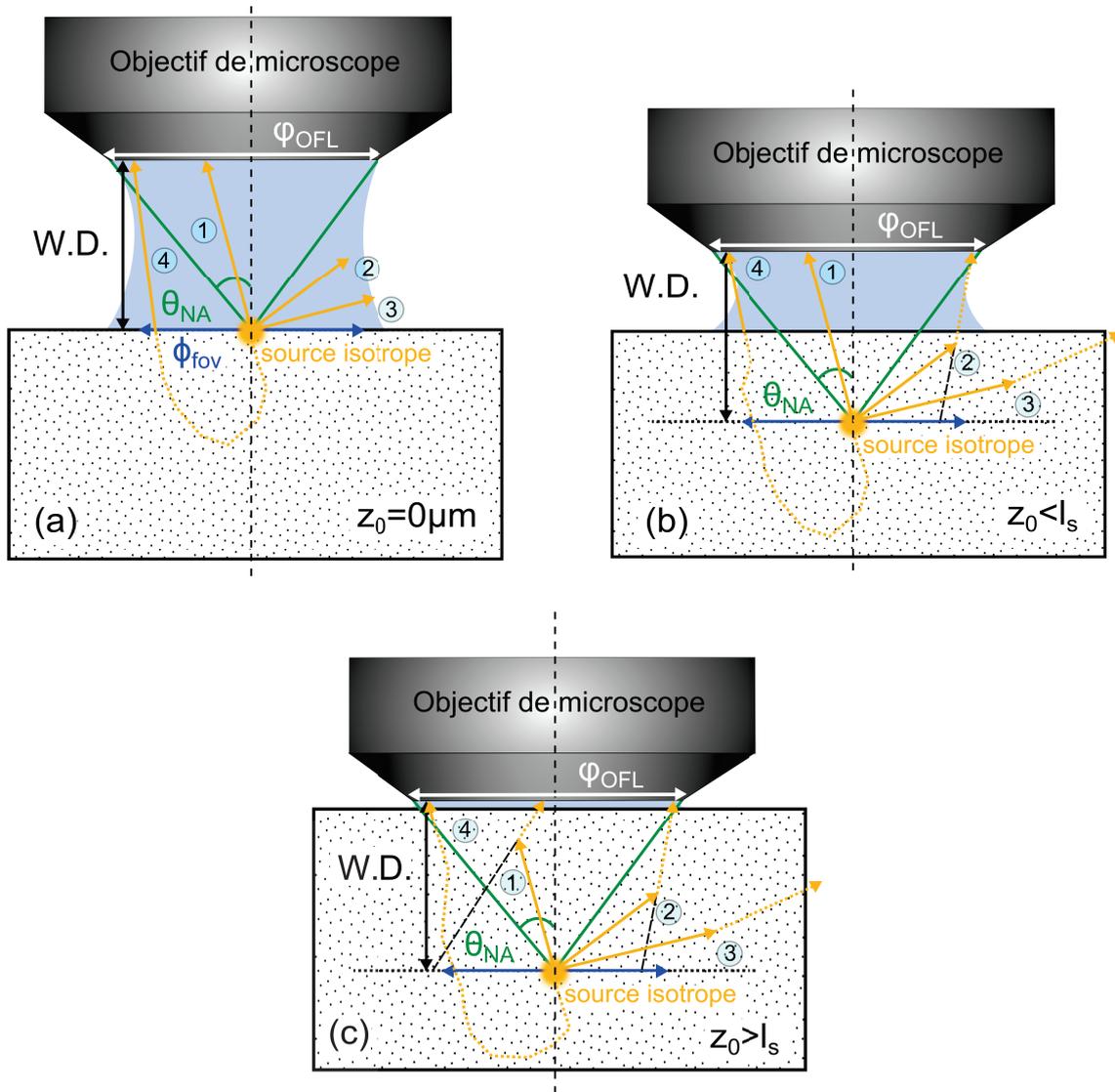


FIGURE II.11 – Propagation de 4 photons de trajectoires initiales différentes suivant la profondeur d'imagerie z_0 . r_{OFL} est le rayon de la lentille frontale de l'objectif (Optical Front Aperture), $W.D.$ sa distance de travail, r_{FOV} le champ de vue du système de collection et l_s le libre parcours moyen (inverse de μ_s). (a) : source à la surface ($z_0 = 0 \mu m$), (b) : source à moins d'une longueur de diffusion de la surface, (c) : source placée au-delà d'une longueur effective de diffusion $l'_s = [\mu_s(1 - g)]^{-1}$.

La figure II.11(a) montre le cas où la source isotrope est générée à la surface de l'échantillon diffusant. Le photon 1 est à la fois dans le cône d'ouverture numérique et dans le champ de vue du système; il est donc détecté. Le photon 4 également, même si celui-ci provient de la rétrodiffusion dans le milieu semi-infini. En revanche, les photons 2 et 3 sont en dehors de θ_{NA} ; ils n'atteindront donc pas l'objectif, et ne sont donc pas détectés.

La situation est différente lorsque la source de fluorescence est dans le milieu diffusant (cas (b)). En effet, le photon 1 a une faible probabilité d'être diffusé car la distance qu'il parcourt dans le milieu est inférieure à la longueur de diffusion. En revanche, les photons 2 et 3 traversent une distance plus grande dans le milieu diffusant et la probabilité qu'ils soient diffusés est donc plus grande que pour le photon 1. Si tel est le cas, il est possible que le photon 2, par exemple, soit dévié de telle sorte qu'il soit collecté. Ceci est d'autant plus vrai que la valeur de g est plus faible, ce qui augmente sensiblement le nombre de photons collectés lorsque la source s'enfonce dans le milieu diffusant.

Lorsque la source atteint une profondeur suffisamment importante ($z_0 > \mu_s (1-g)^{-1}$) (cas(c)), la limite diffusive est atteinte. Dans ce cas, les photons atteignant la surface d'échantillon ont été multidiffusés. Leur répartition spatiale à la surface de l'échantillon peut être décrite à partir des solutions de l'équation de la diffusion en respectant les conditions aux limites à l'interface (cf. chapitre I). Ces solutions montrent notamment que la largeur caractéristique de la tache de diffusion à la surface du milieu correspond à la profondeur d'imagerie, sa surface étant donc proportionnelle à z_0^2 . On comprend alors pourquoi l'efficacité de collection diminue comme $1/z_0^2$ dans cette limite diffusive.

L'efficacité de collection en mode confocal η_{conf} a quant à elle un comportement remarquablement exponentiel en fonction de la profondeur d'imagerie et ceci quelque soit le trou confocal considéré (cf. valeurs du coefficient de régression linéaire donné dans le tableau II.1). Ceci montre que dans cette modalité de collection, les photons balistiques sont essentiellement les seuls à être collectés. L'efficacité de collection absolue dépend alors du trou confocal choisi, qui admet plus ou moins de photons balistiques selon son diamètre, du fait de la diffraction, comme le montre bien la figure II.10.

Selon le tableau II.1, les coefficients de diffusion apparents varient de 111,6 à 113,1 cm^{-1} selon le trou confocal et la valeur de g considérés. Notons que ces valeurs sont sensiblement supérieures à la valeur μ_s du fait, comme nous l'avions prévu, de la collection des photons balistiques par un objectif de microscope (il faut dans ce cas considérer tous les chemins de propagation possibles entre z_0 et $z_0/\cos(\theta_{NA})$ lorsqu'on applique la loi d'atténuation de Beer-Lambert ; calcul présenté plus bas). En présence d'absorption, les pentes sont comme prévu plus fortes. Elles varient en effet de 122,6 et 124,2 cm^{-1} selon le trou confocal et la valeur de g considérés.

	$\mu_s = 100\text{cm}^{-1}, \mu_a = 0$		$\mu_s = 100\text{cm}^{-1}, \mu_a = 10\text{cm}^{-1}$	
	$g = 0,85$	$g = 0,95$	$g = 0,85$	$g = 0,95$
Trou confocal #1	112,4 (0,9999)	111,6 (0,9998)	123,3 (0,9999)	122,6 (0,9999)
Trou confocal #4	113,1 (0,9999)	112,0 (0,9997)	124,2 (0,9999)	122,9 (0,9998)
NDS	5,7 (0,524)	0,7 (0,153)	19,0 (0,934)	13,0 (0,984)

TABLE II.1 – *Pentes obtenues par régression linéaire sur les courbes présentées à la figure II.10 (en cm^{-1}). Le coefficient de régression linéaire R^2 est donné entre parenthèses (calculs réalisés sous OriginPro® 8.5.0 SR1 (OriginLab Corporation)).*

En ce qui concerne la voie de collection NDS, les pentes des caractéristiques $\ln(\eta/\eta_0) = f(z_0)$ sont très faibles, voire quasi-nulles en l'absence d'absorption et pour $g=0,95$, confirmant ce qui avait déjà été montré par d'autres auteurs [Beaurepaire et Mertz, 2002]. Néanmoins, le comportement est loin d'être linéaire puisque l'on a vu que le profil axial de l'efficacité de collection NDS présentait, à faible profondeur d'imagerie, un "rebond" lié à la rétro-diffusion. Les valeurs du coefficient de régression linéaire correspondantes sont donc logiquement basses (cf tableau II.1).

La figure II.12 présente les rapports des efficacités de collection confocale et NDS tirés des données de la figure II.10 pour les différentes valeurs de μ_a et de g et pour les deux trous confocaux. Il est important de rappeler que seul ce rapport est accessible à la mesure puisque l'intensité de fluorescence mesurée selon chacune des voies de collection du microscope à deux photons (confocale et NDS) dépend, outre l'efficacité de collection, de la fonction d'excitation du microscope. Le rapport η_{conf}/η_{NDS} considéré à présent sera donc assimilé au rapport des intensités de fluorescence mesurées selon les voies confocale et NDS de notre microscope, dans les mêmes conditions expérimentales.

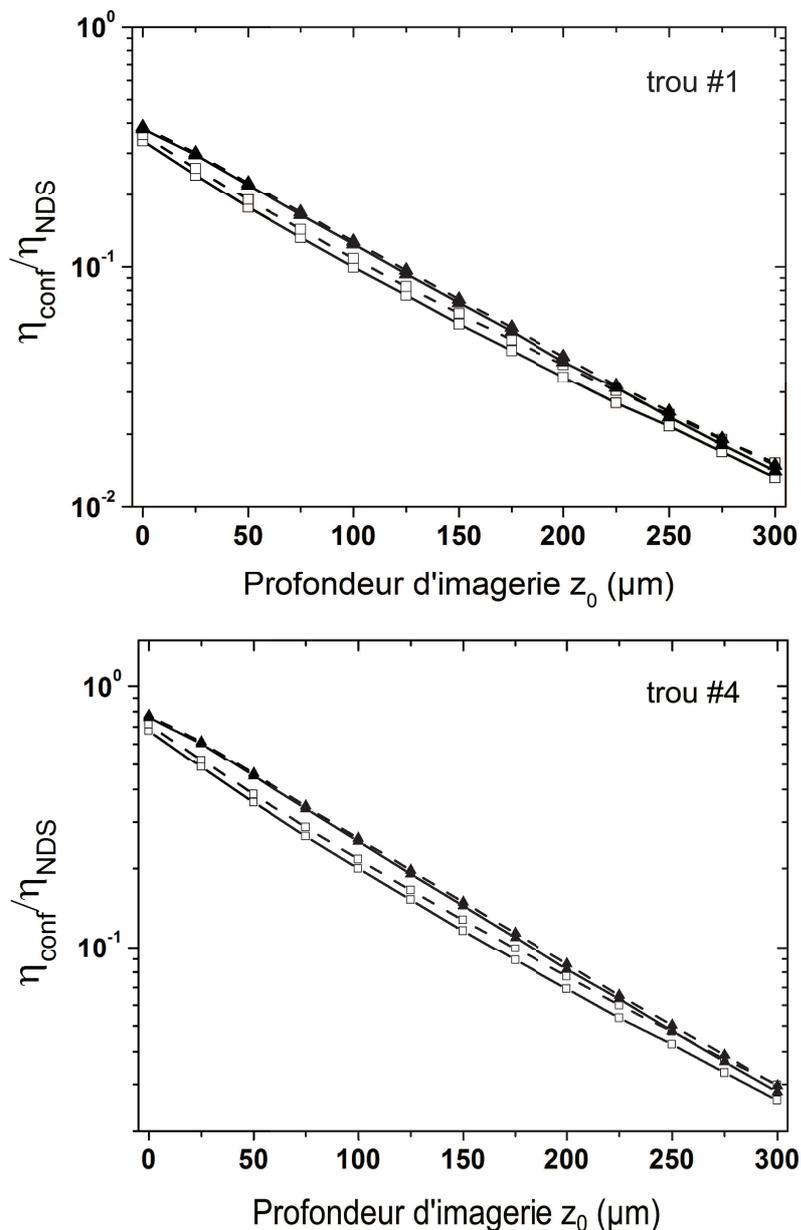


FIGURE II.12 – Simulations Monte-Carlo du rapport des efficacités de collection $\frac{\eta_{conf}}{\eta_{NDS}}$ pour le trou #1 et pour le trou #4 suivant la profondeur d'imagerie z_0 . Trait plein : sans absorption, pointillés : avec absorption; carrés vides : $g=0,85$, triangles pleins : $g=0,95$. L'échelle verticale est logarithmique.

Pour un diamètre de trou confocal donné, ce rapport apparaît clairement quasi-indépendant de la valeur de g (pour les fortes de valeurs de g considérées ici) et de la présence ou non d'absorption (dans la limite $\mu_a = \mu_s/10$ considérée ici). On retrouve le comportement quasi-exponentiel du mode de collection confocal avec la profondeur d'imagerie, mode qui sélectionne les photons balistiques. Finalement les pentes des caractéristiques $\ln(\eta_{conf}/\eta_{NDS}) = f(z_0)$ dépendent peu de la valeur de

g , de l'absorption et du diamètre du trou confocal, comme le montrent les données du tableau II.2.

	$\mu_s = 100cm^{-1}, \mu_a = 0$		$\mu_s = 100cm^{-1}, \mu_a = 10cm^{-1}$	
	$g = 0,85$	$g = 0,95$	$g = 0,85$	$g = 0,95$
$\mu_s^{app} (\#1)$	106,8 (0,99735)	110,9 (0,99979)	104,3 (0,99732)	109,8 (0,99977)
$\mu_s^{app} (\#4)$	107,5 (0,9977)	111,2 (0,9998)	105,2 (0,9978)	109,9 (0,9998)

TABLE II.2 – *Pentes obtenues par régression linéaire sur les rapports $\frac{\eta_{conf}}{\eta_{NDS}}$ présentés à la figure II.12, représentant le coefficient de diffusion apparent en cm^{-1} pour les trous #1 et #4. Le coefficient de régression linéaire R^2 est donné entre parenthèses.*

Ces pentes donnent des valeurs sur-estimées du coefficients de diffusion μ_s , qu'il convient de corriger à partir du modèle que nous présentons maintenant.

II.5.3 Correction du coefficient de diffusion apparent

Nous avons montré, à partir de simulations Monte-Carlo, que les pentes du logarithme de l'efficacité de collection en mode confocal (et par voie de conséquence, du rapport des efficacités de collection confocale/NDS) en fonction de la profondeur d'imagerie, fournissaient un coefficient de diffusion apparent qu'il convient de corriger de l'effet de la collection par un objectif de microscope très ouvert. Pour ce faire, il faut donc moyenner la loi d'atténuation de Beer-Lambert sur tous les chemins de propagation possibles entre z_0 et $z_0/\cos(\theta_{NA})$, c'est-à-dire sur l'angle solide limité par θ_{NA} (cf. figure II.13).

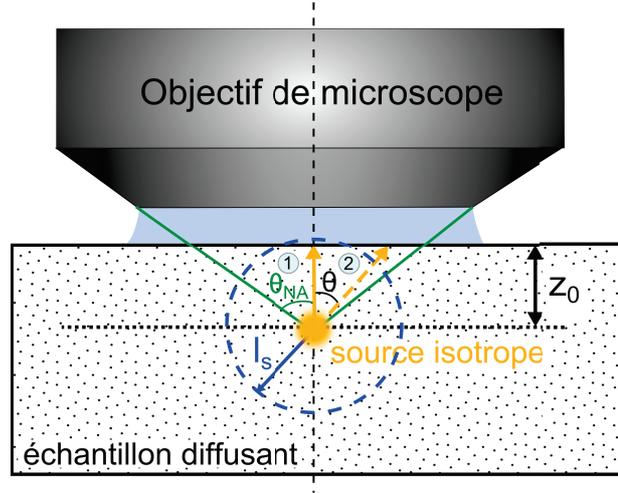


FIGURE II.13 – Schéma de la collection par des photons de fluorescence balistiques (mode de collection confocal) issu du volume focal de l'objectif de microscope en microscopie 2PEF. La trajectoire du photon 2 fait un angle θ avec l'axe optique de l'objectif. En pointillés bleus : cercle de rayon l_s .

L'efficacité de collection balistique correspondante peut alors s'écrire :

$$\eta_{bal}(z_0, \mu_s) = \frac{I(z_0, \mu_s)}{I_0} = \frac{1}{2} \int_1^{CA^{-1}} \frac{e^{-\mu_s z_0 u}}{u^2} du \quad , \quad (\text{II.42})$$

où $u = 1/\cos\theta$, θ étant l'angle entre la trajectoire du photon balistique et l'axe optique, et $CA = \cos\theta_{NA}$ avec θ_{NA} le demi-angle d'ouverture numérique. Pour rappel, l'ouverture numérique NA et l'angle θ_{NA} sont liés par la relation $NA = n\cos\theta_{NA}$. Notons que dans le cas où $\mu_s z_0$ tend vers zéro, l'efficacité de collection peut s'écrire, après intégration de II.42 :

$$\eta_0 = \frac{1}{2} (1 - \cos\theta_{NA}) \quad (\text{II.43})$$

C'est l'efficacité de collection soit en l'absence de diffusion (μ_s tend vers 0), soit lorsque la source de fluorescence est à la surface du milieu diffusant (z_0 tend vers 0).

L'équation II.42 n'est malheureusement pas intégrable analytiquement. Cependant, les simulations Monte-Carlo ont montré que l'efficacité de collection confocale variait comme $e^{-\mu_s^{app} z_0}$; il y avait donc de bonnes raisons de croire que l'expression II.42 pouvait, par un calcul approché (développement en série de l'exponentielle), se mettre sous la forme d'une loi exponentielle avec un coefficient apparent correspondant aux pentes calculées par simulation Monte-Carlo. Pour appuyer cette hypothèse, nous avons réalisé les intégrations numériques de la relation II.42 pour différentes valeurs de μ_s et l'objectif 60X à immersion d'eau ($NA = 0,9$, $n = 1,33$).

Les résultats sont présentés à la figure II.14.

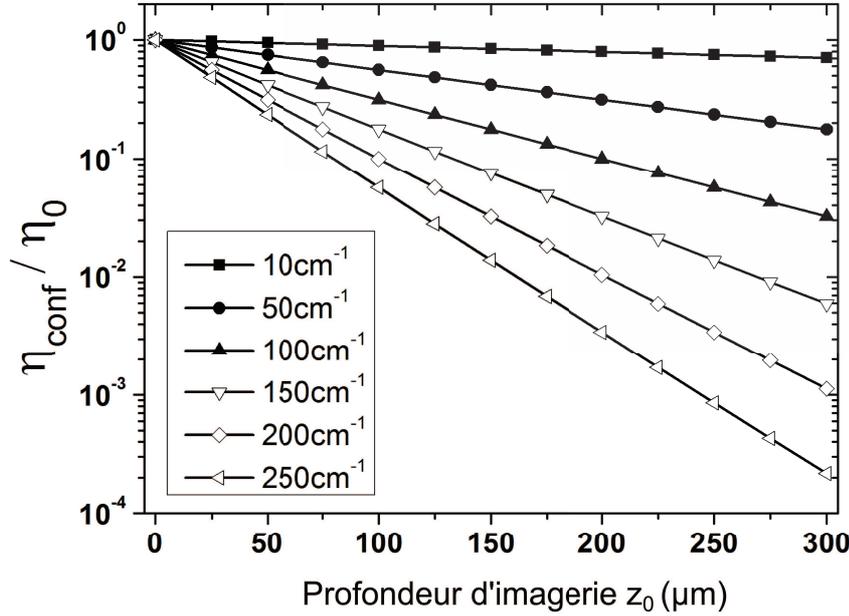


FIGURE II.14 – Efficacités de collection normalisées du signal de 2PEF balistique épicollecté en provenance d'un milieu turbide. La collection est effectuée par un objectif 60X à immersion d'eau ($NA=0,9$) et représentée suivant la profondeur d'imagerie z_0 pour différents coefficients de diffusion. Les points sont obtenus par intégration numérique de l'équation II.42 et les droites sont les régressions linéaires associées. L'échelle verticale est logarithmique.

Comme attendu, l'intégration numérique de II.42 conduit à trouver une relation quasi-linéaire entre le logarithme de l'efficacité de collection et la profondeur d'imagerie ($R^2 > 0,9999$). Les pentes de ces droites fournissent un coefficient de diffusion apparent μ_s^{app} , qui est une fonction du coefficient réel μ_s utilisé dans l'exponentielle de la formule II.42. La figure II.15 présente cette fonction pour des coefficients de diffusion variant de 10 à 250 cm^{-1} par pas de 10 cm^{-1} . Selon cette figure, et comme attendu, $\mu_s^{\text{app}} > \mu_s$ puisque tous les photons (balistiques ici) parcourent une distance supérieure ou égale à z_0 . À titre d'exemple, pour $\mu_s = 100 \text{ cm}^{-1}$ nous obtenons $\mu_s^{\text{app}} \simeq 114,5 \text{ cm}^{-1}$, en bon accord avec les résultats obtenus par simulation Monte-Carlo (cf. tableau II.1).

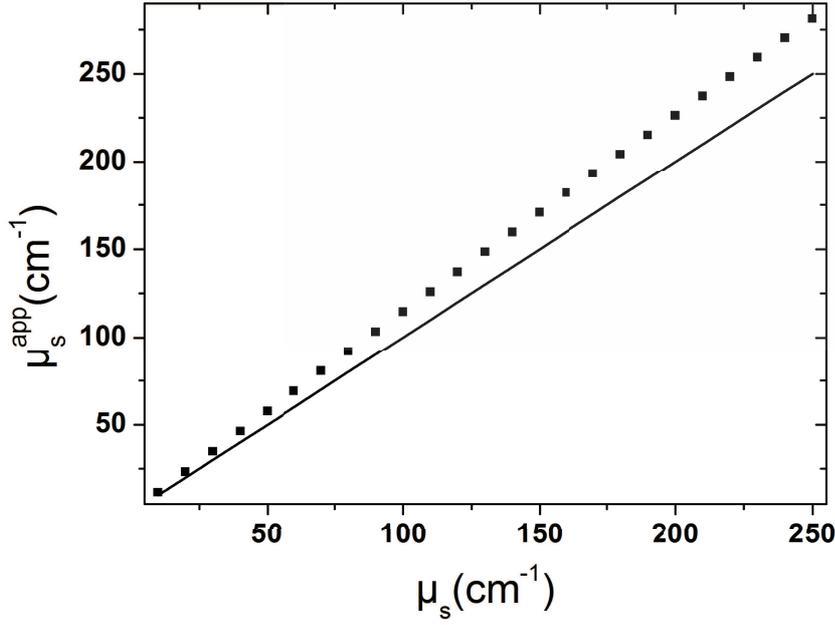


FIGURE II.15 – Coefficient de diffusion apparent μ_s^{app} obtenu par régression linéaire des courbes similaires à celles présentées à la figure II.14 suivant le coefficient de diffusion réel μ_s (ligne en trait plein : bissectrice servant de guide).

Dans l'annexe A, nous montrons, à partir d'un développement limité de l'exponentielle dans l'intégrale de l'expression II.42, qu'un coefficient de diffusion corrigé μ_s^{corr} (une approximation du coefficient de diffusion réel) peut s'exprimer de la façon suivante en fonction du coefficient apparent μ_s^{app} :

$$\mu_s^{corr} = A\mu_s^{app} \frac{2}{1 + \sqrt{1 - 2\mu_s^{app} z_{corr} B}} \quad (\text{II.44})$$

Les paramètres A et B sont définis par $A = \frac{CA - 1}{\ln(CA)}$ et $B = \left[\frac{A^2}{CA} - 1 \right]$. Avec l'objectif décrit précédemment, $A \simeq 0,8614$ et $B \simeq 7,836 \times 10^{-3}$. Le paramètre z_{corr} provient de l'opération de lissage. Dans le cas général où l'ordonnée à l'origine est considérée comme non nulle, z_{corr} prend la forme suivante :

$$z_{corr} = \frac{\langle z_0 \rangle^3 - \langle z_0 \rangle \langle z_0^2 \rangle}{\langle z_0^2 \rangle - \langle z_0 \rangle^2} = \frac{\sum_p z_{0p}^3 - \frac{1}{N} \sum_p z_{0p} \sum_p z_{0p}^2}{\sum_p z_{0p}^2 - \frac{1}{N} \left(\sum_p z_{0p} \right)^2} \quad (\text{II.45})$$

La somme porte sur l'échantillonnage en profondeur. Pour nos calculs, z_0 varie de 0 à 300 μm par pas de 25 μm , soit $N=13$ termes par somme, ce qui implique $z_{corr} \simeq 300 \mu\text{m}$. Avec les paramètres précédemment définis, nous retrouvons

$\mu_s^{corr} \simeq 100 \text{ cm}^{-1}$ à partir de $\mu_s^{app} \simeq 114,5 \text{ cm}^{-1}$. Remarquons que puisque $B \ll 1$, $\mu_s^{corr} \simeq A\mu_s^{app}$ pour des profondeurs d'imagerie inférieures à la longueur de diffusion $l_s = 1/\mu_s$. Sous ces conditions, la correction géométrique revient à moyenner les chemins optiques et plus la loi de Beer-Lambert sur ces chemins. La figure II.16 donne le coefficient de diffusion corrigé μ_s^{corr} (obtenu à partir de l'expression non simplifiée II.44) en fonction du coefficient de diffusion réel μ_s .

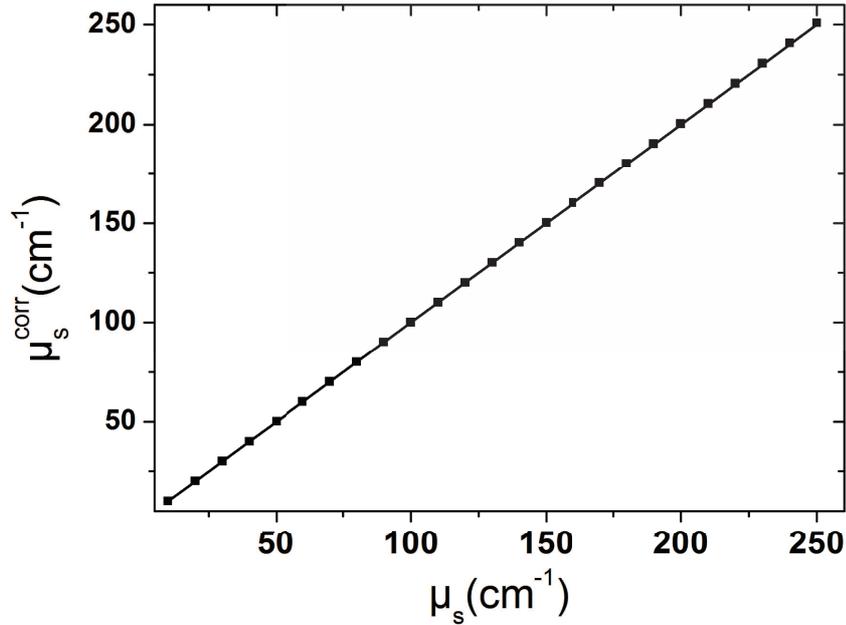
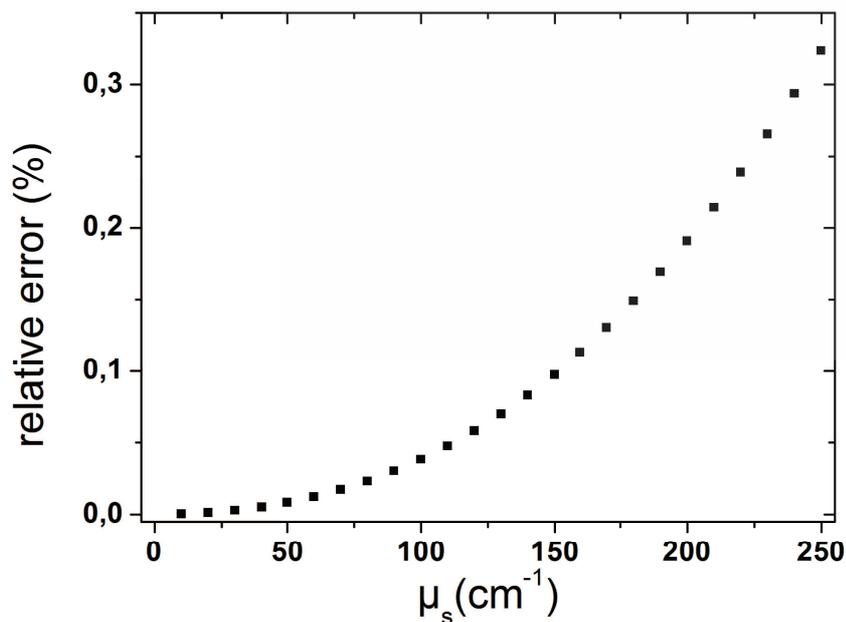


FIGURE II.16 – Coefficient de diffusion corrigé μ_s^{corr} obtenu par l'équation II.44 en fonction du coefficient de diffusion réel μ_s .

On observe une concordance quasiment parfaite entre les deux coefficients pour des valeurs allant jusqu'à 250 cm^{-1} . La figure II.17 présente l'écart relatif entre ces deux coefficients, sur le même intervalle de valeurs de μ_s .

Le tableau II.3 donne les coefficients de diffusion corrigés tirés des simulations Monte-Carlo du rapport des efficacités de collection confocale à NDS (seul rapport accessible par l'expérience). En toute rigueur, on devrait retrouver le coefficient de diffusion réel $\mu_s=100 \text{ cm}^{-1}$ utilisé comme paramètre dans les simulations; l'écart est ici imputable au fait que l'efficacité de collection de la voie NDS n'est pas tout à fait constante. Ceci constitue clairement la limite de notre méthode en termes de précision sur la valeur du coefficient de diffusion extrait.

FIGURE II.17 – Écart relatif entre μ_s^{corr} et μ_s .

	$\mu_a = 0$		$\mu_a = 10cm^{-1}$	
	$g = 0,85$	$g = 0,95$	$g = 0,85$	$g = 0,95$
μ_s^{corr} (#1)	93,2	96,8	91,0	95,8
μ_s^{corr} (#4)	93,8	97,1	91,8	95,9

TABLE II.3 – Coefficient de diffusion corrigé μ_s^{corr} extrait du coefficient de diffusion apparent μ_s^{app} . Ces derniers sont obtenus par simulation Monte-Carlo de la collection de la fluorescence excitée à deux photons à travers un milieu turbide de coefficient de diffusion $\mu_s = 100 cm^{-1}$.

Ainsi nous avons montré qu'il est possible de mesurer le coefficient de diffusion μ_s^{app} d'un milieu turbide à partir du rapport des intensités de fluorescence épicollectées par les voies confocale et NDS d'un microscope de fluorescence à deux photons. Une correction purement géométrique prenant en compte les différents chemins des photons dans l'angle solide de l'objectif, nous permet donc en principe de retrouver μ_s à 10% près, indépendamment de g , de μ_a et du diamètre du trou confocal utilisé.

II.5.4 Validité du protocole d'obtention du facteur d'anisotropie g

Lors de l'introduction de notre méthode de mesure des paramètres de diffusion par microscopie 2PEF (section II.4), nous avons expliqué que l'efficacité de collection de la voie DS (voie confocale dépourvue de diaphragme de diamètre limité par diffraction), devait dépendre de façon très sensible du facteur d'anisotropie g , pour des valeurs proches de 1 pour lesquelles les photons sont majoritairement diffusés vers l'avant.

Nous avons donc relancé nos simulations Monte-Carlo pour la voie DS (voie démunie de trou confocal, ouverture notée #5 dans la suite) de notre microscope. Les résultats, comparés à ceux de la voie confocale équipée du trou le plus grand (trou #4 qui permet d'obtenir le meilleur ratio signal à bruit dans les expériences qui suivent), sont présentés sur la figure II.18. Nous constatons de nouveau un comportement quasi-linéaire du logarithme de l'efficacité de collection, à condition que la source de fluorescence (profondeur d'imagerie z_0) soit suffisamment éloignée de la surface. Aux faibles profondeurs d'imagerie, en effet, les photons diffusés le sont majoritairement une seule fois, et comme g est proche de 1 dans nos simulations, ils sont presque tous collectés à travers l'ouverture #5, comme les photons balistiques.

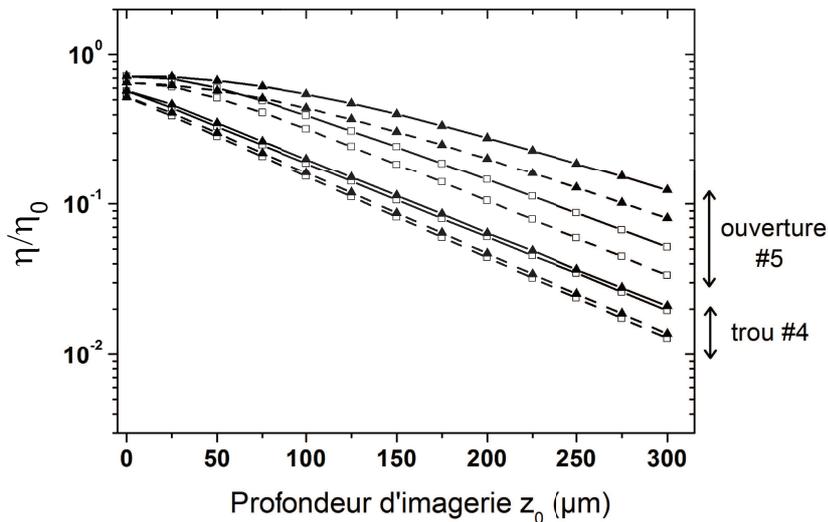


FIGURE II.18 – Simulations Monte-Carlo des efficacités de collection des voies confocale (trou #4) et descannée (ouverture #5), sans absorption (trait plein) et avec absorption (pointillés), pour $\mu_s = 100 \text{ cm}^{-1}$. Les carrés vides sont relatifs à $g = 0,85$, les triangles pleins à $g = 0,95$. L'échelle verticale est logarithmique.

Le champ de vue réduit de la voie de collection DS par rapport à celui de la voie de collection NDS explique cependant qu'à partir d'une certaine profondeur d'imagerie supérieure à r_{FOV} , l'efficacité de collection DS diminue, tandis que celle de la voie NDS reste quasiment constante.

Les pentes extraites de la partie linéaire des courbes de la figure II.18 sont données dans le tableau II.4, où les valeurs précédemment trouvées pour la voie confocale équipée du trou #4 sont également rappelées. On constate immédiatement que la pente associée à la voie DS dépourvue de trou confocal (ouverture #5), diminue beaucoup lorsque la valeur de g s'approche de 1, du fait de la collection supplémentaire des photons diffusés vers l'avant (photons serpentiles). Cela apparaît donc comme une méthode sensible pour remonter à la valeur de g en comparant les intensités de fluorescence mesurées en mode confocal et DS.

	$\mu_s = 100\text{cm}^{-1}, \mu_a = 0$		$\mu_s = 100\text{cm}^{-1}, \mu_a = 10\text{cm}^{-1}$	
	$g = 0,85$	$g = 0,95$	$g = 0,85$	$g = 0,95$
μ_s^{app}	113,1 (0,9999)	112,0 (0,9997)	124,2 (0,9999)	122,9 (0,9998)
$p(\#5)$	100,9 (0,9937)	72,4 (0,9996)	112,1 (0,9997)	83,4 (0,9955)

TABLE II.4 – Pentes obtenues par régression linéaire du logarithme des rapports η_{conf}/η_{NDS} et η_{DS}/η_{NDS} en fonction de la profondeur d'imagerie z_0 pour un milieu diffusant simulé présentant un coefficient de diffusion $\mu_s=100\text{ cm}^{-1}$ et deux valeurs de μ_a et g différentes. La collection s'effectue à travers le trou #4 (voie confocale) ou l'ouverture #5 (voie DS). Le coefficient de régression linéaire R^2 est donné entre parenthèses.

Nous avons représenté sur la figure II.19 les rapports des pentes $r_0 = p(\#5)/\mu_s^{app}$ en fonction de g pour différentes valeurs de μ_s . Les courbes sont extrêmement non linéaires. Pour $0 < g < 0,7$, le rapport des pentes est presque quasiment constant et proche de 1, ce qui signifie que la voie DS collecte essentiellement des photons balistiques, à la manière de la voie confocale. Au contraire, pour $0,8 < g < 1$, domaine d'intérêt pour l'étude des milieux biologiques, on observe une dépendance très forte du rapport des pentes en fonction de g . Donc si on détermine préalablement μ_s en mesurant le rapport des intensités de fluorescence collectées en mode confocal

et NDS, on pourra en principe déterminer g par une mesure supplémentaire des intensités de fluorescence collectée en mode DS et en utilisant un abaque du type de celui donné sur la figure II.19.

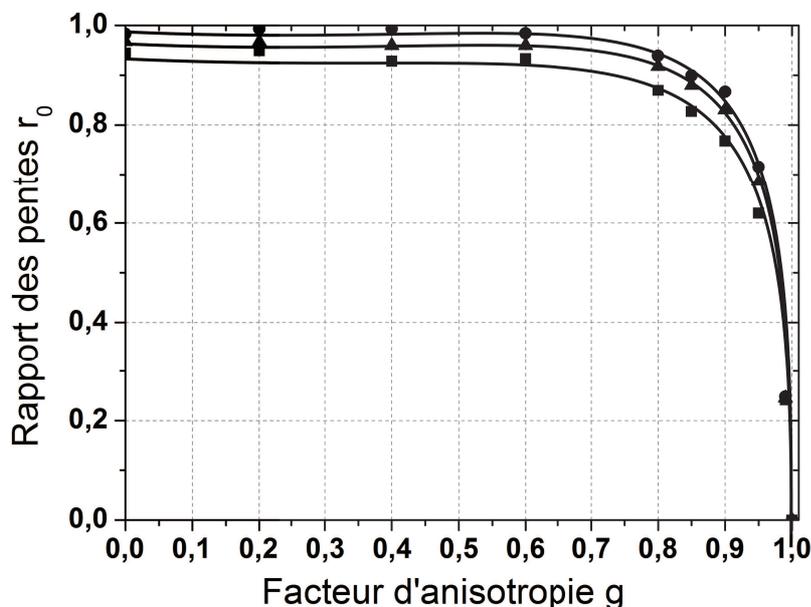


FIGURE II.19 – Simulations Monte-Carlo des rapports des pentes issus de la figure II.10 en fonction du facteur d'anisotropie g pour différentes valeurs de coefficient de diffusion μ_s . Disque : $\mu_s = 50 \text{ cm}^{-1}$; triangle : $\mu_s = 100 \text{ cm}^{-1}$; carré : $\mu_s = 150 \text{ cm}^{-1}$. Les lignes en trait plein sont les interpolations des résultats.

En résumé, les simulations Monte-Carlo nous ont montré que la microscopie de fluorescence à deux photons permet remonter aux paramètres optiques de diffusion de milieux turbides μ_s et g à partir de la mesure des rapports des intensités de fluorescence collectées selon trois modalités différentes, en fonction de la profondeur d'imagerie.

Afin de valider expérimentalement notre concept, différents milieux biomimétiques fluorescents aux propriétés diffusantes contrôlées et variables ont été synthétisés. Dans la section qui suit, nous commençons par décrire ces échantillons puis nous déterminons leur coefficient de diffusion par une mesure en transmission collimatée qui servira de base de comparaison avec les résultats fournis par notre propre méthode de microscopie 2PEF.

II.6 Validation expérimentale sur des gels biomimétiques

II.6.1 Protocole expérimental

De nombreuses études ont porté sur l'utilisation de solutions de lipides comme l'Intralipid® pour mimer les propriétés de diffusion des milieux biologiques [Van Starveren et al., 1991; Flock et al., 1992]. Les solutions de lipides ont cependant l'inconvénient majeur de ne pas être stables dans le temps, ce qui limite fortement la reproductibilité des mesures et l'observation prolongée des échantillons.

Dans ces conditions, nous nous sommes orientés vers la fabrication de milieux biomimétiques à base de gel d'agarose. Les gels d'agarose sont plus stables dans le temps que les solutions lipidiques, à condition de les conserver dans une enceinte hermétiquement close pour éviter l'évaporation. Pour contrôler les propriétés de diffusion de ces gels, nous ajoutons des solutions de microbilles de polystyrène monodispersées en taille. Le diamètre de ces microbilles et leur concentration dans les gels d'agarose sont choisis sur la base de la théorie de la diffusion de Mie. Selon cette théorie, la fonction de phase $p(\theta)$ est liée au diamètre des diffuseurs sphériques et à l'indice de réfraction relatif de ces diffuseurs par rapport au milieu environnant. En outre, le coefficient de diffusion μ_s est proportionnel à la concentration en diffuseurs (cf.équation II.4).

Préparation des gels

Le protocole complet de préparation des gels est présenté dans l'annexe B. Nous avons fabriqué les gels au sein du département de Chimie de l'Université de Brest avec l'aide de Mme Sylvie Hernot, assistante ingénieure.

La valeur des paramètres de diffusion est choisie de manière à rester proche des valeurs que l'on trouve classiquement dans les milieux biologiques, c'est-à-dire $g \in [0, 8; 0, 99]$ et $\mu_s \simeq 100 \text{ cm}^{-1}$ [Cheong et al., 1990]. Les diamètres des microbilles et leur concentration dans les gels sont déterminés à l'aide d'un programme informatique édité sous MatLab par [Wang et Wu, 2007], qui permet de calculer μ_s et g en connaissant le diamètre des particules sphériques diffusantes, la longueur d'onde de la lumière se propageant dans le milieu, l'indice relatif des sphères par rapport au solvant et leur masse volumique respective ainsi que la concentration des particules dans le volume final du milieu.

Huit types de gels ont été fabriqués en mélangeant un gel d'agarose à 4% (Agarose for routine use, Sigma-Aldrich®) à trois solutions de microbilles en suspension dans une solution de latex et de diamètres moyens 0,53 μm , 1,53 μm et 4,52 μm (Polysciences Inc., USA). Afin de rendre les gels fluorescents sous excitation à deux photons, nous ajoutons une solution de sulforhodamine B (Kiton Red® 620 (Exciton, USA)) au mélange {agarose + billes} de telle sorte que sa concentration dans les gels soit d'environ 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Deux gels sont fabriqués pour chaque diamètre de billes : un gel de coefficient de diffusion $\mu_s=50 \text{ cm}^{-1}$, et un autre gel de coefficient de diffusion $\mu_s=100 \text{ cm}^{-1}$. Un gel contenant uniquement du Kiton Red®, donc a priori non diffusant, et un autre gel pur (sans microbilles ni solution fluorescente) sont également fabriqués.

La longueur d'onde d'excitation est fixée à 830 nm pour bénéficier de la forte section efficace d'absorption à deux photons du Kiton Red® 620 [Nemoto et al., 2001; Xu et al., 1996]. Nous avons par ailleurs mesuré le spectre d'émission de cette molécule dans un gel d'agarose à l'aide d'un spectromètre HR2000 (Ocean Optics Inc, Dunedin, FL, USA) afin de mesurer sa longueur d'onde d'émission maximale λ_{em} , donnée nécessaire pour la simulation Monte-Carlo de la collection (spectre de la figure II.20). Le pic de fluorescence, relativement étroit (<30 nm) est proche de 600 nm; cette longueur d'onde a ainsi été retenue dans toutes les simulations (préparation des gels sur la base de la théorie de Mie, modélisation Monte Carlo de la diffusion). Les principaux paramètres des billes de latex utilisées, à l'exception de leur diamètre, sont reportés dans le tableau II.5.

Paramètres	Valeurs
λ_{em}	600 nm
$n_{solvant} \simeq n_{eau}$	1,33
n_{billes}	1,59
$w_{solvant}$	1,00
w_{billes}	1,05

TABLE II.5 – Paramètres utilisés pour obtenir g et μ_s à partir du programme de [Wang et Wu, 2007]. L'indice de réfraction du solvant $n_{solvant}$ est extrait de [Jain et al., 2012; Daimon et Masumura, 2007] et celui des billes n_{billes} de [Kasarova et al., 2007]. $w_{solvant}$ et w_{billes} sont les masses volumiques de l'agarose à 4% et du polystyrène, respectivement.

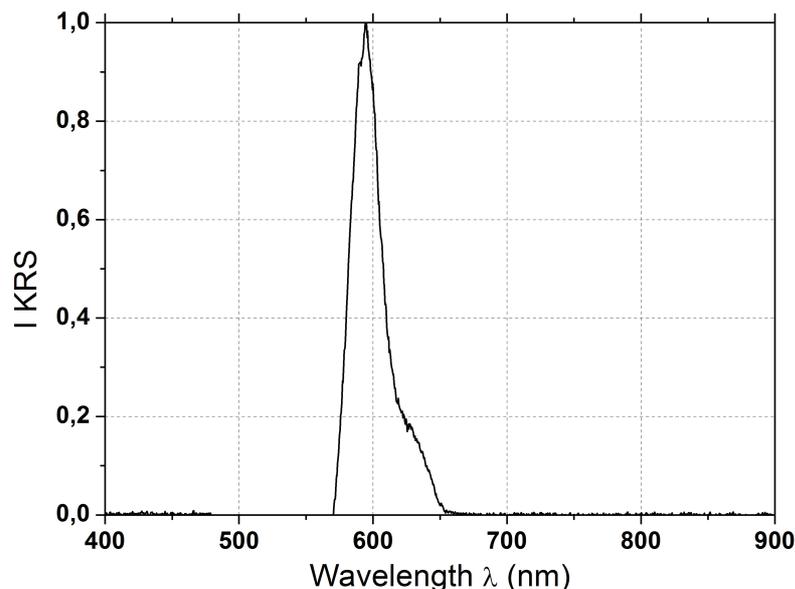


FIGURE II.20 – Spectre d'émission d'un gel contenant une solution de Kiton Red® 620 à environ $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et des microbilles de polystyrène de $0,53 \mu\text{m}$ de diamètre. Le temps d'acquisition du spectre est de 40 ms , la mesure a été effectuée par épi-collection de la fluorescence à l'aide d'un objectif de grossissement $20X$.

Le tableau II.6 donne le diamètre des microbilles utilisées dans cette étude et les facteurs d'anisotropie correspondants, ainsi que les concentrations en microbilles que l'on doit respecter pour obtenir les coefficients de diffusion μ_s souhaités à la longueur d'onde d'émission de fluorescence du Kiton Red® 620 λ_{em} .

Les gels ainsi préparés servent en partie à remplir des puits cylindriques (volume d'environ 1 cm^3) creusés dans un bloc de PMMA dont la taille est adaptée à celle de la platine de translation du microscope. Le reste des gels sert à remplir des capillaires en verre d'épaisseur interne variant entre 100 et $600 \mu\text{m}$ (CM Scientific, Ltd.). Une fois scellés à la paraffine, ces capillaires servent à mesurer le coefficient de diffusion μ_s par la méthode de transmission collimatée, ce qui permet de comparer directement les résultats des mesures effectuées au microscope de fluorescence à deux photons à une technique de référence [Wang et Wu, 2007]. La figure II.21 présente des photographies de ces puits et capillaires remplis par les gels.

Diamètre	Facteur d'anisotropie g	Concentration	$\mu_s(\lambda_{ém})$
$0,54 \pm 0,01$	$0,85 \pm 0,01$	$(5,4 \pm 0,3) \times 10^{10}$	$(100,0 \pm 6,5)$
		$(2,7 \pm 0,2) \times 10^{10}$	$(50,0 \pm 3,4)$
$1,53 \pm 0,04$	$0,93 \pm 0,02$	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^9$	$(100,0 \pm 6,7)$
		$(7,6 \pm 0,4) \times 10^8$	$(50,0 \pm 2,4)$
$4,52 \pm 0,15$	$0,87 \pm 0,04$	$(2,4 \pm 0,1) \times 10^8$	$(100,0 \pm 6,1)$
		$(1,2 \pm 0,8) \times 10^8$	$(50,0 \pm 3,2)$

TABLE II.6 – Diamètre des microbilles (en μm) sélectionnées pour fabriquer les gels biomimétiques et paramètres expérimentaux correspondants. Les concentrations et coefficients de diffusion μ_s sont exprimés respectivement en $\text{microbilles.cm}^{-3}$ et en cm^{-1} . Les incertitudes sont obtenues en considérant les incertitudes sur les volumes prélevés à l'aide de micropipettes (cf. annexe B). Le coefficient de diffusion étant linéairement dépendant de la concentration, les incertitudes sur ce coefficient sont proportionnelles aux concentrations. Les incertitudes sur les facteurs d'anisotropie sont calculées à partir des dispersions sur les diamètres des microbilles données par le fabricant.

Principe

La technique de mesure du coefficient de diffusion par transmission collimatée repose sur la mesure du nombre de photons balistiques N_{bal} transmis par un milieu diffusant relativement au nombre N_0 de photons incidents. En l'absence d'absorption, la loi de type Beer-Lambert suivante permet de remonter au coefficient de diffusion :

$$N_{bal} = N_0 e^{-\mu_s^{trans} L} \quad , \quad (\text{II.46})$$

où μ_s^{trans} est le coefficient de diffusion mesuré par la méthode de transmission collimatée et L l'épaisseur du milieu diffusant traversé. Dans notre expérience, l'échantillon est un capillaire de verre. Afin d'améliorer la précision de la mesure, nous avons utilisé six capillaires d'épaisseurs différentes (de 100 à 600 μm par pas de 100 μm). Une régression linéaire de la loi de Beer-Lambert donnera une moyenne du coefficient de diffusion μ_s^{trans} .

Le schéma du montage développé pour mettre en oeuvre la méthode de la transmission collimatée est donné sur la figure II.22.

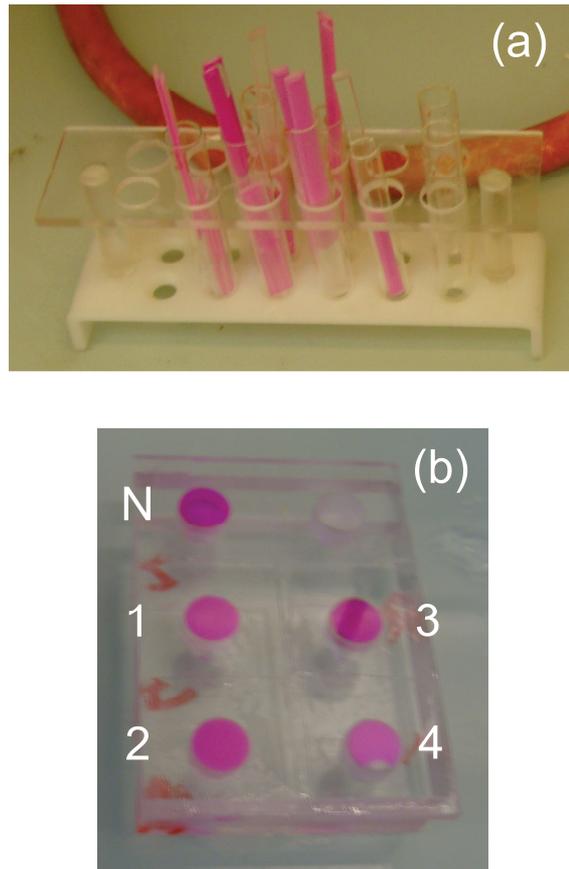


FIGURE II.21 – Photographies des gels coulés à chaud dans (a) des capillaires de verre d'épaisseurs différentes ou (b) des puits creusés dans une plaque de PMMA. Sur la photographie (b) : N : gel fluorescent non diffusant (exempt de microbilles), 1 : $4,52 \mu\text{m}$; 100 cm^{-1} . 2 : $4,52 \mu\text{m}$; 50 cm^{-1} . 3 : $1,53 \mu\text{m}$; 100 cm^{-1} . 4 : $1,53 \mu\text{m}$; 50 cm^{-1} .

Un faisceau collimaté issu d'un laser He-Ne (Melles Griot, France) émettant à la longueur d'onde $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ est faiblement focalisé par une lentille convergente (distance focale $f \simeq 50 \text{ cm}$) dans le milieu diffusant enfermé dans un capillaire, lui-même plongé dans une cuve en quartz remplie d'eau afin de limiter les pertes par réflexion ainsi que les aberrations liées à la courbure du capillaire. Un premier trou de sélection, très large (diamètre de 1 mm), permet d'éliminer dès leur sortie du milieu les photons les plus diffusés. Le faisceau transmis par ce trou est ensuite fortement focalisé sur un diaphragme de très petit diamètre ($\simeq 30 \mu\text{m}$) par une lentille convergente (distance focale $f' \simeq 15 \text{ cm}$) pour que seuls les photons balistiques soient détectés. Le diamètre du diaphragme est choisi pour correspondre à la largeur de waist du faisceau laser, considéré comme gaussien, dans le plan focal image de la lentille. Un filtre interférentiel à 633 nm est utilisé pour détecter uniquement les photons provenant de la source laser.

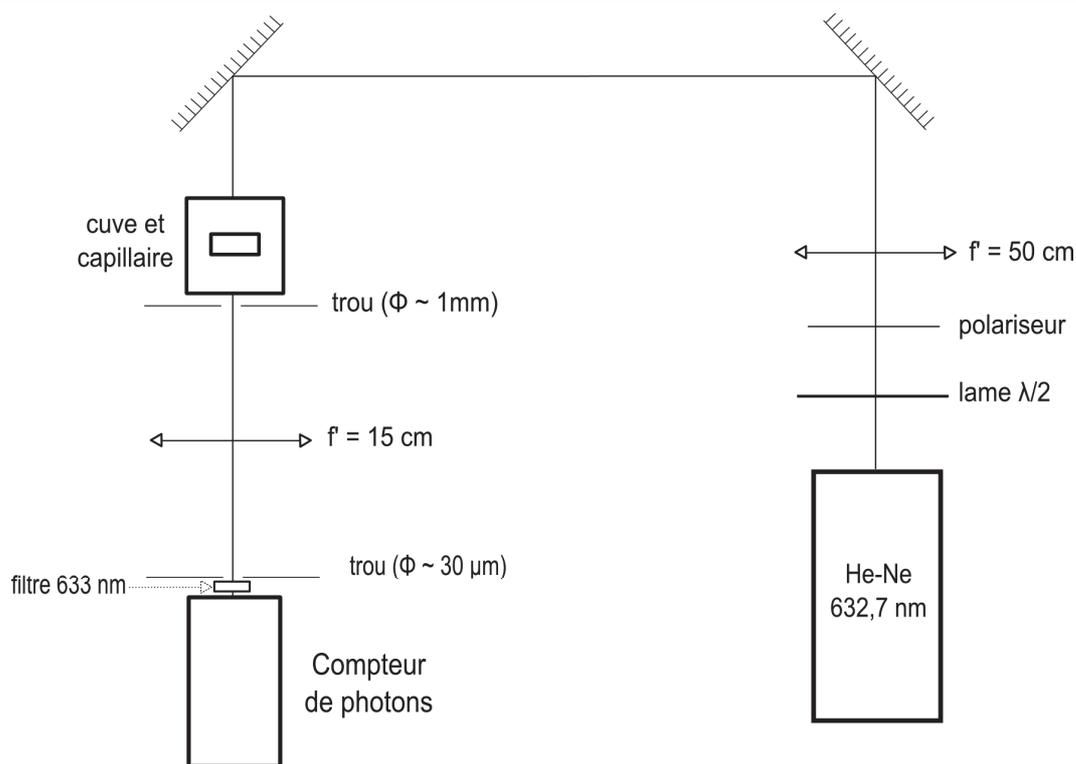


FIGURE II.22 – Schéma du montage de transmission collimatée.

Enfin, le détecteur utilisé est un PMT en mode comptage de photons (Photomultiplier Tube MP944, Perkin Elmer, MA, USA). La puissance du faisceau laser est ajustée par une lame demi-onde associée à un polariseur. N_{bal} est obtenu en mesurant le nombre de photons détectés par le PMT pendant 10 s puis en moyennant les résultats sur 5 mesures successives. L'offset du PMT est retiré de chaque mesure. La valeur de référence N_0 est obtenue en mesurant le nombre de photons traversant des lames de gel fluorescent de mêmes épaisseurs et sans billes afin de compenser les pertes liées aux réflexions sur les interfaces et l'absorption par le gel. Le coefficient d'absorption du gel est mesuré en comparant N_0 et le nombre de photons détectés ayant traversé des lames de gel pur N'_0 .

Résultats

Le rapport N_0/N_{bal} ainsi obtenu est représenté en échelle semi-logarithmique en fonction de l'épaisseur interne des capillaires sur la figure II.23. Une régression linéaire permet finalement de remonter au coefficient de diffusion.

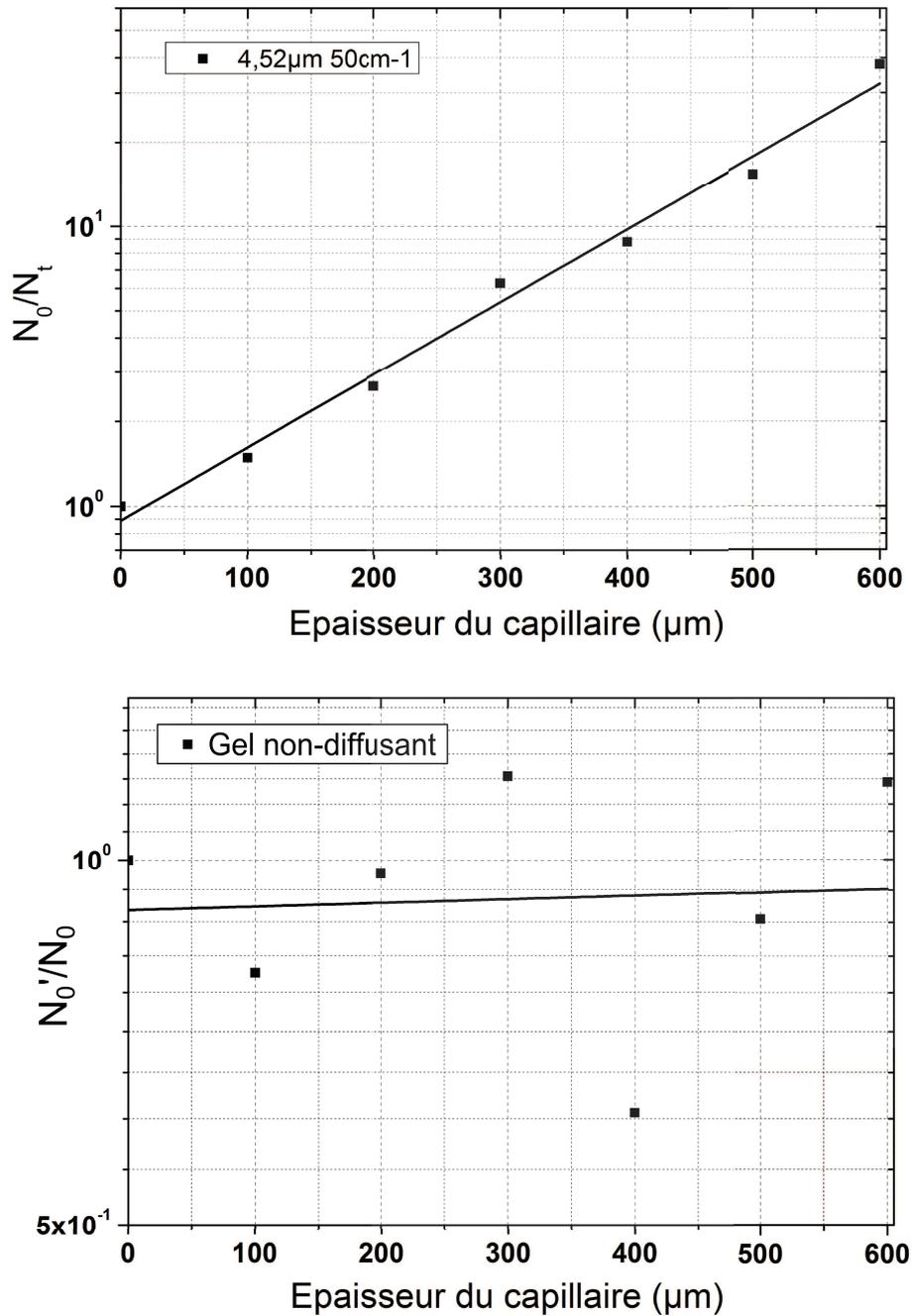


FIGURE II.23 – Représentations en échelle semi-logarithmique des rapports N_0/N_{bal} pour le gel contenant des billes de $4,52 \mu\text{m}$ de diamètre dont le coefficient de diffusion attendu est 50 cm^{-1} (en haut) et N_0'/N_0 pour le gel non diffusant. Les traits pleins sont les régressions linéaires des points expérimentaux, dont les pentes correspondent au coefficient de diffusion μ_s^{trans} ou au coefficient d'absorption μ_a pour le gel non diffusant.

Les valeurs des coefficients extraites des mesures telles que celles de la figure II.23 sont rassemblées dans le tableau II.7.

Diamètre des microbilles	Facteur d'anisotropie g	μ_s^{att}	μ_s^{trans}
0,54	0,85	$50,0 \pm 3,4$	$40,2 \pm 2,9$
		$100,0 \pm 6,5$	$99,8 \pm 4,3$
1,53	0,93	$50,0 \pm 2,4$	$51,7 \pm 4,1$
		$100,0 \pm 6,7$	$131,7 \pm 6,1$
4,52	0,87	$50,0 \pm 3,2$	$59,9 \pm 2,8$
		$100,0 \pm 6,1$	$105,6 \pm 5,4$
exempt	- - -	0	$0,7 \pm 4,6$

TABLE II.7 – Coefficients de diffusion des gels pour trois diamètres de microbilles (en μm) mesurés par la technique de transmission collimatée. Les coefficients de diffusion sont donnés en cm^{-1} . De gauche à droite : μ_s^{att} est le coefficient de diffusion prévu par les simulations de [Wang et Wu, 2007]. L'incertitude associée est relative aux incertitudes sur le prélèvement des volumes. μ_s^{trans} est le coefficient de diffusion obtenu par l'expérience de transmission collimatée.

Les coefficients de régression linéaire sont tous supérieurs à 0,98, sauf pour le gel non diffusant pour lequel R^2 est proche de 0 (0,004), ce qui montre que les pertes optiques des échantillons non diffusants proviennent essentiellement de pertes par réflexion aux interfaces et possiblement des aberrations dues aux imperfections de planéité des capillaires. Les coefficients de diffusion ainsi déterminés serviront de base de comparaison pour ceux obtenus par microscopie de fluorescence à deux photons.

Protocole d'acquisition

Comme montré à la section II.4, la détermination du coefficient de diffusion et du facteur d'anisotropie d'un milieu fluorescent passe par la mesure du rapport des intensités de fluorescence épicolectées selon 3 modalités en microscopie à deux photons. On rappelle que toutes les mesures rapportées dans ce chapitre ont été faites à l'aide d'un objectif 60X ($NA=0,9$) à immersion d'eau, de distance de travail 2 mm. Son champ de vue linéaire ($r_{FOV}=320 \mu\text{m}$) détermine celui de notre microscope à deux photons dans le mode de collection NDS.

En accord avec la section II.5.2, nous avons choisi le trou confocal de diamètre $200 \mu\text{m}$ (trou #4) pour les mesures dans le mode de collection confocale, afin de bénéficier du meilleur rapport signal à bruit dans les images de fluorescence. Les mesures destinées à remonter au facteur d'anisotropie ont été réalisées avec l'ouverture #5. Les images sont acquises avec une définition de 256×256 pixels² en balayant une surface zoomée de l'échantillon. Ceci permet d'éviter le photoblanchiment des fluorophores qui résulterait d'une excitation prolongée des mêmes molécules en l'absence de balayage du plan focal image. Le fait de zoomer permet en outre de générer une source de fluorescence toujours proche de l'axe optique, en accord avec la simulation Monte-Carlo qui considère une source exactement sur l'axe optique. Le rapport signal à bruit des images est amélioré en utilisant un filtrage de type Kalman sur deux images acquises successivement.

La puissance moyenne du faisceau laser excitateur est mesurée en sortie de cavité. Elle est soigneusement ajustée via un jeu de filtres de densité neutre pour obtenir une intensité de fluorescence suffisante aux profondeurs d'imagerie les plus grandes tout en évitant le photoblanchiment des fluorophores aux faibles profondeurs d'imagerie. Cette puissance laser est bien entendu gardée constante pour une série de mesures selon les 3 modalités de collection pour chacun des échantillons, ceci afin de conserver la même fonction d'excitation f_{exc} . Les tensions des PMTs de chacune des voies de collection sont ajustées de manière à égaliser les intensités de fluorescence mesurées par les trois voies de collection, à une profondeur d'imagerie correspondant au maximum de l'efficacité de collection de la voie NDS (quelques dizaines de μm sous la surface de l'échantillon, cf. figure II.10).

Chaque acquisition est la compilation d'une série ou pile d'images (stack) acquises en fonction de la profondeur d'imagerie, tous les $10 \mu\text{m}$, jusqu'à $300 \mu\text{m}$. Le temps d'acquisition d'un stack d'images en profondeur est dans ces conditions infé-

rieur à une minute. Notons que pour les échantillons les plus diffusants (100 cm^{-1}) le rapport signal à bruit dans l'image n'est pas assez élevé pour obtenir des résultats exploitables au-delà d'une profondeur d'imagerie de $200 \mu\text{m}$. L'intensité moyenne de fluorescence sur l'ensemble des images d'un stack a été évaluée sous ImageJ (logiciel en libre accès du NIH) à l'aide du plug-in "Measure Stacks". Le résultat est noté F^{coll} . Les rapports des intensités moyennes de fluorescence ainsi mesurées, les représentations graphiques en fonction de la profondeur d'imagerie et les régressions linéaires ont été réalisées sous le logiciel OriginPro.

Détermination de μ_s

La figure II.24 représente les rapports des intensités de fluorescence pour les sept gels. Les points expérimentaux sont très bien ajustés par régression linéaire. Celle-ci commence à $z_0 = 30 \mu\text{m}$ car les premiers points ne sont pas exploitables, la source de fluorescence étant trop proche de la surface des échantillons. Les coefficients de régression linéaire R^2 sont tous supérieurs à 0,98, sauf pour le gel non diffusant qui présente un R^2 de 0,90. Les pentes fournies par ces régressions correspondent au coefficient de diffusion apparent μ_s^{app} de chaque gel, dont nous pouvons extraire la valeur de μ_s^{corr} à partir de la relation II.44. Les coefficients de diffusion μ_s^{trans} ont été déterminés à l'aide de l'expérience de transmission collimatée décrite précédemment. Le tableau II.8 regroupe tous les coefficients de diffusion attendus et mesurés de ces gels.

On remarque, à la lecture du tableau II.8, que les coefficients de diffusion corrigés (avant-dernière colonne) obtenus par notre méthode de microscopie 2PEF sont remarquablement proches de ceux tirés de la méthode de la transmission collimatée (dernière colonne), même si les valeurs sont parfois éloignées de celles attendues, la fabrication des gels étant délicate à maîtriser (erreurs de mesure au moment du prélèvement des volumes d'agarose et/ou de solutions de microbilles). C'est à notre connaissance la première fois qu'une méthode applicable à des milieux turbides épais (semi-infinis en principe) permet une mesure simple et robuste du coefficient de diffusion, indépendamment de l'anisotropie de la diffusion, à partir d'une expérience unique.

Nous avons par ailleurs vérifié l'indépendance des mesures de μ_s^{app} au diamètre du trou confocal (cf. section II.5.2) à partir de la mesure, pour les 5 ouvertures en position confocale (les 4 trous réellement confocaux et l'ouverture #5) disponibles au sein de notre microscope, de l'intensité de fluorescence générée par le gel contenant

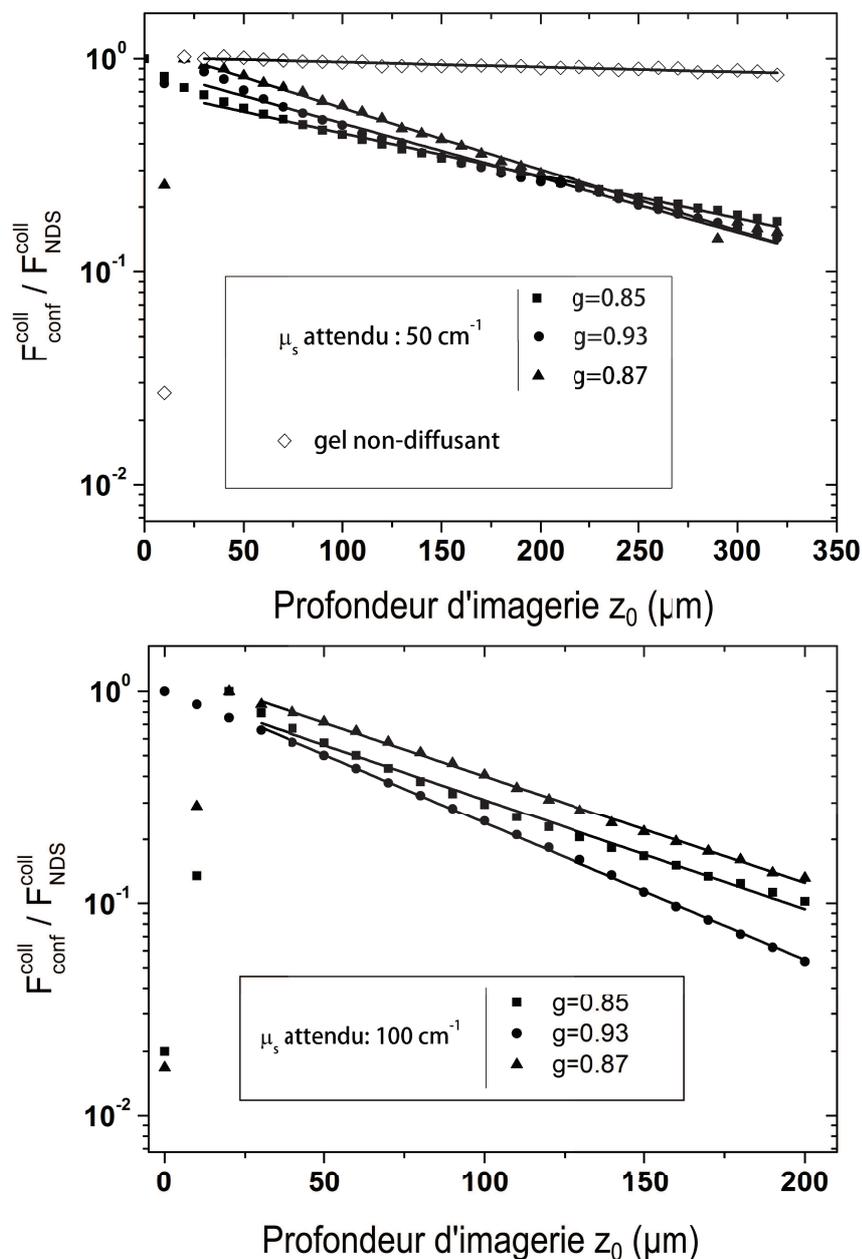


FIGURE II.24 – Représentation en échelle semi-logarithmique du rapport des intensités de fluorescence épicollectées par les voies confocale et NDS pour sept gels fluorescents aux propriétés de diffusion différentes. En haut : représentation graphique pour les gels possédant un coefficient de diffusion attendu μ_s^{att} de 50 cm^{-1} et pour le gel exempt de microbilles (μ_s^{att} nul). En bas : représentation graphique pour les gels possédant un coefficient de diffusion attendu μ_s^{att} de 100 cm^{-1} . Les facteurs d'anisotropie g sont donnés dans le tableau II.6. Les traits pleins sont les régressions linéaires des points expérimentaux, dont les pentes μ_s^{app} sont données dans le tableau II.8.

Diamètre des microbilles	Facteur d'anisotropie g	μ_s^{att}	μ_s^{app}	μ_s^{corr}	μ_s^{trans}
0,54	0,85	$50,0 \pm 3,4$	$46,4 \pm 3,5$	$40,2 \pm 3,0$	$40,2 \pm 2,9$
		$100,0 \pm 6,5$	$119,1 \pm 2,0$	$103,7 \pm 1,8$	$99,8 \pm 4,3$
1,53	0,93	$50,0 \pm 2,4$	$59,3 \pm 1,4$	$51,5 \pm 1,2$	$51,7 \pm 4,1$
		$100,0 \pm 6,7$	$148,6 \pm 4,8$	$129,8 \pm 4,2$	$131,7 \pm 6,1$
4,52	0,87	$50,0 \pm 3,2$	$66,6 \pm 3,5$	$57,9 \pm 3,1$	$59,9 \pm 2,8$
		$100,0 \pm 6,1$	$116,2 \pm 7,3$	$101,2 \pm 6,5$	$105,6 \pm 5,4$
exempt	- - -	0	$4,8 \pm 1,2$	$4,1 \pm 1,1$	$0,7 \pm 4,6$

TABLE II.8 – Coefficients de diffusion (en cm^{-1}) des gels pour trois diamètres de microbilles (en μm). De gauche à droite : μ_s^{att} est le coefficient de diffusion prévu par les simulations de [Wang et Wu, 2007]. L'incertitude associée est relative aux incertitudes sur le prélèvement des volumes. μ_s^{app} est le coefficient de diffusion apparent obtenu par régression linéaire des courbes de la figure II.24. La variabilité de ce coefficient est obtenue par statistique sur les images en 2PEF. μ_s^{corr} est le coefficient de diffusion corrigé déduit de μ_s^{app} à l'aide de l'équation II.44. μ_s^{trans} est le coefficient de diffusion obtenu par l'expérience de transmission collimatée (cf. section II.6.1).

des billes de $1,53 \mu\text{m}$ de diamètre et de coefficient de diffusion attendu de 100 cm^{-1} . Le choix de ce gel est arbitraire, et les conclusions sont identiques pour les autres échantillons. Les rapports des intensités de fluorescence épicollectées par la voie confocale ou DS et la voie NDS sont représentés sur la figure II.25. Le tableau II.9 donne les pentes mesurées dans ces conditions.

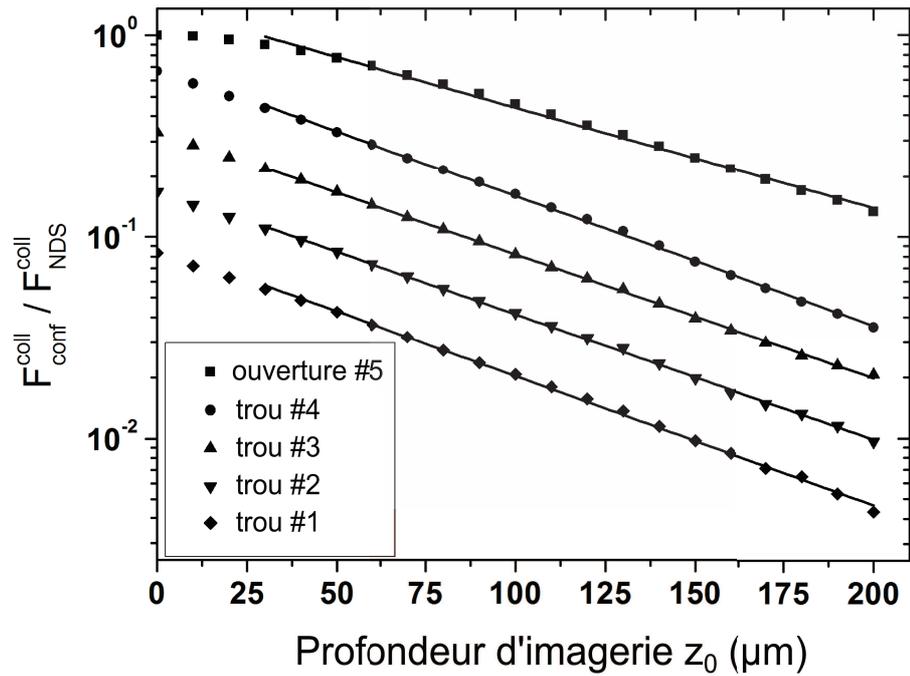


FIGURE II.25 – Représentation en échelle semi-logarithmique des rapports des intensités de fluorescence épicollectées par les voies confocale et NDS pour les quatre trous de sélection et une cinquième ouverture, en fonction de la profondeur d'imagerie z_0 . Le gel utilisé pour cette étude possède un coefficient de diffusion attendu de 100 cm^{-1} et inclus des microbilles de polystyrène de $1,53 \mu\text{m}$ de diamètre. Les écarts entre les droites ont été augmentés pour améliorer la visibilité.

Diamètre des ouvertures (μm)	$\mu_s^{\text{app}} (\text{cm}^{-1})$	$\mu_s^{\text{corr}} (\text{cm}^{-1})$
30 (#1)	$147,8 \pm 5,7$	$129,1 \pm 5,1$
60 (#2)	$143,4 \pm 5,1$	$125,2 \pm 4,5$
100 (#3)	$141,6 \pm 5,1$	$123,6 \pm 4,5$
200 (#4)	$148,6 \pm 4,8$	$129,8 \pm 4,2$
5400 (#5)	$115,1 \pm 2,1$	$100,2 \pm 1,9$

TABLE II.9 – Coefficients de diffusion apparent et corrigé issus des pentes des rapports représentés à la figure II.25 pour les cinq ouvertures.

Les droites obtenues sont quasiment parallèles les unes aux autres pour les trous confocaux allant de #1 à #4, ce qui montre que les coefficients de diffusion apparents sont bels et bien indépendants du diamètre du trou de sélection, aux variabilités spatiales de l'échantillon près. Ce résultat était attendu compte-tenu du résultat des simulations Monte-Carlo (cf. section II.5.2). Notons par ailleurs que, comme prévu par les simulations Monte-Carlo, la pente obtenue pour l'ouverture #5 est inférieure aux quatre autres du fait du champ de vue beaucoup plus grand qu'elle produit.

Mesure de g

La détermination de g nécessite la mesure de l'intensité de fluorescence émise par les gels à travers l'ouverture #5. On rappelle que pour obtenir g expérimentalement, il faut déterminer la pente $p(\#5)$ de la caractéristique $\ln \left(F_{DS}^{coll} / F_{NDS}^{coll} \right) = f(z_0)$ puis calculer le rapport r_0 entre cette pente et le coefficient μ_s^{app} déterminé selon la méthode décrite précédemment. Les graphiques décrivant l'évolution de r_0 suivant les valeurs de g sont tracés pour chaque μ_s^{corr} . Six graphiques sont ainsi nécessaires pour déterminer les facteurs d'anisotropie de tous les gels.

Nous montrons à titre d'exemple les courbes desquelles sont tirées les pentes $p(\#5)$ et μ_s^{app} des gels incluant les billes de $0,54 \mu\text{m}$ pour les deux coefficients de diffusion (50 cm^{-1} et 100 cm^{-1}) (figures II.26 et II.27).

Les mesures de g et de sa variabilité spatiale Δg se font de la manière suivante. Une fois le rapport r_0 calculé nous reportons sa valeur sur le graphe $r_0 = f(g)$ issu des simulations Monte-Carlo, ce qui donne une valeur de g . Cependant, du fait de l'hétérogénéité de l'échantillon dont on a préalablement déterminé le coefficient de diffusion, les mesures de pentes sont affectées par une variabilité spatiale. Nous pouvons en déduire la variabilité du rapport Δr_0 par simple différenciation et report des erreurs (recommandations du Bureau International des Poids et Mesures [BIPM, 2008]). Ainsi nous pouvons écrire que :

$$\Delta r_0 = r_0 \sqrt{\frac{(\Delta \mu_s^{app})^2}{(\mu_s^{app})^2} + \frac{\Delta p(\#5)^2}{p(\#5)^2}} \quad (\text{II.47})$$

Cet intervalle ainsi calculé est reporté dans les graphiques issus des simulations et permet de déterminer la variabilité Δg de g .

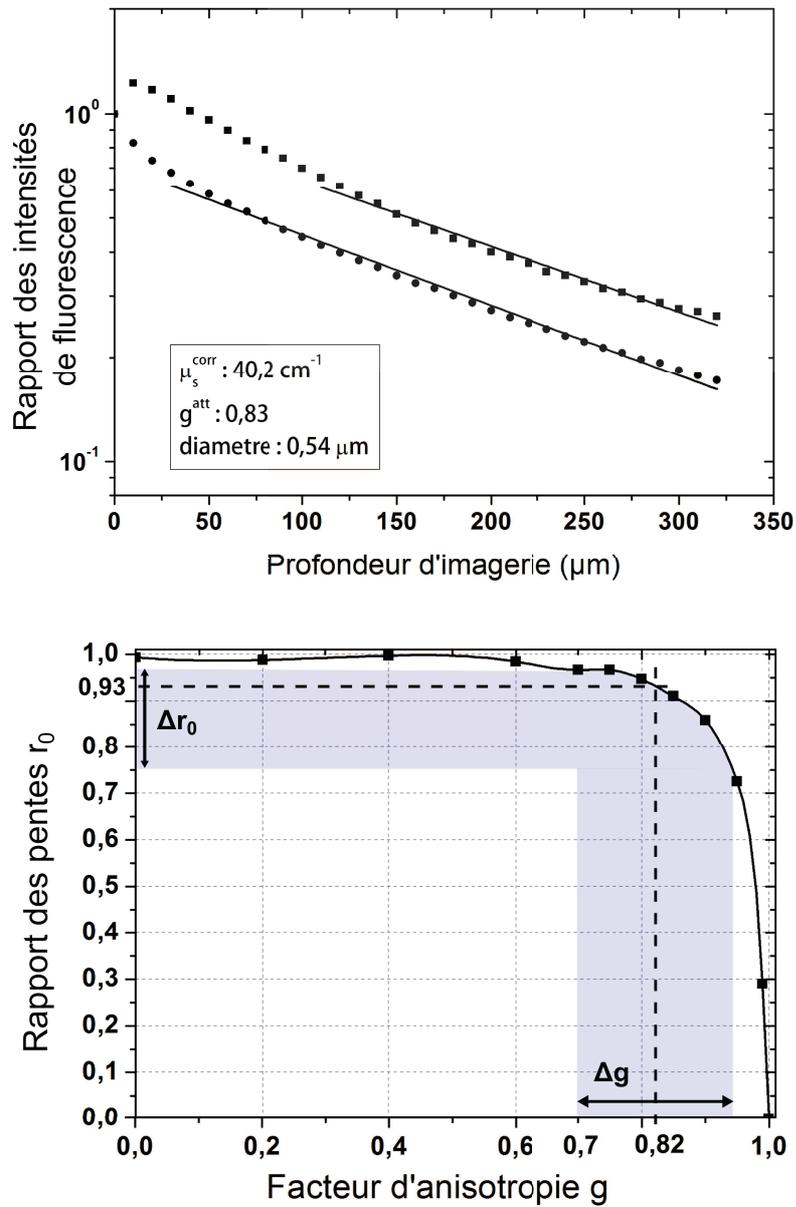


FIGURE II.26 – Représentation en échelle semi-logarithmique des rapports $F_{conf}^{coll}/F_{NDS}^{coll}$ (disques noirs) et $F_{DS}^{coll}/F_{NDS}^{coll}$ (carrés noirs) pour le trou de sélection #4 et l'ouverture #5, en fonction de la profondeur d'imagerie z_0 (en haut). Les points sont les mesures expérimentales, les droites en trait plein les régressions linéaires. En bas : simulations Monte-Carlo de l'évolution du rapport de ces pentes suivant g . Les points sont les données issues des simulations, la courbe en trait plein l'interpolation de ces données. Les zones bleues représentent les intervalles de variabilité du rapport r_0 (Δr_0) et de g (Δg). Le gel utilisé pour cette étude possède un coefficient de diffusion corrigé de $40,2 \text{ cm}^{-1}$ et inclus des microbilles de polystyrène de $0,54 \text{ }\mu\text{m}$ de diamètre. Le coefficient d'anisotropie attendu est de $0,85$.

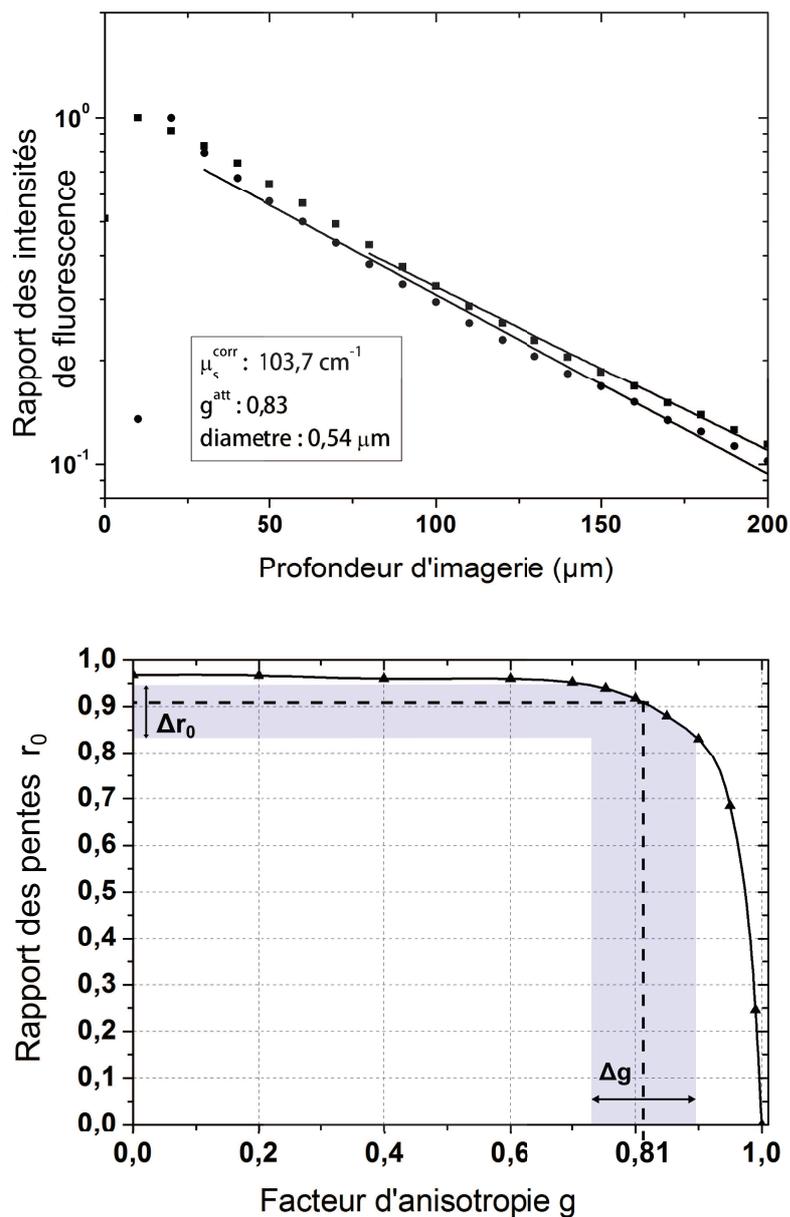


FIGURE II.27 – Représentation en échelle semi-logarithmique des rapports $F_{conf}^{coll}/F_{NDS}^{coll}$ (disques noirs) et $F_{DS}^{coll}/F_{NDS}^{coll}$ (carrés noirs) pour le trou de sélection #4 et l'ouverture #5, en fonction de la profondeur d'imagerie z_0 (en haut). Les points sont les mesures expérimentales, les droites en trait plein les régressions linéaires. En bas : simulations Monte-Carlo de l'évolution du rapport de ces pentes suivant g . Les points sont les données issues des simulations, la courbe en trait plein l'interpolation de ces données. Les zones bleues représentent les intervalles de variabilité du rapport r_0 (Δr_0) et de g (Δg). Le gel utilisé pour cette étude possède un coefficient de diffusion corrigé de $103,7 \text{ cm}^{-1}$ et inclus des microbilles de polystyrène de $0,54 \mu\text{m}$ de diamètre. Le coefficient d'anisotropie attendu est de 0,85.

Remarquons que l'intervalle de points nécessaire pour réaliser la régression linéaire sur les représentations de $\ln \left(\frac{F_{DS}^{coll}}{F_{NDS}^{coll}} \right)$ en fonction de la profondeur d'imagerie z_0 varie suivant la valeur de g . En effet, plus g est proche de 1, plus la régression linéaire pour obtenir $p(\#5)$ commence à des profondeurs d'imagerie importantes. Ceci est lié au fait que pour les hautes valeurs de g la voie DS se comporte comme la voie NDS et son efficacité de collection est presque constante aux faibles profondeurs d'imagerie z_0 . Dans le cas des deux gels étudiés ici, les régressions linéaires des pentes $p(\#5)$ ont été effectuées entre 80 et 320 μm pour le milieu à 40,2 cm^{-1} , et entre 110 et 200 μm pour celui à 103,7 cm^{-1} .

Nous avons obtenu les valeurs des rapports r_0 et des facteurs d'anisotropie g pour chaque gel. Le tableau II.10 donne l'ensemble des résultats.

Diamètre des microbilles	g attendu	μ_s^{corr} (cm^{-1})	$r_0 = \frac{p(\#5)}{\mu_s^{app}}$	g
$0,54 \pm 0,01$	$0,85 \pm 0,01$	$40,2 \pm 3,0$	$0,93 \pm 0,18$	$0,82 \pm 0,12$
		$103,7 \pm 1,8$	$0,91 \pm 0,08$	$0,81 \pm 0,09$
$1,53 \pm 0,04$	$0,93 \pm 0,02$	$51,5 \pm 1,2$	$0,94 \pm 0,04$	$0,81 \pm 0,05$
		$129,8 \pm 4,2$	$0,77 \pm 0,05$	$0,91 \pm 0,01$
$4,52 \pm 0,15$	$0,87 \pm 0,04$	$57,9 \pm 3,1$	$0,75 \pm 0,06$	$0,94 \pm 0,01$
		$101,2 \pm 6,5$	$0,66 \pm 0,07$	$0,96 \pm 0,01$

TABLE II.10 – Rapport des pentes r_0 et facteurs d'anisotropie g de chaque gel biomimétique. Les coefficients de diffusion corrigés sont extraits du tableau II.8

De manière générale, les valeurs de g sont en bon accord avec les estimations fournies par la théorie de Mie [Wang et Wu, 2007]. Nous observons en effet un écart relatif maximal inférieur à 13% entre nos valeurs et celles attendues. Nous pouvons cependant constater que la variabilité de g pour les gels contenant les microbilles de 0,54 μm de diamètre est très importante. Cette variabilité est la conséquence d'une grande variabilité spatiale du coefficient μ_s^{corr} pour le gel possédant le coefficient de diffusion le plus faible (gel probablement très hétérogène).

Ceci n'est en revanche pas le cas du gel le plus diffusant, pour lequel μ_s^{corr} varie d'environ 1% selon la zone explorée. Par ailleurs, si nous regardons plus attentivement les résultats obtenus pour les échantillons contenant les microbilles de $1,53 \mu\text{m}$ de diamètre, la mesure de g pour le gel le plus diffusant donne un résultat conforme à ce qui était attendu. En revanche, le gel le moins diffusant donne un facteur d'anisotropie plutôt éloigné de la valeur théorique, compte-tenu des variabilités spatiales du gel et de la dispersion en taille des microbilles dans la solution mère. Une explication pourrait être la présence d'agrégats dans la préparation. Cette même préparation donne des résultats similaires lorsque l'on répète une deuxième fois l'expérience, ce qui semble indiquer que la source de cet écart est l'échantillon même et non le protocole expérimental.

Enfin, les valeurs de g obtenues pour les plus grosses microbilles sont systématiquement sur-évaluées, ce qui semble être dû à un défaut du programme de simulation de la diffusion de Mie [Wang et Wu, 2007] lui-même. En effet, nous nous attendons théoriquement à ce que le facteur d'anisotropie augmente avec le diamètre des sphères diffusantes [Van de Hulst], ce que confirme nos mesures. Notons cependant que les valeurs de g sont quasiment identiques pour des gels contenant des microbilles de même diamètre, quelque soit le coefficient de diffusion (à l'exception d'un gel). Ceci démontre la robustesse de notre approche.

Compte-tenu des résultats encourageants obtenus sur des gels globalement homogènes, nous avons cherché à savoir si notre méthode pouvait s'appliquer à la mesure des paramètres de diffusion d'un milieu en couches notamment, une telle structure se retrouvant au niveau de certains tissus biologiques comme la peau.

II.6.2 Milieux hétérogènes

Superposition de gels diffusants

En partant de deux gels biomimétiques homogènes de paramètres de diffusion distincts, nous sommes parvenus à réaliser un échantillon présentant deux couches superposées et une interface presque plane entre celles-ci.

Le gel le moins diffusant contient des microbilles de $4,52 \mu\text{m}$ de diamètre et de coefficient de diffusion estimé proche de 100 cm^{-1} . Ce gel est coulé à chaud dans un capillaire de $100 \mu\text{m}$ d'épaisseur interne, qui est ensuite brisé pour en extraire le gel solidifié. Cette fine tranche de gel est déposée sur une lamelle couvre-objet, dans un

joint torique d'une épaisseur de 2 mm. Un deuxième gel est préparé avec des billes de $0,54 \mu\text{m}$ et un coefficient de diffusion estimé à environ 200 cm^{-1} . Après moulage à chaud dans un capillaire de $600 \mu\text{m}$ d'épaisseur interne, le gel solidifié est extrait du capillaire et déposé sur le premier. L'échantillon ainsi préparé est déposé sur une lame de microscope. Le joint a pour fonction d'empêcher les gels d'être écrasés entre la lame et la lamelle. Le gel le plus fin est ainsi traversé en premier par le faisceau excitateur.

La figure II.28 présente le logarithme du rapport des intensités de fluorescence $F_{conf}^{coll}/F_{NDS}^{coll}$ et $F_{DS}^{coll}/F_{NDS}^{coll}$ en fonction de la profondeur d'imagerie dans ce milieu.

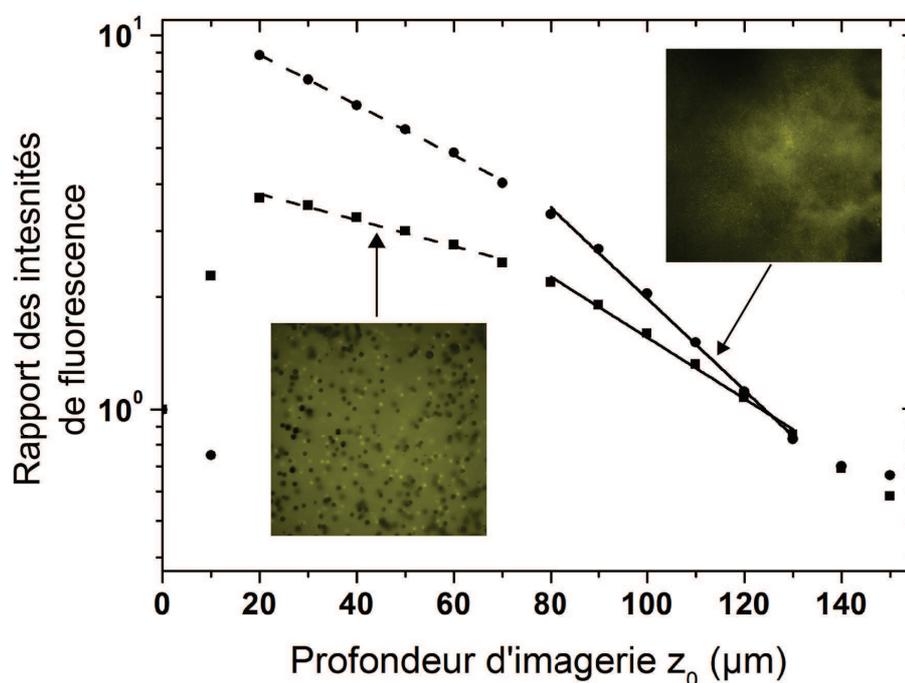


FIGURE II.28 – Représentation des rapports $F_{conf}^{coll}/F_{NDS}^{coll}$ et $F_{DS}^{coll}/F_{NDS}^{coll}$ suivant la profondeur d'imagerie pour un échantillon résultant de la superposition de deux gels aux propriétés de diffusion différentes. Les carrés noirs sont les données expérimentales issues de la collection DS, les ronds noirs sont les données issues de la collection confocale (trou #4). Le segment de droite en pointillés est la régression linéaire du rapport des intensités pour le gel du dessus, tandis que le segment en trait plein est la régression linéaire du rapport d'intensités pour le gel du dessous. Les images insérées sont des zooms de $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ des gels imagés par la voie NDS ; à gauche : image du gel supérieur présentant les microbilles de $4,52 \mu\text{m}$ de diamètre prise à $30 \mu\text{m}$ sous la surface de l'échantillon, à droite : image du gel inférieur montrant les microbilles de $0,54 \mu\text{m}$ de diamètre prise à $90 \mu\text{m}$ sous la surface de l'échantillon.

Dans le cas d'une superposition de deux milieux ayant des coefficients de diffusion μ_s différents, nous nous attendons à trouver, de la même manière que précédemment,

un comportement exponentiel décroissant du rapport des intensité de fluorescence collectées en confocal et en NDS :

$$\begin{cases} e^{-\mu_{s1}^{app} z_0} & \text{pour } z_0 < t_1 \\ \left[e^{-(\mu_{s2}^{app} - \mu_{s1}^{app}) t_1} \right] e^{-\mu_{s2}^{app} z_0} & \text{pour } z_0 > t_1 \end{cases} \quad \begin{matrix} \text{(II.48)} \\ \text{(II.49)} \end{matrix}$$

t_1 est l'épaisseur du milieu supérieur. Les effets d'interface sont ici négligés du fait de l'égalité presque parfaite entre les indices de réfraction des deux milieux.

Nous utilisons le même protocole d'imagerie que pour les gels homogènes. La profondeur d'imagerie est cependant limitée à 150 μm du fait du fort coefficient de diffusion du milieu inférieur. La caractéristique $\ln(F_{conf}^{coll}/F_{NDS}^{coll}) = f(z_0)$ présente une rupture de pente très nette aux alentours de 80 μm , l'épaisseur initiale du gel supérieur étant de 100 μm .(cf. figure II.28). Ce changement de pente est clairement provoqué par le passage du milieu supérieur au milieu inférieur. Le comportement exponentiel est en outre toujours observé de part et d'autre de l'interface entre les deux milieux. Les coefficients de diffusion apparents et corrigés tirés de l'expérience et des expressions précédentes (formules II.48 et II.49) sont donnés dans le tableau ci-dessous.

gel	$\mu_s^{app}(\text{cm}^{-1})$	$\mu_s^{corr}(\text{cm}^{-1})$	pente p(#5)	r_0	g
supérieur	$154,9 \pm 24,8$	$134,2 \pm 23,1$	$80,3 \pm 11,7$	$0,52 \pm 0,11$	$0,97 \pm 0,02$
inférieur	$282,4 \pm 62,8$	$249,2 \pm 66,1$	$188,9 \pm 50,1$	$0,67 \pm 0,23$	$0,88 \pm 0,09$

TABLE II.11 – Coefficients de diffusion apparent et corrigé et coefficient p(#5) tirés des graphes de la figure II.28. Le rapport $r_0 = p(\#5)/\mu_s^{app}$ ainsi que le facteur d'anisotropie g déduit de r_0 sont également donnés.

Les valeurs mesurées sont sensiblement différentes de celles attendues (100 cm^{-1} et 200 cm^{-1}), probablement à cause d'une erreur de manipulation lors de la préparation des gels et/ou de leur déshydratation, les gels exposés à l'air libre pouvant se dessécher très rapidement du fait de leur épaisseur relativement faible (100 μm et 600 μm). La perte en volume occasionnée par l'évaporation partielle du contenu en eau des gels d'agarose conduit à augmenter la concentration en microbilles, donc le coefficient de diffusion. Ceci est cohérent avec le fait que l'épaisseur du milieu supérieur estimée à partir de la profondeur de la rupture de pentes de la figure II.28 est seulement de 80 μm et non de 100 μm .

Malgré la variabilité spatiale très importante des valeurs mesurées du coefficient de diffusion de chacun des deux gels (environ 15% de variation relative pour le gel supérieur et presque 25% pour le gel inférieur), notre méthode permet de distinguer sans difficulté les deux couches de l'échantillon sur la base de leur coefficient de diffusion moyenné spatialement (tableau II.11).

Par ailleurs, les valeurs de g pour les deux portions de gels sont en bon accord avec celles mesurées sur les gels étudiés séparément (tableau II.10). Dans son domaine d'applicabilité en termes d'épaisseur des couches (profondeur d'imagerie) et de valeurs du coefficient de diffusion (nécessité de générer un signal de fluorescence suffisant), notre méthode est donc à même d'être mise en œuvre sur des milieux multi-couches.

Juxtaposition de gels diffusants

Nous avons aussi cherché à savoir si notre méthode pouvait discerner deux gels connexes latéralement, ce qui offrirait des perspectives en termes d'imagerie du coefficient de diffusion sur des échantillons structurés.

L'image du haut de la figure II.29 montre un échantillon de ce type. Le gel "de gauche" contient des microbilles de $0,54 \mu\text{m}$ de diamètre et celui "de droite" des microbilles de $4,52 \mu\text{m}$. Les deux gels ont été réalisés séparément dans des capillaires de $500 \mu\text{m}$ d'épaisseur interne, qui ont été brisés avec précaution pour extraire les gels solidifiés. Ces gels ont été déposés l'un à côté de l'autre sur une lamelle couvre-objet, dans un joint torique en caoutchouc (épaisseur d'environ 2 mm). Le tout a été retourné sur une lame de microscope.

L'image de fluorescence excitée à 2 photons en haut de la figure II.29 (taille $50 \times 50 \mu\text{m}^2$, définition de 2048×2048 pixels², objectif 20X ($NA=0,9$)) fait partie d'une pile de 60 images acquises en fonction de la profondeur z_0 , jusqu'à $300 \mu\text{m}$ avec un pas de $5 \mu\text{m}$. Chaque image est fragmentée en 64×64 zones couvrant chacune une surface de 32×32 pixels², soit 4096 aires en tout. Le coefficient de diffusion associé à chacune des aires est alors déterminé à partir du rapport des intensités de fluorescence $F_{conf}^{coll}/F_{NDS}^{coll}$. Les aires pour lesquelles le coefficient de régression linéaire R^2 est inférieur à 0,9 sont automatiquement exclues lors de la reconstruction de l'image (14 aires sur les 4096). La carte du coefficient de diffusion apparent au

voisinage de l'interface entre les gels est ainsi reconstruite en niveaux de gris, avec la définition de la fragmentation (64×64), est présentée en bas de la figure II.29.

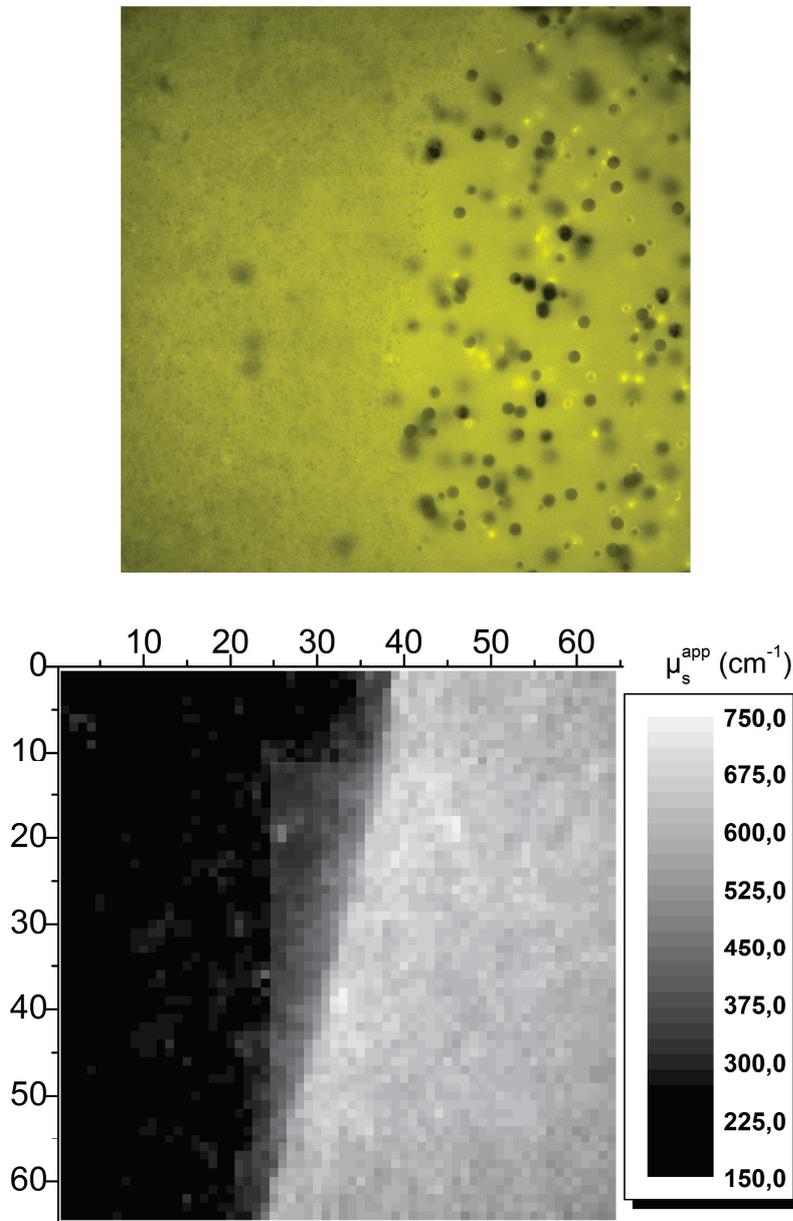


FIGURE II.29 – Imagerie du coefficient de diffusion pour deux gels juxtaposés. Le gel de gauche contient des microbilles de $0,54 \mu\text{m}$ de diamètre et possède un coefficient de diffusion "faible". Celui de droite contient des microbilles de $4,52 \mu\text{m}$ et son coefficient de diffusion est "fort". En haut : image en fluorescence excitée à deux photons de l'échantillon obtenue selon la voie NDS, à une profondeur d'imagerie de $30 \mu\text{m}$ (taille de l'image : $50 \times 50 \mu\text{m}^2$). En bas : carte des coefficients de diffusion apparents de la même zone après calcul de ces derniers sur des aires de $32 \times 32 \text{ pixels}^2$.

Le contraste en termes de coefficient de diffusion entre les deux milieux est très fort d'un milieu à l'autre, et il n'y a pas d'ambiguïté quant à la corrélation entre

l'image de fluorescence et la carte du coefficient de diffusion.

La dispersion des valeurs du coefficient de diffusion est représentée par l'histogramme du haut de la figure II.30. Cet histogramme donne la répartition des valeurs du coefficient μ_s^{app} correspondant aux 4082 aires exploitables. L'histogramme des valeurs du coefficient de régression linéaire R^2 associé est donné en bas de la figure II.30.

Cet échantillon a été imagé plusieurs jours après sa préparation, si bien que les coefficients de diffusion des gels lors de leur fabrication ne sont plus les mêmes le jour de l'expérience et demeurent inconnus. En revanche, nous savons que le gel possédant les microbilles de $4,52 \mu\text{m}$ est plus diffusant que l'autre gel. Deux pics distincts apparaissent dans l'histogramme du coefficient de diffusion : celui correspondant à de faibles valeurs de μ_s^{app} , associé au milieu de gauche (maximum à $\simeq 250 \text{ cm}^{-1}$), et celui présentant de fortes valeurs de μ_s^{app} (maximum à $\simeq 625 \text{ cm}^{-1}$), associé à celui de droite.

Les valeurs intermédiaires, présentes autour de l'interface, sont expliquées par le fait que les photons de fluorescence émis à grande profondeur au niveau de l'interface traversent les deux milieux, du fait de l'ouverture de l'objectif collecteur. On mesure alors une valeur du coefficient de diffusion intermédiaire entre celles des deux milieux, la valeur de μ_s obtenue dépendant de la proportion de photons de fluorescence ayant sondé chacun des milieux.

La largeur des pics de l'histogramme donne une idée de l'hétérogénéité des milieux. Néanmoins, la dispersion spatiale des valeurs de μ_s obtenues dépend directement de l'échantillonnage spatial de la mesure. En effet, plus l'aire de mesure diminue, plus cette mesure est sensible aux hétérogénéités spatiales du coefficient de diffusion. Notons enfin que nous avons uniquement représenté les coefficients de diffusion apparents car leur valeur importante interdit l'utilisation de la correction géométrique décrite en section II.5.3, inadaptée dans ce cas.

En résumé, nous avons montré la propension de notre méthode de microscopie 2PEF à mesurer le coefficient de diffusion de milieux présentant un saut axial ou latéral de μ_s . Nous avons profité de l'opportunité d'avoir accès à des échantillons biologiques pour tester notre méthode. Nous proposons à présent de l'appliquer à une culture de neurones sensoriels, cellules qui seront à la base de l'étude présentée au chapitre suivant, et à une coupe histologique épaisse de foie fibrosé (cf. chapitre IV).

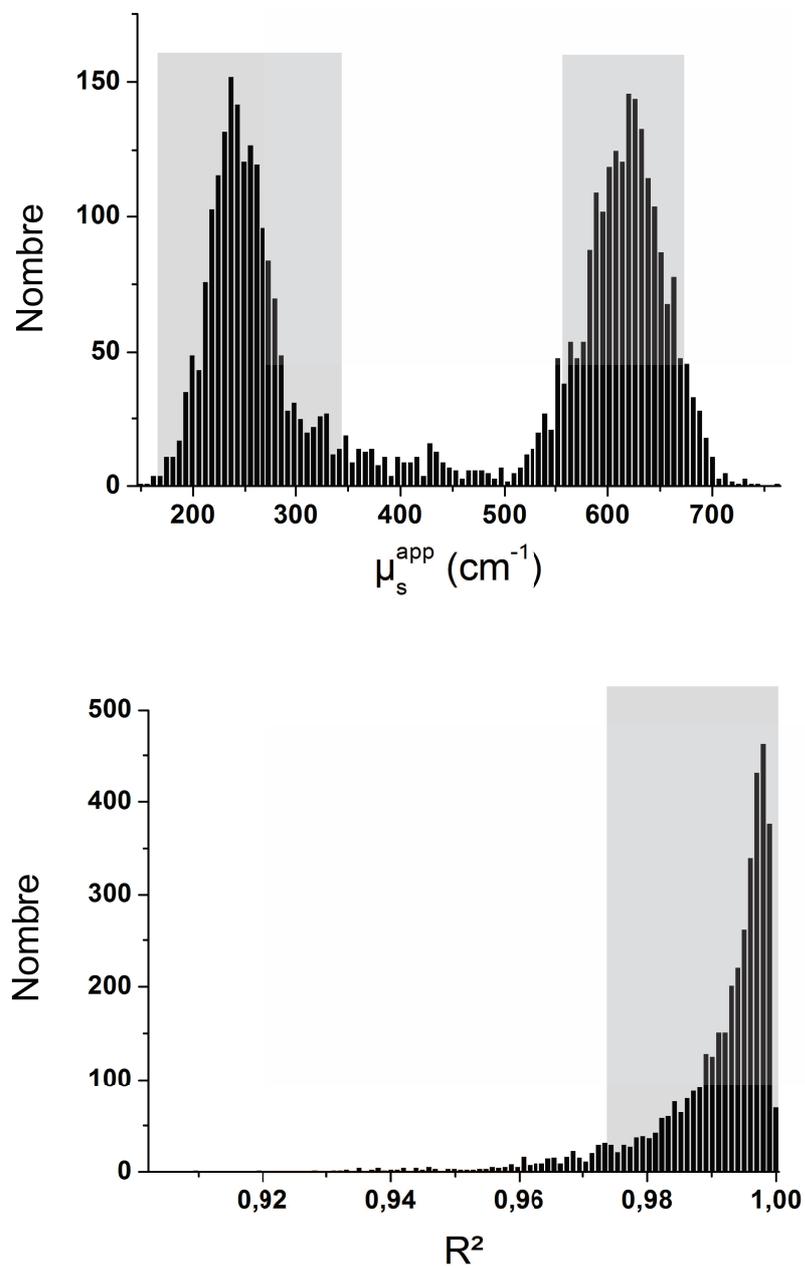


FIGURE II.30 – Histogrammes des μ_s^{app} (en haut) cartographiés à la figure II.29 et des coefficients de régression linéaire (en bas) associés. Les rectangles gris regroupent 90% des données dans chaque histogramme.

Mesure des paramètres de diffusion d'amas de neurones sensoriels

Les amas de neurones sont marqués au FM[®]1-43. Ce marqueur styrylique possède une section efficace d'absorption à deux photons suffisante pour la microscopie non-linéaire et a l'avantage d'être un très bon marqueur des cellules nerveuses (cf. chapitre III).

Les neurones sensoriels sont prélevés de ganglions de la racine dorsale (DRG) de rats nouveaux-nés et mis en culture au Laboratoire de Neurosciences de Brest (LNB, EA4685). En culture, ces neurones ont tendance à se regrouper sous formes d'amas capables de tisser un réseau de neurites entre-eux.

Un amas de taille suffisante a été localisé dans un premier temps en lumière blanche puis imagé à une longueur d'onde de 840 nm sur 120 μm tous les 5 μm à travers les voies NDS, DS et confocale (trou #4). Une image de cet amas est donnée à la figure II.31.

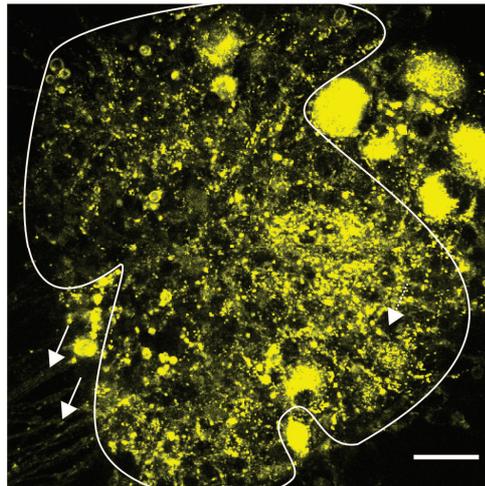


FIGURE II.31 – Image non descannée d'un amas de neurones sensoriels extraits de DRG de rats nouveaux-nés et marqués au FM[®]1-43. Le signal de 2PEF (en jaune) est généré à une longueur d'onde d'excitation de 840 nm. Les flèches pleines pointent des neurites (nerfs non différenciés), la flèche en pointillés indique une cellule nerveuse. Le trait blanc délimite la région d'intérêt dont l'intensité de fluorescence moyenne est mesurée. L'échelle est de 100 μm .

La représentation graphique des rapports des intensités ainsi collectées est donnée à la figure II.32.

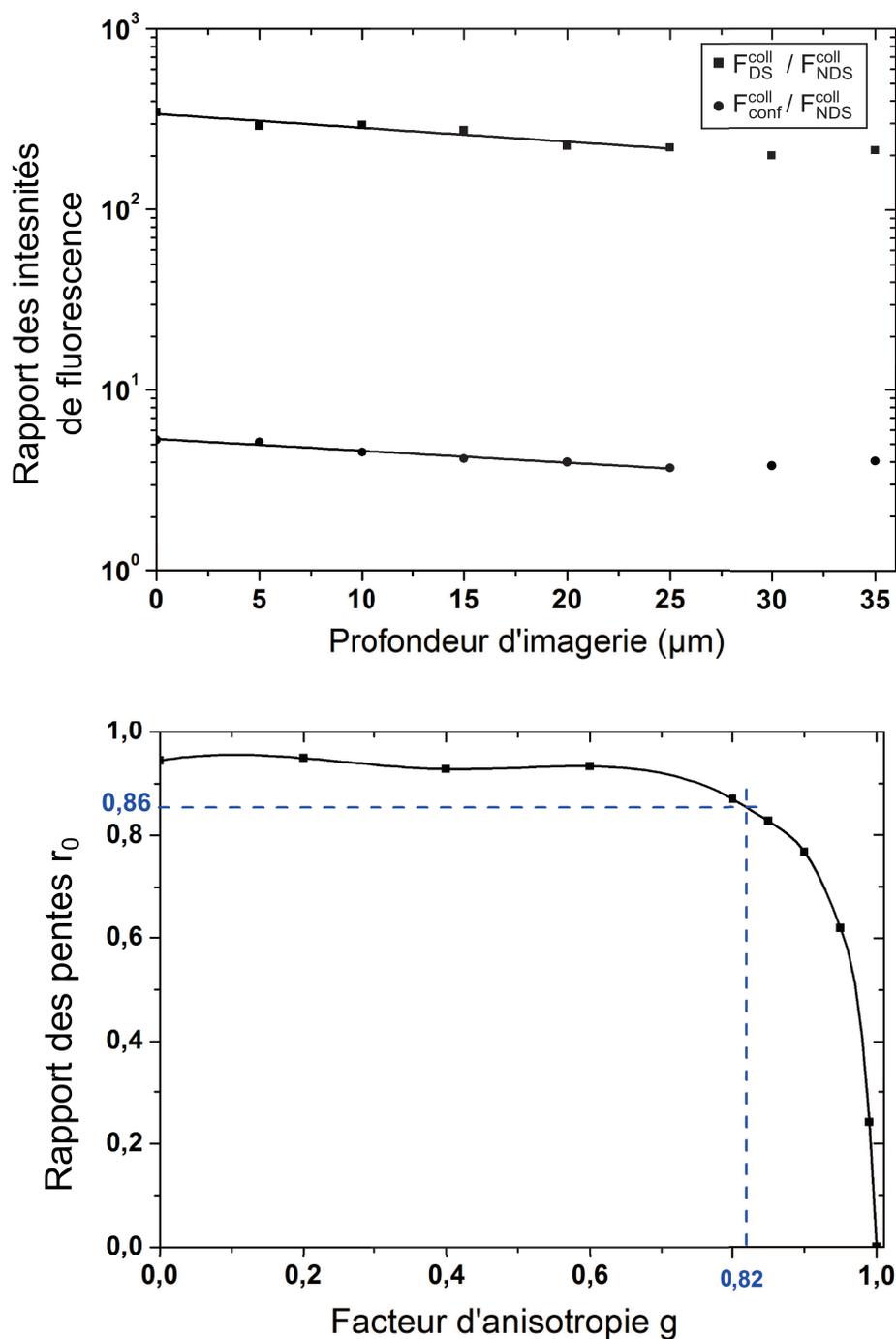


FIGURE II.32 – Représentation semi-logarithmique des rapports $F_{DS}^{coll}/F_{NDS}^{coll}$ et $F_{conf}^{coll}/F_{NDS}^{coll}$ (en haut). En bas : rapport r_0 des pentes obtenues pour chaque ouverture à l'aide de simulations Monte-Carlo (points expérimentaux) et interpolation des données (courbe en trait plein) associée. En ordonnées en bleu : rapport r_0 des pentes issus du graphique précédent. En abscisses en bleu : valeur de g déduite de la courbe d'interpolation.

Les coefficients de diffusion apparent et corrigé, la pente $p(\#5)$ et le facteur d'anisotropie g sont donnés dans le tableau II.12.

$\mu_s^{app}(\text{cm}^{-1})$	$\mu_s^{corr}(\text{cm}^{-1})$	pente $p(\#5)$	r_0	g	$\mu'_s(\text{cm}^{-1})$
175,4 $\pm 118,0$	154,3 $\pm 110,3$	149,8 $\pm 107,6$	0,86 $\in [0,04; 1,00]$	0,82 $\pm 0,18$	27,8 $\pm 20,1$

TABLE II.12 – Coefficients de diffusion apparent et corrigé tirés des pentes des rapports représentés en échelle logarithmique sur la figure II.32 et coefficient d'anisotropie g tiré du rapport des pentes $r_0 = p(\#5)/\mu_s^{app}$.

La variabilité spatiale des coefficients de diffusion ainsi obtenus (tableau II.12) est très importante ; elle est associée à l'hétérogénéité de l'intensité de fluorescence au sein de l'échantillon. Nous constatons cependant une bonne corrélation entre les valeurs moyennes de μ_s mesurées et celles de [Radhakrishnan et al., 2005] réalisées par spectroscopie de réflectance proche infrarouge. Ces auteurs ont effet mesuré que le coefficient de diffusion réduit $\mu'_s = \mu_s(1 - g)$ de la matière grise de la moelle épinière, milieu considéré comme similaire à celui des DRG, est de l'ordre de $30,0 \text{ cm}^{-1}$, à comparer avec la valeur de $27,8 \text{ cm}^{-1}$ que nous obtenons à partir de μ_s et g .

Ces résultats sont encourageant si l'on considère l'hétérogénéité spatiale de l'amas de neurones sensoriels. Nous avons alors tenté de réaliser une cartographie de μ_s d'un échantillon épais de foie fibrosé.

Mesure des paramètres de diffusion de coupes de foie fibrosé

La fibrose du foie est une maladie évolutive qui se caractérise par un dépôt de collagène fibrillaire. Plusieurs échelles semi-quantitatives existent pour décrire l'avancée de la maladie. Parmi elles, l'échelle METAVIR classe les patients dans 5 catégories suivant la gravité de la fibrose, de F0 (foie sain) à F4 (cirrhose). Le chapitre IV est consacré à la quantification de la fibrose hépatique par microscopie SHG.

Nous avons commencé par imager une coupe épaisse de foie à un stade de fibrose peu évolué (stade F2) pour comparer le coefficient de diffusion μ_s et le facteur d'anisotropie g mesurés par notre technique avec les valeurs de la littérature. La coupe de foie F2 a été imagée avec une définition de 256×256 pixels² sur une aire d'environ $150 \times 150 \mu\text{m}^2$ et une profondeur d'imagerie de $200 \mu\text{m}$ tous les

5 μm . Les différentes pentes utiles pour la détermination de μ_s et de g sont issues du graphique donné sur la figure II.33. Cette figure présente également la courbe donnant le rapport des pentes r_0 en fonction de la valeur de g , courbe tirée de nos simulations Monte-Carlo.

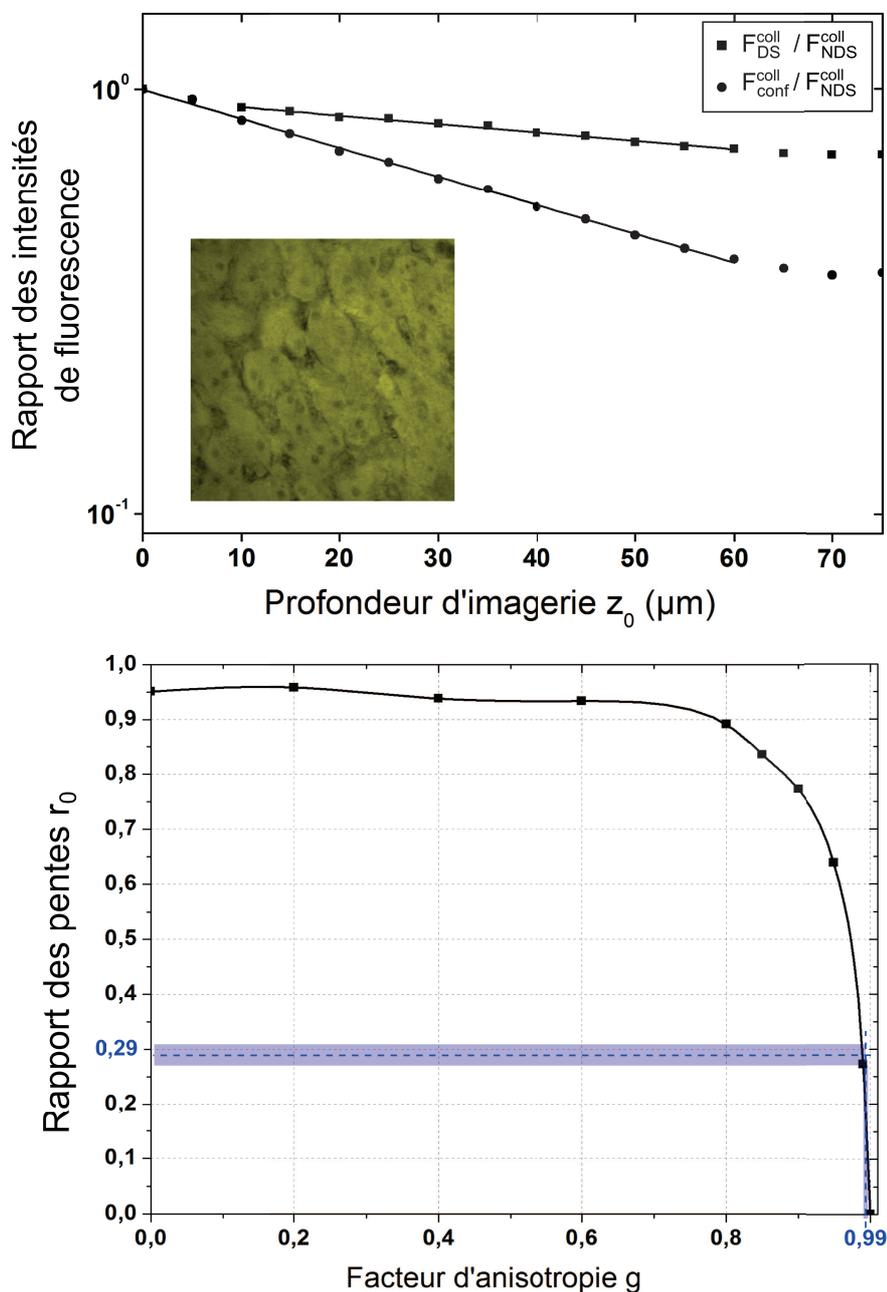


FIGURE II.33 – Représentation semi-logarithmique des rapports $F_{conf}^{coll} / F_{NDS}^{coll}$ et $F_{DS}^{coll} / F_{NDS}^{coll}$. Une image de la coupe de foie prise à 10 μm sous la surface de l'échantillon est donnée en insert. Le graphique du bas présente la courbe simulée de r_0 suivant g . Le rapport des pentes $p(\#5)$ et μ_s^{app} y figure en ordonnées. La bande bleue correspond à l'intervalle de variabilité de g , déterminée graphiquement à partir de celle de r_0 .

Le tableau II.13 récapitule les résultats tirés de ces représentations. Selon [Cheong

$\mu_s^{app}(\text{cm}^{-1})$	$\mu_s^{corr}(\text{cm}^{-1})$	pente p(#5)	r_0	g
$156,7 \pm 8,2$	$137,6 \pm 7,3$	$45,4 \pm 5,9$	$0,29 \pm 0,04$	$0,989 \pm 0,002$

TABLE II.13 – Coefficients de diffusion apparent μ_s^{app} et corrigé et pente p(#5) tirés des pentes des rapports représentés à la figure II.33. Le rapport $r_0 = p(\#5)/\mu_s^{app}$ et le facteur d'anisotropie g sont également donnés.

et al., 1990; Tuchin], le coefficient de diffusion μ_s du foie humain mesuré par [Marchesini et al., 1989] à une longueur d'onde de 515 nm, proche de l'autofluorescence des cellules du foie, est de 285 cm^{-1} , valeur près de deux fois supérieure aux nôtres. Cette différence est peut-être liée à la préparation de l'échantillon, puisque leur mesure se fait sur des sections cryogénéisées de foie, contrairement à notre échantillon qui est issu de la fixation d'un morceau de foie dans le paraformaldéhyde avant paraffinage et découpe. L'absence d'information sur la précision de leur mesure ne permet malheureusement pas d'aller plus loin dans la comparaison. Par ailleurs, [Andreola et al., 1988] ont montré que sur des échantillons de foie humain extraits *post-mortem*, le facteur d'anisotropie obtenu par goniophotométrie est d'environ 0,95, ce qui est en plutôt bon accord avec nos mesures.

Nous avons par ensuite cherché à reconstruire la carte du coefficient de diffusion d'une coupe histologique de foie fibrosé au stade F4, avec l'idée que la concentration en fibres de collagène dans cet échantillon devrait avoir une influence sur la valeur des paramètres de diffusion. Pour cela, nous avons imagé la coupe avec une définition de 2048×2048 pixels² sur $55 \mu\text{m}$ de profondeur par pas de $2,5 \mu\text{m}$, sur une zone présentant à la fois des hépatocytes et des fibres de collagène. La figure II.34 présente les résultats obtenus selon le même protocole que pour les gels juxtaposés (cf.section II.6.2). Cette figure montre que, malheureusement, sur les 4096 aires servant à réaliser la carte, seules 173 présentent un coefficient de diffusion μ_s^{app} significatif ($R^2 \geq 0,9$) du fait de la très forte hétérogénéité de l'échantillon en profondeur. En l'état, notre méthode ne permet donc pas d'exploiter l'imagerie du coefficient de diffusion dans un milieu aussi hétérogène qu'une coupe histologique de foie.

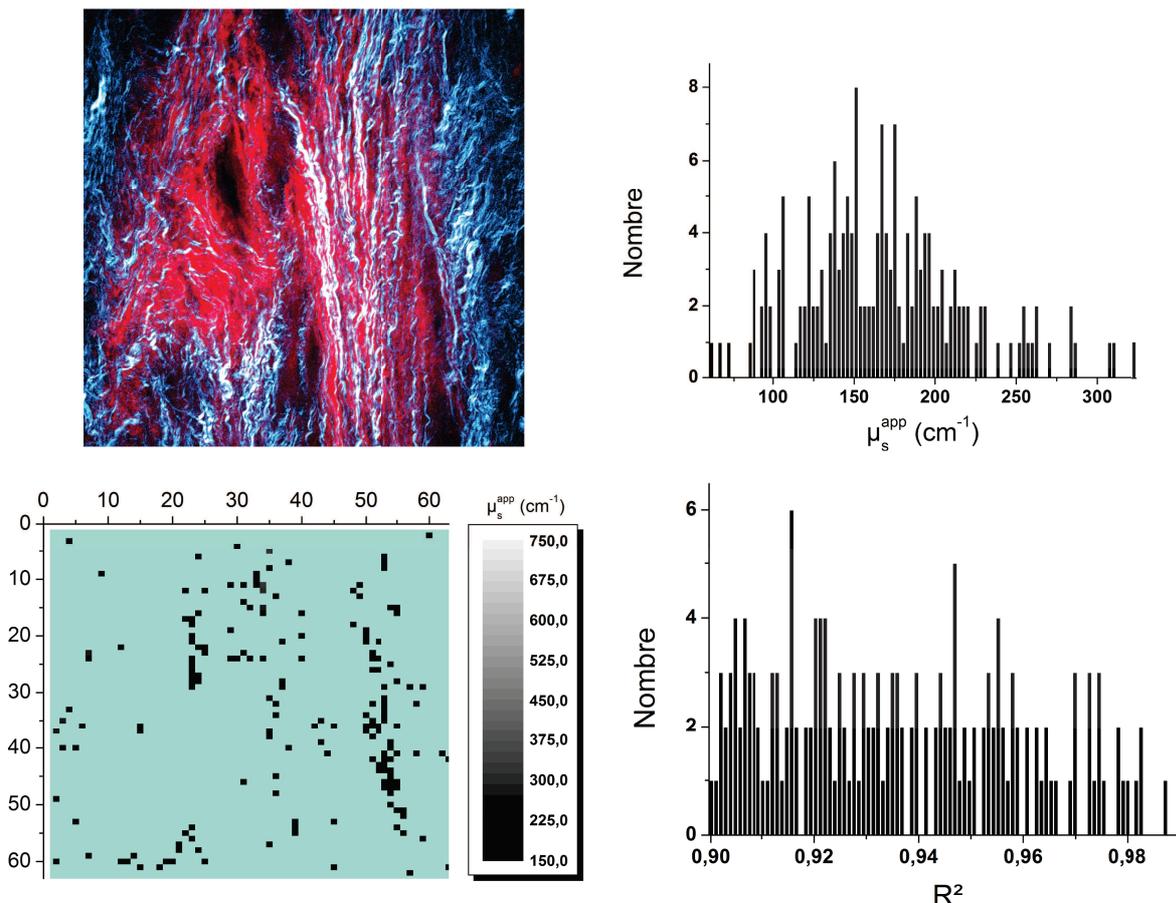


FIGURE II.34 – Imagerie du coefficient de diffusion d'un échantillon de foie fibrosé de stade F4. En haut à gauche : image de $235 \times 235 \mu\text{m}^2$ de l'échantillon obtenue par la voie descannée à une profondeur d'imagerie de $15 \mu\text{m}$. Le signal d'auto fluorescence 2PEF est visible en rouge et les nombreuses fibres de collagène en bleu. En bas à gauche : carte des coefficients de diffusion apparents de la même zone après calcul sur des aires de 32×32 pixels², soit une image finale de 64×64 aires. Les pixels bleus sont relatifs à des données non significatives (R^2 trop faible). Graphiques de droite : histogrammes des valeurs de μ_s et de R^2 sur les 173 aires analysées pour lesquelles $R^2 \geq 0,9$.

II.7 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons décrit une méthode originale basée sur une expérience de microscopie de fluorescence à deux photons pour mesurer les paramètres de diffusion de milieux turbides.

Après avoir rappelé les méthodes usuelles de mesure des paramètres optiques des milieux turbides, leurs contraintes et limitations, nous avons commencé par montrer, à l'aide de simulations Monte-Carlo, que le rapport des signaux de fluorescence détectés en mode confocal et NDS permettait d'obtenir un coefficient de diffusion

apparent qui est quasi-indépendant de l'absorption du milieu et du facteur d'anisotropie dans la limite où $g > 0.8$. En outre, un modèle analytique simple décrivant la collection de la lumière balistique en mode confocal par un objectif de microscope à travers un milieu diffusant nous a permis de remonter au coefficient de diffusion réel du milieu diffusant.

Nous avons ensuite montré que la comparaison des signaux mesurés en modes DS et confocal peut donner l'accès au facteur d'anisotropie du milieu via une courbe d'étalonnage obtenue par simulation Monte-Carlo.

Les expériences sur des milieux diffusants biomimétiques que nous avons fabriqués et des tissus biologiques ont démontré la pertinence de notre approche. La possibilité de discriminer des milieux aux propriétés de diffusion différentes, aussi bien axialement que latéralement, pourrait ouvrir la voie à de nouveaux critères de diagnostic biomédical non invasifs.

Bibliographie

A

- R. R. Anderson et J. A. Parrish. The optics of human skin. *The Journal of investigative dermatology*, 77(1) :13–19, July 1981.
- S. Andreola, A. Bertoni, R. Marchesini, et E. Melloni. Evaluation of optical characteristics of different human tissues in vitro (abstract). *Lasers in surgery and medicine*, 8(1) :2318–2324, 1988.

B

- C. Balas. Review of biomedical optical imaging—a powerful, non-invasive, non-ionizing technology for improving in vivo diagnosis. *Measurement science and technology*, 20(10) :104020, 2009.
- E. Beaurepaire et J. Mertz. Epifluorescence collection in two-photon microscopy. *Applied optics*, 41(25) :5376–5382, September 2002.
- BIPM. Guide pour l’expression de l’incertitude de mesure, iso-bipm. 2008.

C

- W.-F. Cheong, S. Prahl, et A. Welch. A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 26(12) :2166–2185, 1990.
- L. C. L. Chin, A. E. Worthington, W. M. Whelan, et I. A. Vitkin. Determination of the optical properties of turbid media using relative interstitial radiance measurements : Monte carlo study, experimental validation, and sensitivity analysis. *Journal of biomedical optics*, 12(6) :064027, December 2007.

D

M. Daimon et A. Masumura. Measurement of the refractive index of distilled water from the near-infrared region to the ultraviolet region. *Applied Optics*, 46(18) : 3811–3820, June 2007.

A. Diaspro. Confocal and two-photon microscopy : foundations, applications, and advances. 2002.

F

S. T. Flock, S. L. Jacques, B. C. Wilson, W. M. Star, et M. J. van Gemert. Optical properties of intralipid : a phantom medium for light propagation studies. *Lasers in Surgery and Medicine*, 12(5) :510–519, 1992.

G

C.-T. Germer, A. Roggan, J. P. Ritz, C. Isbert, D. Albrecht, G. Müller, et H. J. Buhr. Optical properties of native and coagulated human liver tissue and liver metastases in the near infrared range. *Lasers in Surgery and Medicine*, 23(4) : 194–203, 1998.

N. Ghosh, H. Patel, et P. Gupta. Depolarization of light in tissue phantoms - effect of a distribution in the size of scatterers. *Optics Express*, 11(18) :2198, September 2003.

T. Guilbert. Microscopie multiphotonique de protéines fibrillaires : application à l'étude de la fibrose hépatique. 2010.

H

L. C. Henyey et J. L. Greenstein. Diffuse radiation in the galaxy. *The Astrophysical Journal*, 93 :70, January 1941.

M. Hlavac. Measurement of tissue optical properties. 2013.

J

- S. L. Jacques. Optical properties of biological tissues : a review. *Physics in medicine and biology*, 58(11) :R37, 2013.
- S. L. Jacques. Light distributions from point, line and plane sources for photochemical reactions and fluorescence in turbid biological tissues. *Photochemistry and Photobiology*, 67(1) :23–32, 1998.
- S. L. Jacques, B. Wang, et R. Samatham. Reflectance confocal microscopy of optical phantoms. *Biomedical optics express*, 3(6) :1162, 2012.
- A. Jain, A. H. Yang, et D. Erickson. Gel-based optical waveguides with live cell encapsulation and integrated microfluidics. *Optics Letters*, 37(9) :1472–1474, May 2012.

K

- S. N. Kasarova, N. G. Sultanova, C. D. Ivanov, et I. D. Nikolov. Analysis of the dispersion of optical plastic materials. *Optical Materials*, 29(11) :1481–1490, July 2007.

L

- A. Leray, C. Odin, et Y. Le Grand. Out-of-focus fluorescence collection in two-photon microscopy of scattering media. *Optics Communications*, 281(24) :6139–6144, December 2008.
- I. Lux et L. Koblinger. Monte carlo particle transport methods : neutron and photon calculations. 1991.

M

- R. Marchesini, A. Bertoni, S. Andreola, E. Melloni, et A. E. Sichirollo. Extinction and absorption coefficients and scattering phase functions of human tissues in vitro. *Applied Optics*, 28(12) :2318–2324, June 1989.
- G. Marsaglia et T. A. Bray. A convenient method for generating normal variables. *SIAM Review*, 6(3) :260–264, July 1964.
- G. Mie. Articles on the optical characteristics of turbid tubes, especially colloidal metal solutions. *Ann. Phys*, 25(3) :377–445, 1908.

N

T. Nemoto, R. Kimura, K. Ito, A. Tachikawa, Y. Miyashita, M. Iino, et H. Kasai. Sequential-replenishment mechanism of exocytosis in pancreatic acini. *Nature Cell Biology*, 3(3) :253–258, March 2001.

P

S. A. Prahl. Light transport in tissue. 1988.

R

H. Radhakrishnan, A. Senapati, D. Kashyap, Y. B. Peng, et H. Liu. Light scattering from rat nervous system measured intraoperatively by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 10(5) :051405–051405–8, 2005.

J. W. S. B. Rayleigh. On the scattering of light by small particles. 1871.

T

V. Tuchin. Light scattering study of tissues. *Physics-Uspekhi*, 40(5) :495, 1997.

V. Tuchin. Tissue optics : light scattering methods and instruments for medical diagnosis.

V

H. Van de Hulst. Light scattering by small particles.

H. Van de Hulst. Multiple light scattering. vol. 2. 1980.

H. J. Van Staveren, C. J. Moes, J. Van Marle, S. A. Prahl, et M. J. Van Gemert. Light scattering in intralipid-10% in the wavelength range of 400-1100 nm. *Appl. Opt*, 30(31) :4507–4514, 1991.

W

L. Wang, S. L. Jacques, et L. Zheng. MCML—Monte carlo modeling of light transport in multi-layered tissues. *Computer methods and programs in biomedicine*, 47(2) : 131–146, July 1995.

L. V. Wang et H.-i. Wu. *Biomedical optics : principles and imaging*. 2007.

A. J. Welch et M. J. C. v. Gemert. *Optical-thermal response of laser-irradiated tissue*. January 2011.

X

C. Xu, R. M. Williams, W. Zipfel, et W. W. Webb. Multiphoton excitation cross-sections of molecular fluorophores. *Bioimaging*, 4(3) :198–207, 1996.

Y

G.-W. Yoon. *Absorption and scattering of laser light in biological media-mathematical modeling and methods for determining the optical properties*. 1988.

Chapitre III

Microscopie à deux photons de la peau ré-innervée

III.1 Introduction

Les interactions entre le système nerveux périphérique (SNP) et la peau font l'objet de recherches intensives, notamment pour améliorer les connaissances de pathologies complexes mêlant neurologie et dermatologie (exemple du psoriasis) mais aussi les processus de reconstruction de la peau après une blessure majeure. Dans ce dernier cas, les terminaisons nerveuses présentes dans la peau peuvent être endommagées. Les processus gouvernant la reconstruction de ces fibres nerveuses sont peu connus, les coupes histologiques souvent réalisées pour étudier la peau et ses structures ne permettant pas d'observer l'intégralité des fibres et de leurs ramifications.

Nous proposons dans ce chapitre d'utiliser la technique bimodale de microscopie 2PEF/SHG pour imager les fibres nerveuses qui se développent dans des explants de peau humaine à partir de cellules nerveuses sensorielles issues de ganglions rachidiens de rats nouveaux-nés. Le marquage de ces cellules nerveuses se doit d'être spécifique et favorable à une excitation à deux photons afin de pouvoir imager avec le meilleur contraste possible les fibres nerveuses parmi les structures de la peau. Dans la première partie de cette étude, nous déterminons le marquage le plus efficace en nous basant sur la mesure in situ des sections efficaces d'absorption à deux photons de quatre fluorophores d'intérêt et sur l'évaluation de leur efficacité à marquer les cellules nerveuses.

La molécule retenue est par la suite utilisée pour imager les amas de neurones

dans la peau et le développement des neurites dans la matrice extra-cellulaire en détectant en parallèle le signal 2PEF du fluorophore et SHG des fibres de collagène du derme. Nous montrons enfin que les profondeurs d'imagerie accessibles dans ce cas par la microscopie non linéaire permettent d'effectuer des reconstructions 3D des échantillons, révélant le développement des fibres nerveuses dans l'explant.

III.2 Peau et innervation cutanée

III.2.1 Physiologie de la peau

La peau, ou tégument (du latin *tegumentum*, couverture) est un organe sensoriel et la première barrière de protection des mammifères. C'est l'organe le plus lourd et le plus étendu de l'organisme, couvrant en moyenne 2 m² pour 4 kg [Mélissopoulos et al., 1998]. Le système tégumentaire est composé de nombreux types de cellules réparties en trois couches :

- **l'épiderme** est la couche superficielle (épaisseur inférieure au mm). Elle protège l'organisme contre les agresseurs externes grâce à la cohésion des cellules épithéliales et à la production d'une protéine fibreuse, la kératine, qui assure le lien entre les cellules. Cette couche n'est pas vascularisée : les nutriments nécessaires à son fonctionnement sont diffusés depuis le derme, la seconde couche de la peau à laquelle elle est attachée par la jonction dermo-épidermique.
- **le derme** est un tissu conjonctif, c'est-à-dire structuré par une matrice extra-cellulaire qui assure les fonctions de lien et de communication entre les cellules. Son épaisseur est variable suivant les régions de l'organisme mais peut atteindre 1 mm. Le derme est riche en cellules nommées fibroblastes, qui génèrent les protéines structurantes du tissu comme les fibres de collagène, et en protéines comme l'élastine. Associée à d'autres protéines, ces fibres confèrent à la peau sa souplesse et sa cohésion. On retrouve également dans cette couche les cellules de l'immunité et un nombre important de fibres nerveuses provenant de la racine dorsale de la moelle épinière.
- **l'hypoderme** est la couche la plus profonde et la plus épaisse de la peau (jusqu'à 3 cm au niveau de l'abdomen) et riche en adipocytes (amas de graisse).

La figure III.1 présente ces différentes couches ainsi que les structures importantes qui les constituent. Notons qu'à ces trois couches se rajoutent les phanères, annexes

riches en kératine (ongles (ou griffes) et poils), qui complètent le tégument pour former le système tégumentaire.

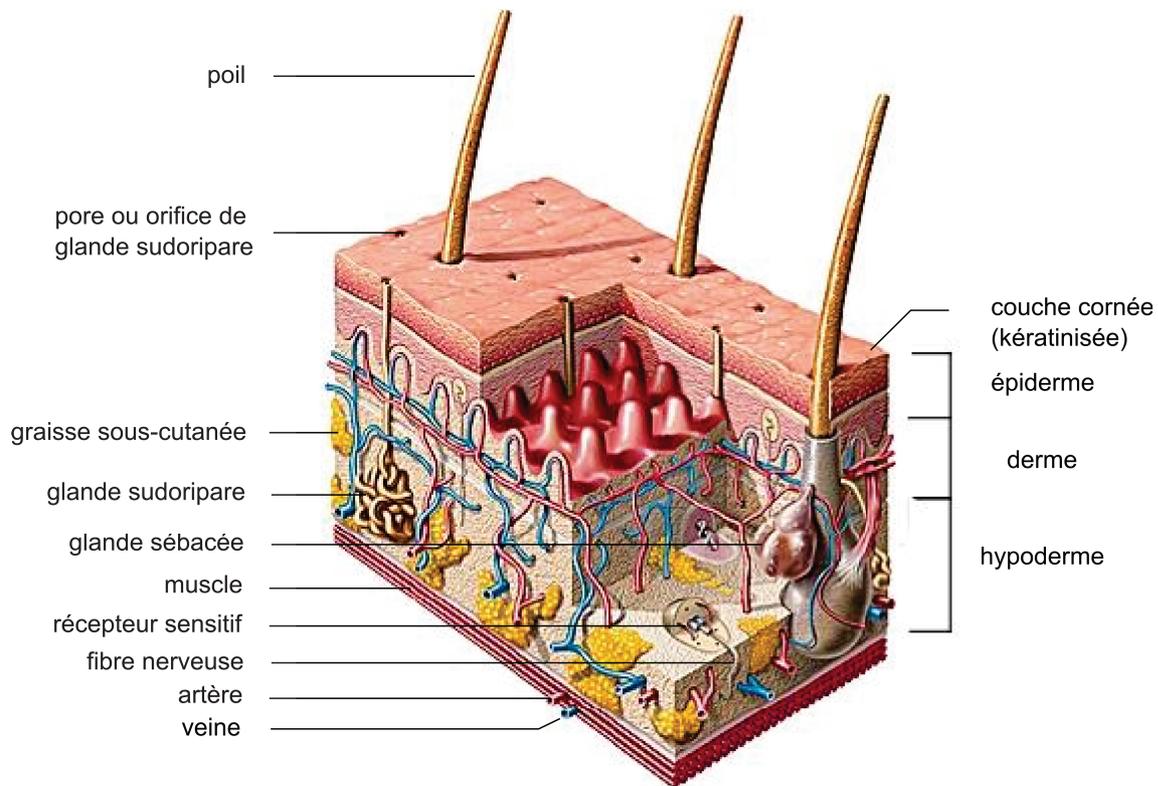


FIGURE III.1 – Structure de la peau humaine (extrait de l'encyclopédie Larousse).

L'épiderme

Quatre types cellulaires sont observables dans l'épiderme. Les kératinocytes sont les cellules les plus nombreuses ($\simeq 80\%$ de la population cellulaire) et fondent la barrière de protection de la peau. Leur répartition en couches stratifiées permet de distinguer l'épiderme en sous-couches, de la couche la plus superficielle (couche cornée) à la plus profonde (couche basale). Ces cellules sont les principales responsables du renouvellement de l'épiderme, par un jeu de prolifération/desquamation qui assure l'intégrité fonctionnelle de l'épiderme. On estime ainsi que l'épiderme humain met 30 à 45 jours pour se renouveler intégralement. Dans le cas de certaines maladies comme le psoriasis, ce temps diminue significativement (8 jours).

Les mélanocytes sont les cellules qui synthétisent la mélanine, molécule bien connue pour sa capacité à absorber les rayons UV du soleil délétères pour l'ADN des cellules plus profondes du corps. La mélanine est stockée dans des organites

spécifiques nommés mélanosomes. La voie de synthèse de la mélanine, l'activité des mélanosomes, leur nombre et leur nature sont autant de paramètres responsables de la couleur de la peau et des poils.

Les cellules de Langerhans appartiennent au système immunitaire. Renouvelée à partir de la moelle osseuse, elles migrent vers l'épiderme où elles ont un rôle de reconnaissance des antigènes. Elles sont capables de se déplacer au sein de la peau et de remonter aux ganglions lymphatiques pour stimuler la réponse immunitaire en cas d'agression.

Enfin, les cellules de Merkel sont capables de synthétiser des neuro-médiateurs et sont impliquées dans la fonction du tact, autrement dit le sens du toucher. Leurs prolongements cytoplasmiques s'insèrent entre les kératinocytes et enregistrent les moindres vibrations de l'épiderme pour les transmettre à des terminaisons nerveuses.

Le derme

Le derme est un tissu conjonctif dense qui constitue le support solide de la peau. Il assure le ravitaillement de l'épiderme grâce à son système vasculaire, mais renferme également des fibres nerveuses et des récepteurs sensoriels dont l'origine est décrite plus loin dans le texte. Les principales cellules constitutives du derme sont les fibroblastes, responsables de la synthèse et du maintien de la matrice extracellulaire (MEC). Elles synthétisent entre autres les fibres de collagène, d'élastine, la substance fondamentale (mélange de polymères de monosaccharides hydrosolubles) et les glycoprotéines de structure, et jouent un rôle prépondérant dans le processus de cicatrisation. Les autres cellules présentes dans le derme sont impliquées dans la réponse immunitaire (leucocytes, mastocytes, macrophages...).

Remarquons que le collagène fibrillaire du derme (types I et III majoritairement) est capable de générer un effet de second harmonique sans nécessiter de marquage exogène, comme expliqué dans l'introduction générale. Par ailleurs, les filaments d'élastine présentent une section efficace d'absorption à deux photons non négligeable, et peuvent donc être observées par microscopie 2PEF sans marquage préalable [So et al., 1998].

L'intégralité de ces structures échange en permanence des informations entre elles et avec le reste de l'organisme. Cet échange d'informations est possible grâce notamment à la présence de structures nerveuses dans la peau.

III.2.2 Innervation cutanée

Fibres nerveuses et système nerveux périphérique

Le système nerveux des êtres vivants évolués est divisé en deux grandes parties : le Système Nerveux Central (SNC) et le Système Nerveux Périphérique (SNP) [Bouchet et Cuilleret, 1982]. Le SNC est constitué de l'encéphale, dans la boîte crânienne et de la moelle épinière, ceinte par les vertèbres. Le SNP est constitué quant à lui des nerfs qui partent (efférents) ou qui arrivent (afférents) à la moelle épinière, innervant la quasi-totalité de notre organisme.

Le SNC et le SNP possèdent comme structure fondamentale la cellule nerveuse, ou neurone. Ces cellules sont composées d'un noyau, une membrane plasmique, un cytoplasme et divers organites, comme la plupart des cellules de l'organisme. Cependant, elles ont la particularité de pouvoir déployer leur corps cellulaire à travers les tissus qu'elles occupent pour former les dendrites et les axones, qui se différencient principalement par leur portée (contact de proximité ou contact éloigné, respectivement). Lorsque ces prolongements ne sont pas différenciés entre dendrite et axone, ce qui est le cas chez les neurones immatures, ils sont appelés **neurites**. La figure III.2 présente l'aspect général d'un neurone et ses structures de base [Brewer et al., 2010].

Chaque cellule est connectée par une ou plusieurs fibres nerveuses à d'autres cellules, la connexion s'effectuant soit le long de la fibre (connexion *en passant*), soit à ses extrémités. La structure de connexions fondamentale reste dans les deux cas **la synapse**. Ce genre de connexion peut également se trouver entre neurones et cellules du muscle, cellules de Merkel et même des cellules de la peau [Hosoi et al., 1993; Misery, 1997]. Le codage de l'information dépend du type de molécule chimique en action (neurotransmetteur), sa concentration et les types des cellules émettrice et réceptrice. Le relargage de neurotransmetteurs par les cellules nerveuses a été étudié de manière intensive ; l'utilisation de la microscopie 2PEF a notamment permis de quantifier la concentration en neurotransmetteurs avant et après activation des synapses [Axmacher et al., 2004; Winterer et al., 2006].

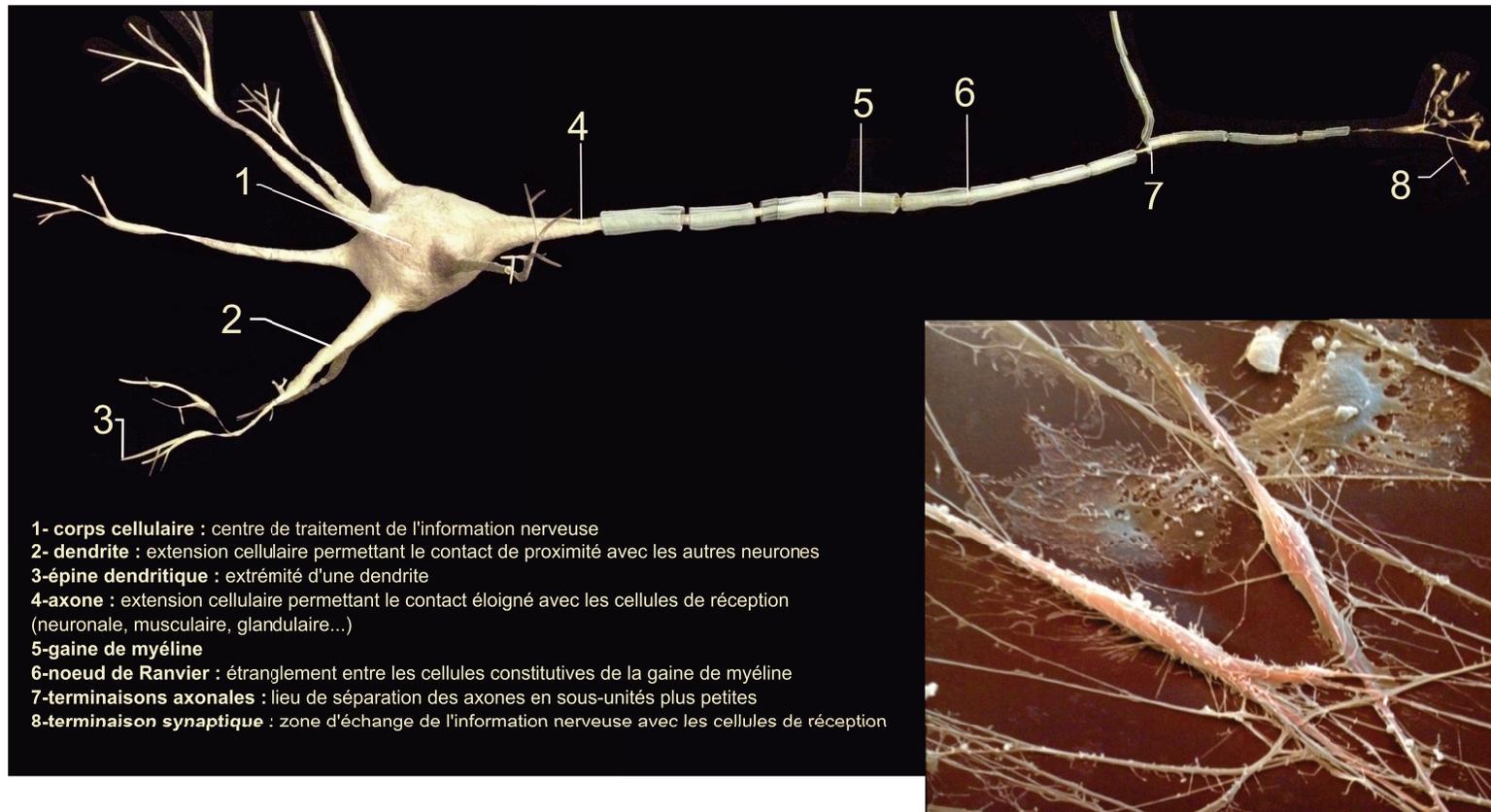


FIGURE III.2 – Structure d'un neurone. Les ramifications partant du corps cellulaire permettent la communication avec des cellules nerveuses proches (dendrites) ou des cellules cibles (nerveuses, musculaires...) éloignées (axones). En bas à droite : deux neurones présents dans les ganglions spinaux de la moelle épinière, observés au microscope électronique à balayage [Brewer et al., 2010].

Le SNP comprend deux groupes de nerfs qui diffèrent par leurs structures, leurs distributions et leurs fonctions [Lazorthes, 1981] : les **nerfs cérébro-spinaux**, responsables de la motricité (fibres motrices) et de la sensibilité (fibres sensibles). Les nerfs rachidiens en sont une sous-partie ; ce sont eux qui, issus de la moelle épinière, viennent innover la peau. D'un autre côté, les **nerfs sympathiques** régissent les fonctions du monde intérieur de l'organisme, notamment les viscères.

Les fibres sensibles présentent une fonction à la fois afférente et efférente. Il a en effet été montré qu'elles sécrètent des neuromédiateurs également en périphérie [Westerman et al., 1992]. Il est par ailleurs essentiel de noter que lorsque la fibre nerveuse est sectionnée, la partie attachée au corps cellulaire est maintenue, tandis que l'autre partie se dégrade. La fibre se reconstitue par la suite grâce à l'action du corps cellulaire et au rôle "de guidage" (trophique) de cellules comme les cellules de Merkel dans la peau. L'interaction de ces fibres avec la peau est discutée dans la section suivante.

Innervation cutanée

Comme expliqué précédemment, la peau est un organe sensitif. La peau et le système nerveux ont d'ailleurs des origines communes : ces deux structures proviennent de l'ectoblaste, un des trois feuillet embryonnaires avec l'endoblaste (à l'origine des appareils digestifs et respiratoire) et le mésoblaste (évoluant en os, muscle et cellules sanguines) [Saxod et al., 1996]. Le développement futur de l'embryon entraîne la séparation de ces deux systèmes, mais ils restent en connexion permanente à travers les fibres nerveuses déployées par les neurones depuis la moelle épinière. Il est important de remarquer que seuls les axones sont présents dans la peau, les neurones étant situés dans les ganglions spinaux, situés le long de la moelle épinière, dans la colonne vertébrale.

Pour illustrer le lien profond entre systèmes nerveux et cutané, regardons de plus près une des cellules de la peau, la cellule de Merkel. Le processus d'innervation de la peau est appuyé par les cellules de Merkel et stimulé entre autres par le facteur de croissance nerveuse (NGF, pour *Nerve Growth Factor*). Décrites en 1875 par Friedrich Merkel [Merkel, 1875], elles possèdent des marqueurs membranaires propres aux kératinocytes, mais aussi des marqueurs et comportements électriques spécifiques aux cellules nerveuses, ainsi que la capacité de produire de la NGF et des neuromédiateurs. La présence de granules neuro-sécrétoires pourtant réservés aux neurones et aux cellules neuro-endocrines rapproche d'autant plus ce type de cellule,

pourtant présente dans la peau, des cellules du système nerveux. Leur origine est par ailleurs toujours sujet à débat [Halata et al., 2003; Boulais et Misery, 2007].

Les cellules de Merkel sont en contact avec les fibres nerveuses, possiblement *via* des synapses de nature chimique. Ces fibres constituent un réseau nerveux très dense : sur un cm^2 de peau se concentrent environ 12 nerfs. Deux types de fibres nerveuses se rencontrent dans la peau : les fibres nerveuses autonomes (encore appelées neurovégétatives) et les fibres nerveuses sensibles. Les premières sont issues des chaînes sympathiques paravertébrales et sont en contact avec le réseau vasculaire, les muscles arrecteurs des poils et les glandes sudoripares. Les axones sensitifs sont quant à eux issus des ganglions sensitifs rachidiens (ou ganglions spinaux, de la moelle épinière) ou crâniens. Le ganglion spinal sera par la suite référencé par son acronyme anglais DRG (Dorsal Root Ganglion). Chaque DRG innerve une zone spécifique de la peau, nommée dermatome. L'ensemble de ses zones est représentée à la figure III.3. Une coupe transversale de la moelle spinale et la localisation des ganglions par rapport à celle-ci est présentée sur la figure III.4.

Les neurones présents dans le ganglion spinal servent de relais d'information entre les neurones de la substance grise de la moelle et les fibres nerveuses déployées notamment vers la peau. Ces fibres se retrouvent ensuite sous différentes formes au sein du tégument [Mélissopoulos et al., 1998; Misery, 2000]. La forme la plus répandue est la terminaison nerveuse libre, dont le diamètre varie entre $1\ \mu\text{m}$ et $5\ \mu\text{m}$ suivant le type de fibre. Ces fibres sont très nombreuses dans le derme, où elles se rencontrent soit seules, soit au niveau des glandes sébacées et des poils. Dans l'épiderme, les terminaisons nerveuses libres sont fortement associées aux cellules de Merkel, mais peuvent également former des connexions avec les cellules de Langerhans et les kératinocytes. Des études en microscopie confocale et en microscopie électronique par transmission ont même montré un épaissement des membranes plasmiques des mélanocytes au niveau de ces fibres, ressemblant aux membranes post-synaptiques dans les tissus nerveux [Hara et al., 1996].

Comprendre en quoi l'innervation de la peau a un impact notable sur sa constitution et son aspect est déterminant dans le cas de certaines pathologies. De manière générale, la peau est le premier organe qui informe un patient et son entourage de son état de santé [Misery, 2000]. Ainsi un état migraineux entraîne un pâlissement et une sudation qui sont des signes d'un état de santé altéré, associé bien sûr à des céphalées plus ou moins douloureuses. De nombreuses maladies mêlent des aspects dermatologiques à des atteintes neurologiques et/ou psychologiques parfois

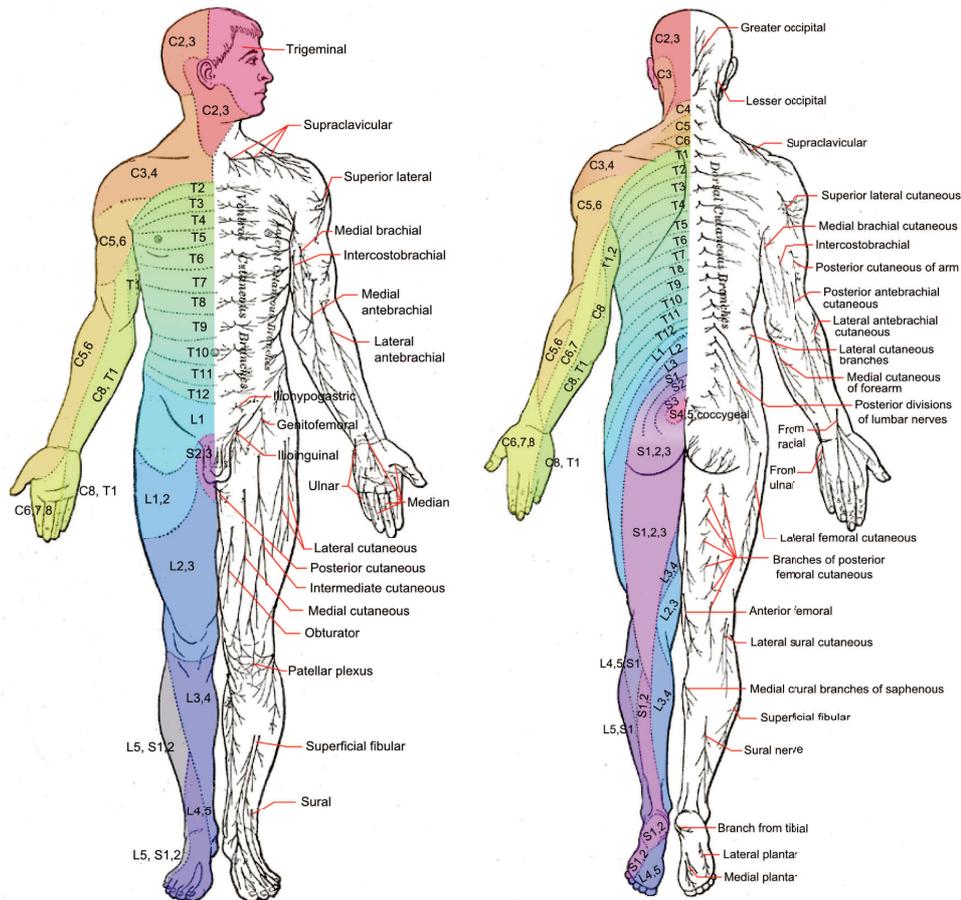


FIGURE III.3 – Dermatomes du corps humain. Chaque dermatome correspond à une région cutanée bien délimitée dont l'innervation est effectuée depuis un ganglion spinal situé le long de la colonne vertébrale. Les codes LETTRE-chiffre associent chaque nerf rachidien à une position dans la colonne vertébrale : le long des vertèbres cervicales (C), du tronc (T), lombaires (L) et sacrées (S). 31 paires de ganglions rachidiens sont ainsi dénombrées (figure extraite du site internet http://en.wikipedia.org/wiki/Dermatome_%28anatomy%29).

importantes. Sans entrer dans les détails, il est possible de classer sommairement les affections de la peau (dermatoses) en trois catégories [Koblenzer, 2005] : celles d'origine purement psychologiques (comme la pathomimie), celles où la maladie dermatologique est bel et bien déclarée mais présente une origine psychologique et celles où l'origine génétique ou environnementale de la dermatose est avérée, avec des facteurs psychologiques aggravant mais pas à l'origine de la maladie. Ce classement est simplifié et très réducteur, car beaucoup de pathologies ne rentrent pas aussi bien dans ces catégories. Le dernier des trois groupes cités précédemment regroupe souvent des maladies d'origine très complexes, avec comme cause avérée l'immunité ; c'est le cas de maladies courantes comme le psoriasis, l'acné ou l'herpès récurrent.

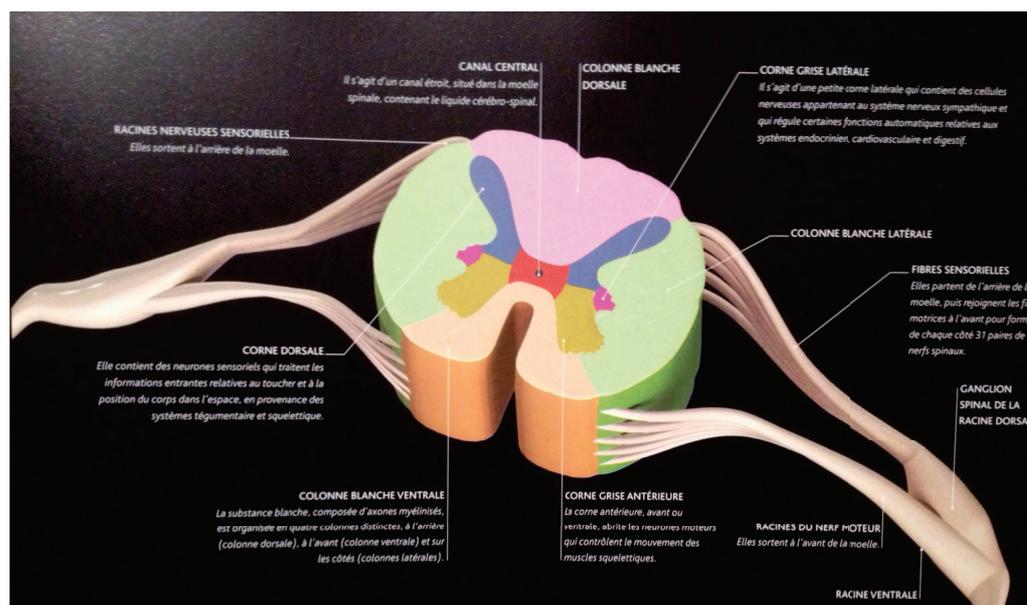


FIGURE III.4 – Coupe transversale de la moelle épinière [Brewer et al., 2010].

La réciproque est bien entendu vraie : la peau influence également le psychisme, notamment dans les sociétés où l'apparence physique est un facteur essentiel d'intégration. Les échanges entre la peau et le système nerveux constituent ainsi un facteur déterminant dans la compréhension et le traitement de certaines maladies.

Dans ce contexte, il est donc dans un premier temps indispensable de pouvoir imager le système nerveux de la peau à la fois dans sa globalité (en profondeur dans le derme) et avec une résolution spatiale et un contraste suffisants. Malheureusement, la microscopie confocale se heurte à une profondeur d'imagerie trop limitée dans la peau, dont le coefficient de diffusion μ_s vaut environ 200 cm^{-1} à 633 nm [Cheong et al., 1990](cf. chapitre I). D'autre part, même si la microscopie à deux photons semble répondre au cahier des charges, l'utilisation de cette technique pour l'imagerie du système nerveux de la peau n'a fait l'objet d'aucune étude à notre connaissance. En outre, les informations sur les marqueurs neuronaux de la peau, fluorescents sous excitation à deux photons, sont loin d'être exhaustives, notamment en ce qui concerne leur section efficace d'absorption en conditions réelles.

Le travail sur la peau réalisé au cours de cette thèse a donc eu pour vocation à la fois de quantifier la réponse en fluorescence de différents marqueurs déjà connus en microscopie linéaire et de montrer la faisabilité d'une imagerie non linéaire des neurones au sein d'explants ré-innervé. Nous présentons dans la section suivante quelques travaux démontrant l'utilité de la microscopie non linéaire pour l'imagerie

de la peau. Les biomolécules à l'origine des signaux 2PEF et SHG naturellement observés dans cet organe et que nous sommes susceptibles de rencontrer dans cette étude sont également décrites.

III.2.3 Microscopie à deux photons de la peau

La microscopie non linéaire de la peau s'est fortement développée au cours des dernières années pour plusieurs raisons. La peau étant l'un des organes les plus facilement accessibles du corps humain, elle se prête bien aux observations *in situ*. Le développement au début des années 2000 du DermaInspect® (JenLab GmbH, Jena, Allemagne) en est la preuve [Koenig et Riemann, 2003b].

Cet appareil réalise des biopsies optiques de la peau par balayage d'une source laser proche infrarouge femtoseconde accordable en longueurs d'onde en exploitant l'émission 2PEF endogène (autofluorescence) de protéines comme la NAD(P)H, les flavines, les porphyrines, l'élastine et la mélanine. Par ailleurs, la matrice extracellulaire peut être imagée en détectant le signal SHG propre aux fibres de collagène. Le DermaInspect® se présente sous la forme d'un poste de travail avec la source laser pouvant être allumée ou éteinte simplement, un module de balayage renfermant des miroirs galvanométriques, un module de détection constitué de PMTs et un ensemble de logiciels développés par la société JenLab GmbH elle-même. En plus des contrastes 2PEF et SHG, le DermaInspect® propose un ensemble d'options pour réaliser entre autres des images CARS et FLIM (Fluorescence Lifetime IMaging) de la peau *in situ*.

Les applications de ce système sont multiples et ont ouvert la porte à de nombreuses études dermatologiques par microscopie non linéaire, aussi bien dans le domaine médical (détection de mélanomes [Paoli et al., 2009], désordres dermatologiques, traçage de médicaments [Tsai et al., 2009b]) qu'en cosmétique (vieillessement de la peau [Puschmann et al., 2012], impact de produits cosmétiques [Bazin et al., 2010]). Le tableau III.1 présente un ensemble non exhaustif d'applications de la microscopie non linéaire à l'étude de la peau.

L'étude des signaux de fluorescence endogènes (autofluorescence) et de génération de second harmonique observés dans la peau a permis de découvrir plusieurs origines à ces signaux. La NAD(P)H, une molécule essentielle de l'activité cellulaire, est l'une des principales sources d'émission 2PEF aux basses longueurs d'onde d'excitation ($\simeq 730$ nm) tandis que le signal 2PEF des flavines devient prédominant vers

Microscopie non linéaire de la peau	
Informations extraites	Références
<i>Études des cellules de la peau</i>	
Spectres d'émission et d'absorption de la mélanine	[Hoffmann et al., 2001]
Temps de vie de fluorescence de la mélanine	[Teuchner et al., 2000]
Autofluorescence de la peau à 730 nm et 960 nm <i>in vivo</i>	[Masters et al., 1997a]
Imagerie de la NAD(P)H (200 μ m sous l'épiderme)	
Protéines à l'origine de l'autofluorescence : tryptophane, NAD(P)H, élastine	[Laiho et al., 2005]
2PEF des molécules endogènes	[Lin et al., 2007]
CARS pour l'étude des molécules constituant la peau sans marquage exogène	[Evans et al., 2005]
Quantification des radicaux d'oxygène formés sous UV	[Hanson et Clegg, 2002]
Étude de l'altération des structures des couches lipidiques au niveau moléculaire <i>in vivo</i>	[Bagatolli et Gratton, 2000] [Sun et al., 2006] [König et al., 2006]
Imagerie des cellules de Langerhans	[Mulholland et al., 2006; Roediger et al., 2008]
<i>Imagerie de la matrice extracellulaire</i>	
Imageries 2PEF et SHG des fibres d'élastine et de collagène	[Koenig et Riemann, 2003a; Tsai et al., 2009a]
Étude des composants de la MEC par SHG et des cellules de la peau par marquage spécifique (2PEF)	[Yeh et al., 2004]
SHG du collagène et THG des jonctions de la peau	[Chu et al., 2004]
Étude du photovieillissement UV de la peau par SAAID (2PEF et SHG)	[Pelet et al., 2004] [Koehler et al., 2006]
Etude de la modification du réseau de collagène après un traitement laser de la peau	[Tsai et al., 2009a]
<i>Applications diagnostique et thérapeutique</i>	
Étude de la réparation cicatricielle par SHG du collagène	[Navarro et al., 2004]
Compréhension des mécanismes de la thérapie photodynamique	[Chiu et al., 2005]
Étude des traitements transcutanés	[Grewal et al., 2000; Lee et al., 2008]
Mesure de la diffusion des traitements curatifs à travers la peau	[Yu et al., 2001]
Étude de la pénétration de nanoparticules (QDs) dans le derme (2PEF et SHG)	[Stracke et al., 2006; Kuo et al., 2009]
Mesure du gradient de pH du stratum corneum par sondes sensibles au pH (2PEF)	[Hanson et al., 2002]
Détection du carcinome basocellulaire	[Lin et al., 2006]
Détection du cancer de la peau par autofluorescence de la NAD(P)H	[Paoli et al., 2007] [Dimitrow et al., 2009]

TABLE III.1 – Exemples de travaux de recherches menés sur l'imagerie de la peau par microscopie de fluorescence excitée à deux photons.

800 nm [Zoumi et al., 2002]. L'origine du signal de second harmonique est quant à elle détaillée dans la section suivante.

Origine du signal SHG de la peau : le collagène

Parmi les nombreuses molécules capables d'émettre un signal de second harmonique, très peu appartiennent au domaine animal. Seules trois familles de molécules sont recensées pour émettre un tel signal : le collagène, le complexe actine-myosine et les micro-tubules. Nous ne considérons dans ce travail que l'émission de SHG provenant du collagène car cette molécule génère la plus grande partie du signal de second harmonique dans la peau [Hanson et Bardeen, 2009]. Les émissions SHG des deux autres molécules peuvent cependant être très importantes dans d'autres tissus [Odin et al., 2008; Kwan et al., 2008]. L'étude du signal SHG du collagène de la peau permet notamment de distinguer les matrices extracellulaires (MEC) saine et pathologique, dans le but d'instaurer un critère de diagnostic de certaines pathologies (cancers de la peau, par exemple). D'autres études portant sur le vieillissement de la peau par les rayons UV ou sur la qualité de la régénération des tissus cutanés après des brûlures profondes utilisent également la SHG comme moyen d'investigation (cf. tableau III.1).

Le collagène est une protéine fibreuse rencontrée dans de nombreux tissus conjonctifs. C'est la protéine la plus abondante du corps humain, pour lequel elle représente environ 25% de la masse totale de protéines. Environ 75% de la masse sèche de la peau en est constituée [Shoulders et Raines, 2009]. De nombreux types de collagène existent, dont le rôle structurant dépend de la région du corps que ces molécules occupent. Ce sont des protéines structurantes, essentielles dans le maintien des tissus du corps [Di Lullo et al., 2002]. Nous distinguons les collagènes fibrillaires, constituant les tendons, les os, la peau etc. et non fibrillaires, impliqués dans l'architecture tridimensionnelle des fibres collagéniques. Sur les 29 sortes de collagène décrites à ce jour, seules quelques unes sont capables d'émettre un signal de second harmonique.

Les fibres de collagène de type I sont les plus abondantes. Elles sont présentes dans les os, les tendons, les ligaments, les parois vasculaires, la cornée, la peau. L'étude de la structure de ce type de collagène a commencé en 1940 pour aboutir vers 1955 avec la structure en triple hélice désormais admise [Rich et Crick, 1955]. L'étude de cette structure et des voies de synthèse pour produire un collagène artificiel est un sujet d'actualité, notamment en ce qui concerne la cicatrisation et l'apport des collagènes de synthèse en soutien de ce procédé [Wang et al., 2008].

Le derme est un exemple de tissu riche en fibres de collagène de type I et III majoritairement, types fibrillaires donc susceptibles de générer un signal de second harmonique [Masters et al., 1997b; Pena et al., 2005]. La voie de synthèse du collagène commence par la fabrication du procollagène constitué de trois chaînes polypeptidiques α qui forment une structure hélicoïdale de quelques nanomètres de diamètre. Le domaine hélicoïdal de ces chaînes α présente une glycine *Gly* tous les trois acides aminés, résultant en une structure *XaaYaaGly* (*Xaa* et *Yaa* deux autres acides aminés) se répétant n fois et essentielle pour la conformation en hélice gauche de chaque chaîne.

Le clivage des terminaisons de ces molécules par une enzyme spécifique résulte en la fabrication du tropocollagène (équivalent au collagène). Cette molécule présente une conformation non centrosymétrique, donc susceptible de générer un signal de second harmonique. Les nombreuses fibres de tropocollagène s'alignent pour former des fibrilles pouvant aller de 50 à 200 nm, qui elles-mêmes s'agrègent pour former les fibres de collagène de dimension de l'ordre du micromètre. Le schéma de la figure III.5 présente ces différentes structures et leur place dans la synthèse des fibres de collagène.

Notons enfin que l'alignement des molécules individuelles de collagène se fait axialement suivant le modèle dit de Hodge [Hodge et al., 1963], dans lequel la pseudo-périodicité interne de la molécule de collagène facilite le décalage des interactions moléculaires. Les changements réguliers de densité électronique accompagnant cet arrangement produisent des bandes caractéristiques de 67 nm dans les fibres de collagène en microscopie électronique, comme on peut l'observer sur l'image en haut à droite de la figure III.5.

Les signaux 2PEF et SHG endogènes de la peau sont ainsi suffisamment intenses pour être observés en microscopie non linéaire. Si l'on veut pouvoir imager des structures spécifiques comme les fibres nerveuses et discriminer leur signal de fluorescence des autres signaux, l'usage d'un marquage exogène peut s'avérer nécessaire. Nous présentons dans la section suivante les caractéristiques que doit posséder ce marquage.

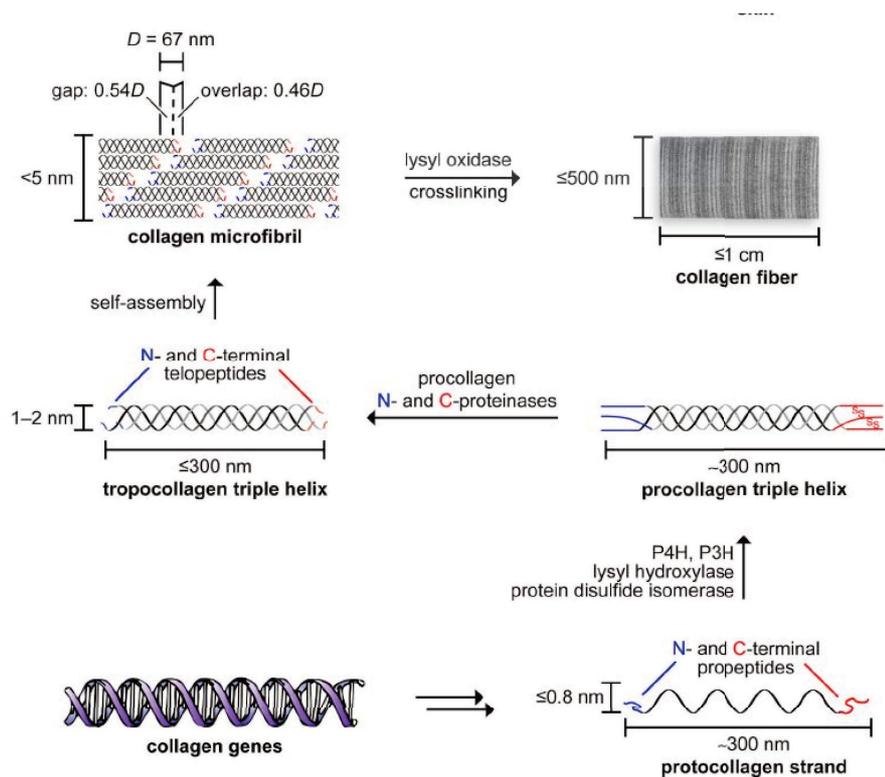


FIGURE III.5 – Voie de synthèse biochimique des fibres de collagène de type I. La lecture s'effectue de bas en haut, de gauche à droite. La dernière étape consiste à oxyder les radicaux de lysine, un acide aminé, ce qui conduit à la formation de ponts entre les fibres, les cross-links (schéma extrait de [Shoulders et Raines, 2009]).

III.3 Choix des molécules fluorescentes

Malgré l'engouement actuel pour la fabrication et la caractérisation de molécules possédant une section efficace d'absorption à deux photons importante [Terenziani et al., 2008], peu de travaux existent comparé aux études menées sur les molécules présentant de grandes sections efficaces d'absorption à un photon. On se propose d'étudier différents composés que nous avons jugé propices à l'imagerie 2PEF de cellules nerveuses issues de ganglions de la moelle épinière (DRG) de rats nouveaux-nés. Le marqueur idéal doit en effet :

- être biocompatible
- posséder une forte section efficace d'absorption à deux photons $\sigma_{abs}^{(2)}$
- posséder un rendement quantique de fluorescence Φ important

- être facilement internalisé par les cellules nerveuses
- être spécifique aux cellules nerveuses
- être de mise en œuvre simple et reproductible

Nous possédons une liste initiale assez restreinte de fluorophores absorbant à deux photons, fournie par Life Technologie™. Parmi ces molécules, quatre d'entre elles ont retenu notre attention :

- le **FM1[®]-43** : marqueur membranaire, décrit comme facilement internalisé dans les vésicules synaptiques [Henkel et al., 1996; Winterer et al., 2006].

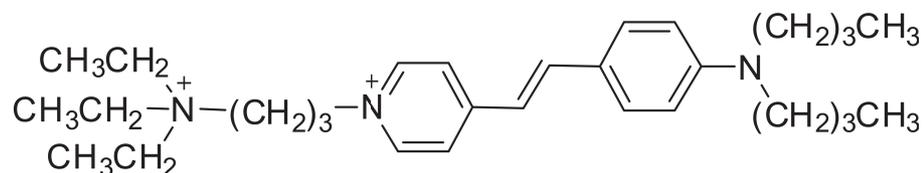


FIGURE III.6 – Structure chimique de la molécule de *N*-(3-Triéthylammoniumpropyl)-4-(4-(Dibutylamino) Styryl) Pyridinium Dibromide (FM1[®]-43) [Wang et al., 2006].

- le **CFSE** : dérivée de la fluorescéine. Ses propriétés de fluorescence ne sont observables qu'une fois sa forme primaire, le CFDA, estérifié par certaines enzymes cellulaires dans le cytoplasme. Elle est utilisée comme détecteur de mort cellulaire [Breeuwer et al., 1994].

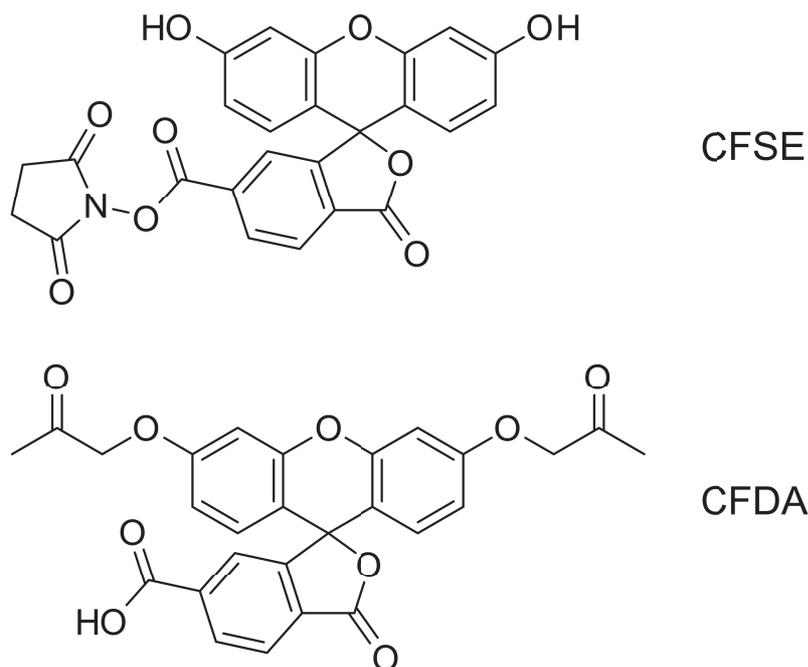


FIGURE III.7 – Structure chimique de la molécule de carboxyfluorescéine succinimidyl ester (CFSE, en haut) et de son précurseur non fluorescent, la carboxyfluorescéine diacétate (CFDA, en bas).

- l'**IB4-Alexa488** : l'IB4 est une isolectine, capable de se greffer sur certains sites membranaires spécifiques de la même manière qu'un anticorps. L'Alexa488, un dérivé de la fluorescéine, est greffée sur cette molécule pour réaliser un immunomarquage de fluorescence. L'IB4 a montré son efficacité pour révéler les fibres nerveuses du SNC et du SNP [Li et al., 1997; Wang et al., 1998].

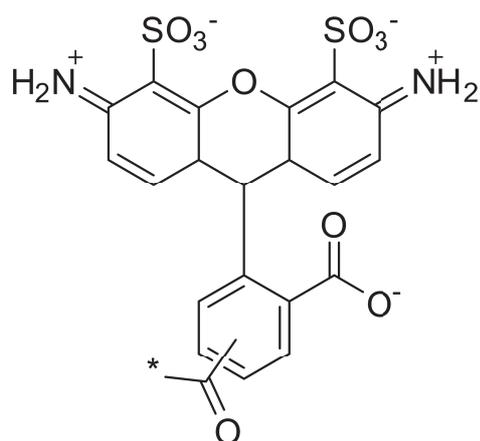


FIGURE III.8 – Structure chimique de l'Alexa 488.

- le **DiO** : dérivée de la fluorescéine, cette molécule couramment employée est fonctionnalisée pour se greffer sur les membranes plasmiques [Baumgart et al.,

2007]. Elle a récemment été utilisée pour les études de l'inhibition de l'endocytose du VIH [Vega et al., 2011].

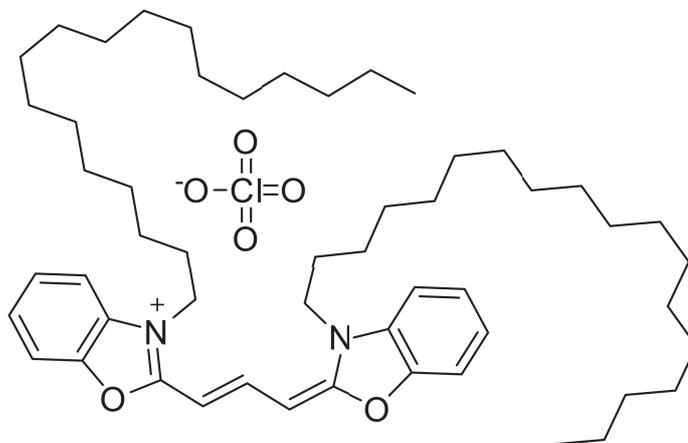


FIGURE III.9 – Structure chimique du 3,3'-Di-octadecyloxycarbocyanine Perchlorate (DiO).

Par ailleurs, comme toutes les cellules, les neurones possèdent un certain nombre de protéines dont quelques unes ont une réponse non linéaire notable, comme nous l'avons vu à la section III.2.3. Les nicotinamides (NAD), présentes dans les mitochondries, et les flavines (riboflavines, flavines mononucléotide (FMN) et flavines adénosines (FAD)) en font partie. Une discussion plus approfondie du signal d'auto-fluorescence de ces protéines et de ses conséquences sur la détermination des concentrations et sections efficaces d'absorption à deux photons des fluorophores exogènes est proposée dans la suite du manuscrit.

III.4 Principe

III.4.1 Mesure de $\sigma_{abs}^{(2)}$

Mesurer les sections efficaces d'absorption à deux photons de manière absolue est une tâche ardue. L'expérience standard que nous reproduisons consiste à mesurer l'intensité de la fluorescence après absorption à deux photons. Cependant, contrairement à la plupart des travaux dans ce domaine, nous ne nous limitons pas à réaliser les mesures en solution mais au sein des cellules nerveuses elles-mêmes. Il est très difficile d'y parvenir en employant des techniques usuelles qui consistent à illuminer une solution liquide homogène et stable. En effet, l'épaisseur de la culture ($< 100 \mu\text{m}$, soit quelques couches cellulaires) empêche la mesure de la fluorescence sous un angle de 90° comme cela se pratique généralement en solution. La mesure en transmission n'est également pas possible du fait de la faiblesse du signal de fluorescence

attendu. De manière générale, trouver un ensemble de cellules capables d'émettre un signal de fluorescence exploitable est très difficile, à moins de passer par une technique d'imagerie qui permettrait de localiser précisément cet ensemble. De fait, nous nous proposons ici de réaliser la mesure des sections efficaces d'absorption à deux photons de molécules fluorescentes au sein de cellules vivantes à l'aide de la microscopie 2PEF.

La section efficace d'absorption à deux photons d'une molécule a déjà été définie à la section I.2.2. Nous rappelons ci-dessous l'équation I.18 donnant la relation entre l'intensité moyenne de fluorescence 2PEF et les paramètres d'excitation et de collection du microscope à deux photons, en y ajoutant la dépendance spectrale de ces grandeurs :

$$\langle I^{2PEF}(t, \lambda_{ex}, \lambda_{em}) \rangle = \frac{g_p^{(2)}}{2} \frac{\langle P(t, \lambda_{exc}) \rangle^2}{f(\lambda_{exc})\tau(\lambda_{exc})} \Phi C \sigma_{abs}^{(2)}(\lambda_{exc}) f_{det}(\lambda_{em}) \quad , \quad (\text{III.1})$$

ce qui implique que :

$$\sigma_{abs}^{(2)}(\lambda_{exc}) = \frac{2f(\lambda_{exc})\tau(\lambda_{exc})}{g_p^{(2)}} \frac{\langle I^{2PEF}(t, \lambda_{ex}, \lambda_{em}) \rangle}{\langle P(t, \lambda_{exc}) \rangle^2} \frac{1}{\Phi C f_{det}(\lambda_{em})} \quad (\text{III.2})$$

En pratique, nous évaluons les sections efficaces d'absorption à deux photons de manière relative en prenant pour référence la fluorescéine dans l'eau à pH11 [Albota et al., 1998]. Nous supposons que la durée d'impulsion et la cadence de tir de la source laser pour chaque longueur d'onde d'excitation λ_{exc} sont conservées entre les mesures. Notons par ailleurs que le signal de fluorescence est dans notre étude à la fois intégré temporellement et en longueur d'onde sur le spectre de fluorescence de toutes les molécules étudiées. Nous modifions les notations en conséquence, en notant \bar{A} la grandeur A intégrée sur le spectre de fluorescence. Dans la suite, la dépendance temporelle et les moyennes temporelles $\langle \rangle$ sont omises pour alléger les expressions.

Soit X l'un des cinq fluorophores précédemment cités (l'un des quatre marquages exogènes ou l'ensemble des protéines autofluorescentes dont les émissions de fluorescence ne peuvent être séparées). La section efficace d'absorption à deux photons à une longueur d'onde d'excitation λ_{exc} donnée pour le fluorophore X est obtenue à partir de l'expression suivante :

$$\sigma_{abs,X}^{(2)}(\lambda_{exc}) = \sigma_{abs,ref}^{(2)}(\lambda_{exc}) \times \frac{\bar{I}_X^{2PEF}(\lambda_{exc})}{\bar{I}_{ref}^{2PEF}(\lambda_{exc})} \times \frac{P_{ref}^2(\lambda_{exc})}{P_X^2(\lambda_{exc})} \times \frac{C_{ref}}{C_X} \times \frac{\Phi_{ref}}{\Phi_X} \times \frac{(\overline{f_{det}})_{ref}^{2PEF}}{(\overline{f_{det}})_X^{2PEF}} \quad (\text{III.3})$$

où nous rappelons que \bar{I}^{2PEF} est l'intensité de fluorescence à deux photons intégrée sur le spectre de fluorescence, P la puissance moyenne du faisceau laser exciteur à la longueur d'excitation λ_{exc} en sortie de la cavité, C la concentration en fluorophore (en solution pour la fluorescéine, dans les cellules nerveuses pour les autres), Φ le rendement quantique de fluorescence (données de la littérature) et $(\overline{f_{det}})^{2PEF}$ l'efficacité de détection du microscope intégrée sur le spectre de fluorescence pour la configuration 2PEF du microscope. $(\overline{f_{det}})^{2PEF}$ est obtenue expérimentalement (cf. III.5.3). Les effets de différence d'indice entre la solution de référence (fluorescéine) et les cultures de cellules nerveuses sont ici négligés du fait de la proximité de leurs valeurs ($\sim 1,36$) aux longueurs d'onde considérées [Rappaz et al., 2005].

Notons que la mesure de la puissance laser moyenne en sortie de cavité, et non au foyer de l'objectif de microscope comme cela est souvent réalisé, est un choix expérimental dicté par notre besoin de ne pas déplacer les cultures de neurones chaque fois que nous changeons de longueur d'excitation. Nous émettons alors l'hypothèse que le coefficient de transmission de la voie d'excitation du microscope est conservé entre chaque expérience pour les mêmes longueurs d'onde d'excitation.

Notons également que la valeur du rendement quantique de fluorescence Φ dépend fortement de l'environnement du fluorophore. Dans notre étude, seuls les rendements quantiques de la fluorescéine, du FM1[®]-43 et du CFSE sont connus avec certitude dans un environnement équivalent à l'environnement cellulaire. Cependant, nous montrons à la section III.4.2 suivante que nous sommes capables de mesurer le produit $C\Phi$ en mesurant l'intensité de fluorescence à un photon produite par les fluorophores, ce qui nous permet de remonter à la section efficace d'absorption à deux photons grâce à l'équation III.3. Le protocole de mesure de la concentration des fluorophores au sein des cellules nerveuses est décrit dans la section suivante.

III.4.2 Mesure des concentrations de fluorophores au sein des DRG

La détermination des concentrations intracellulaires est réalisée à partir de la mesure de l'intensité de fluorescence à un photon dans le mode confocal du microscope à balayage, décrit dans la section I.4. La solution de référence est de nouveau la solution aqueuse de fluorescéine à pH11. La linéarité de l'intensité de fluorescence

excitée à un photon en fonction de la concentration de l'espèce en solution est vérifiée à partir de mesures sur des solutions de fluorescéine de concentrations différentes, comme le confirme la droite de la figure III.10. Les concentrations variables, obtenues par dilution d'une solution mère, ont été déterminées de manière indépendante par spectrophotométrie (Jasco V-650, JASCO, Inc., Easton, MD, USA). Les valeurs ainsi obtenues sont : 2,32 μM , 3,22 μM , 4,22 μM , 10,5 μM et 19,6 μM .

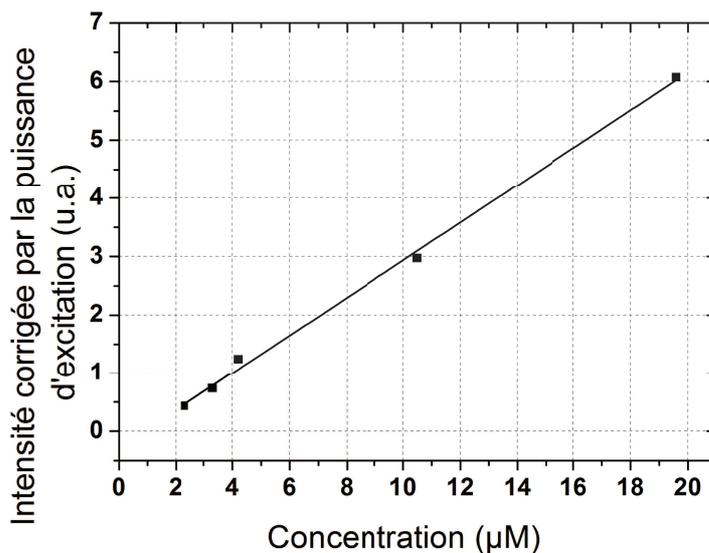


FIGURE III.10 – Représentation des intensités de fluorescence à un photon corrigées par la puissance d'excitation laser à 473 nm en fonction de la concentration d'une solution de fluorescéine à pH11. Le coefficient de régression linéaire R^2 est de 0,997.

L'intensité de fluorescence détectée en microscopie confocale suit une loi similaire à celle détectée en microscopie à deux photons (équation III.1), à l'exception de sa dépendance en fonction de la puissance d'excitation. Cette loi s'écrit :

$$\bar{I}^{1PEF} \propto P(\lambda_{exc}) \Phi C \epsilon(\lambda_{exc}) \overline{f_{det}}^{1PEF}, \quad (\text{III.4})$$

où \bar{I}^{1PEF} est cette fois l'intensité de fluorescence moyenne excitée à un photon et intégrée sur la bande de fluorescence de la molécule étudiée, $P(\lambda_{exc})$ la puissance laser continue de la lumière d'excitation, $\epsilon(\lambda_{exc})$ le coefficient d'absorptivité molaire à la longueur d'onde d'excitation λ_{exc} et $\overline{f_{det}}^{1PEF}$ l'efficacité de détection du microscope confocal, intégrée comme \bar{I}^{1PEF} sur la bande de fluorescence de la molécule étudiée. Les grandeurs \bar{I}^{1PEF} et $\overline{f_{det}}^{1PEF}$ sont déterminées expérimentalement en suivant le protocole détaillé plus loin. Les valeurs des coefficients d'extinction molaire $\epsilon(\lambda_{exc})$ sont obtenues dans la littérature ou sont fournies avec les produits commerciaux (cf. tableau III.2).

À partir de l'expression III.4, et connaissant la concentration en fluorophore de la solution de référence C_{ref} , nous pouvons remonter à la concentration des fluorophores au sein des cellules nerveuses :

$$C_X = C_{ref} \times \frac{\bar{I}_X^{1PEF}}{\bar{I}_{ref}^{1PEF}} \times \frac{P_{ref}(\lambda_{exc})}{P_X(\lambda_{exc})} \times \frac{\epsilon_{ref}(\lambda_{exc})}{\epsilon_X(\lambda_{exc})} \times \frac{\Phi_{ref}}{\Phi_X} \times \frac{(\overline{f_{det}})_{ref}^{1PEF}}{(\overline{f_{det}})_X^{1PEF}} \quad (III.5)$$

Cette expression, similaire à l'expression III.3, nous servira ultérieurement à mesurer les concentrations des fluorophores *in situ*, en mesurant l'intensité de fluorescence sous excitation à un photon.

III.5 Protocole expérimental

III.5.1 Prélèvement des ganglions dorsaux rachidiens sur des rats

Les animaux desquels sont extraits les neurones sensoriels sont des rats Wistar âgés de 2 à 5 jours, fournis par le centre animalier de l'Université de Brest. Toutes les extractions et les cultures ont été effectuées au sein du Laboratoire de Neurobiologie Cutanée de l'Université.

Les rats sont d'abord anesthésiés puis sacrifiés par décapitation. Seule méthode autorisée par le comité d'éthique pour l'euthanasie de rats, elle présente l'avantage de donner un accès facile à la colonne vertébrale au niveau cervical. Pour chaque expérience, quatre rats ont été utilisés. Après décapitation, les rats sont déposés sur le ventre et la peau dorsale est ôtée. La partie dorsale de la colonne vertébrale est ensuite enlevée sur toute sa longueur selon une découpe dans le sens cranio-caudal. À ce stade, on aperçoit entre chaque vertèbre un ganglion rachidien, constitué d'un ensemble de corps cellulaires de neurones sensoriels. Chaque ganglion est prélevé à la pince et plongé dans un milieu de culture non supplémenté en facteur de croissance (DMEM-F12, Lonza Ltd, Basel, Suisse) afin d'éviter le dessèchement pendant la durée du prélèvement.

Purification des neurones sensoriels de rats et mise en culture

Pour isoler les neurones sensoriels les uns des autres, les ganglions dorsaux rachidiens prélevés sont dissociés, d'abord de façon enzymatique sous l'effet de la collagénase IV (200 unités/mL)(Sigma-Aldrich,St-Louis, MO) pendant 35 minutes

à 37 ° C, puis mécaniquement par aspiration-refoulement successifs de la suspension cellulaire à la pipette pasteur.

Les neurones sont cultivés sur des lames de verre stériles sur lesquelles sont collés des inserts de culture cellulaire réutilisables en silicone (FlexiPERM 8 puits, Sartstedt). Les inserts sont stérilisés dans des bains d'éthanol absolu, rincés à l'eau stérile et collés sur les lames de verre. Pour faciliter l'adhésion et la croissance des neurones, une couche de collagène I est déposée au fond de chaque puits. Une solution de collagène I (Becton Dickinson, 20µg/mL) est donc incubée dans chaque puits et laissée pendant une nuit à température ambiante. Le lendemain, la solution de collagène est ôtée et les puits sont asséchés sous hotte à flux laminaire.

Le milieu de culture des neurones sensoriels est constitué d'un mélange 1 :1 de DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) et de DMEM-F12 (Lonza Ltd), supplémenté extemporanément par de l'insuline (5µg/mL final), de l'hydrocortisone (10 ng/mL final) et du Nerve Growth Factor (NGF, 25ng/mL final). Un cocktail d'antibiotiques (Normocin, InvivoGen, dilution finale 1/500^{ème}) est aussi ajouté pour prévenir les contaminations par les bactéries, mycoplasmes et champignons. Au cours des 5 à 6 jours que dure la culture, le milieu est changé au moins une fois.

Marquages des neurones sensoriels de rats

Les marquages sont réalisés en cours de culture avec les molécules de FM[®]1-43 (Synaptogreen C4, Sigma Aldrich), d'Alexa-488 couplée à l'IB4 (Isolectin GS-IB4, Alexa Fluor[®]488 Conjugate, Molecular Probes), de CFSE (Molecular Probes) ou de DiO (Vybrant DiO, Molecular Probes).

Après élimination de la collagénase IV par centrifugation, le culot cellulaire est repris par 2,5 mL de DMEM-F12. Parallèlement, cinq nouveaux tubes stériles sont identifiés au nom des quatre sondes fluorescentes ou de l'absence de marquage. Dans chaque tube sont déposés 500µL de cette suspension. Chaque tube correspond à une condition de marquage (FM1-43, IB4-Alexa488, CFSE ou DiO) ou au témoin non marqué. Les neurones sensoriels sont mis en présence des sondes fluorescentes à raison de 5µM pour le et le FM1-43, le CFSE et le DiO, et de 10µg/mL pour l'IB4-Alexa488. Ils sont ainsi incubés pendant 30 minutes à 37 ° .

Après deux lavages successifs pour éliminer les sondes en excès, les cellules témoins, marquées au FM1-43, à l'IB4-Alexa488 ou au DiO sont mises en culture

sur les lames de verre préalablement enduites de collagène pour favoriser l'adhérence. Les neurones marqués au CFSE sont placés de nouveau à 37° pendant 20 à 30 minutes afin que le précurseur en excès (CFDA) soit libéré des cellules. Après deux lavages successifs, les neurones peuvent enfin être mis en culture. Ces dernières durent 5 à 6 jours en présence des facteurs de croissance (hydrocortisone, NGF, insuline). Au total, près d'une dizaine de ganglions par condition de marquage a été analysée, nécessitant 8 prélèvements effectifs (auxquels s'ajoutent un prélèvement test pour fixer les conditions de l'expérience lors des premières observations). Chaque ensemble {prélèvement + imagerie} est appelé dans la suite du manuscrit "série".

III.5.2 Imagerie

Les échantillons sont préparés entre lame et lamelle après retrait du milieu de culture et remplacement par une solution tampon de PBS. Un soin particulier est pris lors du transfert des échantillons et de leur préparation, les conditions en température n'étant plus favorables à la survie des cellules (salle du microscope climatisée à 20°C). La solution de fluorescéine utilisée comme référence remplit un joint torique de 2 mm d'épaisseur fixé sur une lame de microscope, puis recouverte d'une lamelle. Sa concentration dépend du mode d'excitation : elle est de $5\mu\text{M}$ en excitation linéaire et de $80\mu\text{M}$ en deux photons. La microscopie confocale est employée pour les mesures de concentration des fluorophores au sein des cellules avec le laser émettant à 473 nm. La configuration expérimentale de notre microscope confocal à balayage a été détaillée précédemment (cf. section I.4). Chaque amas imagé en mode 1PEF l'est également en mode 2PEF. Dans le mode non linéaire, le laser femtoseconde $Ti : Sa$ est accordé manuellement en longueur d'onde. Un jeu de filtres de densité neutre permet de contrôler la puissance laser injectée dans le microscope.

Les images sont réalisées à l'aide de l'objectif 20X ($NA = 0,75$) dont les caractéristiques sont données à la section I.4.3. Le trou confocal #4 ($200\mu\text{m}$ de diamètre) est utilisé dans toutes les expériences. Remarquons que selon le tableau I.2, la dimension latérale de la PSF de cet objectif est $w_{x,y}^{2PEF} = 0,25\mu\text{m}$, inférieure au rayon du trou rapporté au plan focal de l'objectif $r'_p = 1,4\mu\text{m}$. Le trou de sélection confocale #1 aurait été plus adapté ($r'_p = 0,42\mu\text{m}$) en termes de contraste de l'image. Cependant, la très faible intensité des signaux collectés à travers le trou confocal #1 nous a fait opter pour le trou de sélection #4, qui permet d'accroître sensiblement le rapport signal à bruit des images sans dégrader notablement le contraste.

Les images sont réalisées avec une définition de 512×512 pixels², soit des images de taille $700 \times 700 \mu\text{m}^2$ environ. Les images sont ainsi sous-échantillonnées puisqu'un pixel mesure environ $1,4 \mu\text{m}$ alors que la résolution transverse théorique pour un objectif d'ouverture numérique 0,75 est d'environ $0,25 \mu\text{m}$ en 2 photons à la longueur d'onde d'excitation de 830 nm. La durée d'acquisition d'une image est typiquement d'une seconde. La tension du PMT a été fixée à 570 V pour toutes les séries échantillons, une étude préliminaire ayant montré que cette tension permettait d'obtenir un rapport signal à bruit satisfaisant dans les images tout en minimisant le nombre de pixels saturés, pour tous les échantillons, quelque soit le marqueur ou la longueur d'onde d'excitation dans un certain domaine de puissance d'excitation laser.

La valeur de l'intensité de fluorescence, mesurée sur chaque zone d'intérêt (ou ROI, pour Region Of Interest) de l'image, est une valeur moyenne de l'intensité par pixel de la ROI (cf. section III.5.4). Cette valeur est particulièrement dépendante de l'état de conservation des amas de cellules nerveuses. Les ROIs font l'objet d'un repérage en lumière blanche avant toute acquisition d'image, ce qui permet notamment d'éviter les amas trop proches des bords de la lame de microscope ou des bulles d'air piégées au moment du dépôt de la lamelle couvre-objet. En effet, au voisinage de ces bulles les amas cellulaires peuvent se déplacer et/ou se déformer du fait de mouvements du liquide de montage.

III.5.3 Détermination des efficacités de détection

L'équation III.3 fait intervenir l'efficacité de détection du microscope $f_{det}(\lambda)$ qui dépend de la longueur d'onde du photon de fluorescence λ . La mesure de cette grandeur passe par la détermination du spectre de fluorescence $Sp(\lambda)$ de chaque molécule au sein des DRG, des coefficients de transmission optiques $T(\lambda)$ des voies confocale et multiphoton et de la sensibilité spectrale $S_{PMT}(\lambda)$ du PMT :

$$(f_{det}(\lambda))_X^\alpha = Sp_X(\lambda) \times T(\lambda)^\alpha \times S_{PMT}(\lambda), \quad (\text{III.6})$$

où α correspond soit au mode de microscopie 1PEF ou 2PEF. Seul le coefficient de transmission est affecté par le changement de mode du fait du remplacement du miroir dichroïque en amont des scanners galvanométriques et de l'ajout du filtre passe-haut en mode 1PEF (cf. section I.4.3). Pour obtenir $(\overline{f_{det}})^\alpha$, nous intégrons l'expression précédente sur l'intervalle de longueurs d'onde correspondant au spectre d'émission du fluorophore étudié.

La mesure du spectre $Sp_X(\lambda)$ a été effectuée avant la roue porte-trous confocaux du module de balayage. Cette portion du microscope est en effet facile d'accès et permet d'introduire différents composants optiques sur l'axe optique. Nous avons ainsi introduit un prisme à réflexion totale interne à angle droit traité visible et IR (prisme à angle droit de 12,5 mm de côté, Edmund Optics Ltd), permettant de réfléchir la lumière de fluorescence provenant de l'échantillon vers une fibre optique collectrice reliée à un spectromètre à barette de CCD (HR2000, Ocean Optics Inc, Dunedin, FL, USA, résolution de 0,5 nm). Les spectres sont obtenus par accumulation du signal pendant 10 secondes. Une moyenne sur 6 spectres est effectuée pour améliorer le rapport signal à bruit. Il est important de remarquer que le spectre obtenu dans ces conditions est en fait le spectre de fluorescence vu à travers la voie descannée du microscope, c'est-à-dire après la traversée d'un grand nombre de pièces optiques (cf. montage de la figure I.12). Pour obtenir le spectre de fluorescence à la source, il faut diviser, pour chaque longueur d'onde, le spectre mesuré par le coefficient de transmission de cette voie de collection. Le spectre $Sp_X(\lambda)$ est alors obtenu après normalisation du spectre corrigé. Les spectres de chaque fluorophore utile pour notre étude sont présentés à la figure III.11.

Les coefficients de transmission $T(\lambda)^{1PEF}$ et $T(\lambda)^{2PEF}$ incluent la transmission de l'ensemble des composants du microscope jusqu'à la roue porte-trous confocaux et la transmission des filtres infrarouges BG39 placés devant le PMT. Ces coefficients ont été déterminés au laboratoire en mesurant le spectre d'une source blanche halogène en amont et en aval de la voie de collection du microscope. Seule la sensibilité $S_{PMT}(\lambda)$ du PMT est une donnée constructeur. Le produit de ces différents paramètres permet d'obtenir l'efficacité de détection de la fluorescence par le microscope pour chaque fluorophore $f_{det}(\lambda)$ et chaque condition d'acquisition (confocale et multiphoton). Les paramètres nécessaires pour les calculs des sections efficaces d'absorption à deux photons et des concentrations des fluorophores au sein des cellules nerveuses sont donnés dans le tableau III.2.

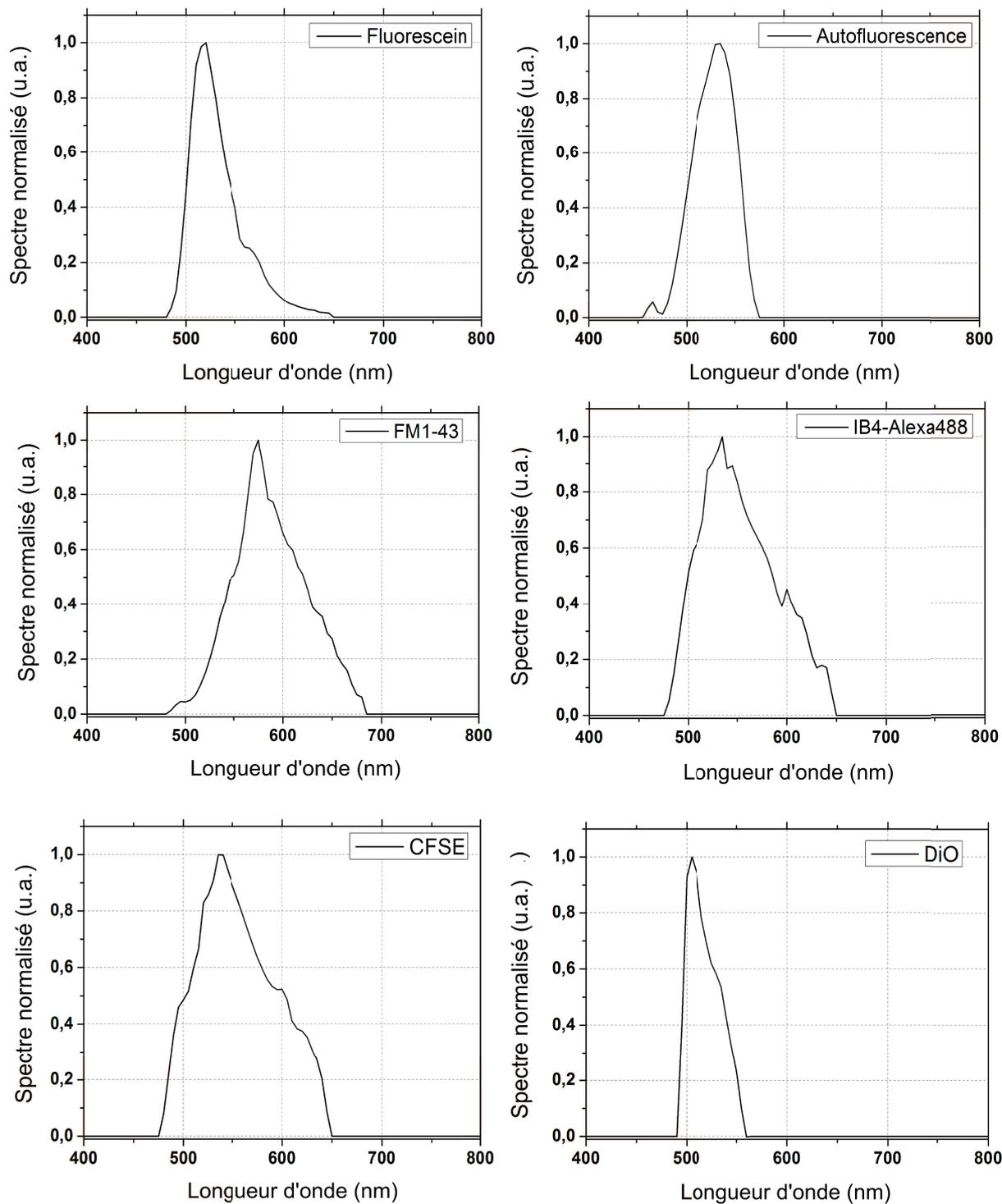


FIGURE III.11 – Spectres d'émission de fluorescence corrigés et normalisés de la fluoresceïne dans une solution tampon à pH11 et des fluorophores liés aux cellules nerveuses de racine dorsale de rats nouveaux-nés.

Fluorophore	$\epsilon(M^{-1}.cm^{-1})^{[1]}$	$\Phi^{[2]}$	$\overline{f_{det}^{-1PEF}}$	$\overline{f_{det}^{-2PEF}}$	Références
Fluorescéine (eau, pH>7)	43700	0,92	0,76	0,62	[Magde et al., 2002] [Diehl, 1989]
Autofluorescence ^[3] (cellules nerveuses)	9070	0,26	0,77	0,66	[Whitby, 1953]* [Kozioł, 1971]
FM1-43 (lipides)	40000	0,3	0,17	0,19	[Johnson, 1998]
IB4-Alexa488 (tampon pH=8)	30530	0,4	0,48	0,45	Molecular Probes®
CFSE (tampon pH=9)	41440	0,92	0,44	0,42	Molecular Probes®*
DiO (méthanol)	107800	0,4	0,93	0,75	Molecular Probes®*,†

TABLE III.2 – Paramètres photochimiques utiles pour la détermination des concentrations des fluorophores au sein des cellules nerveuses et de leur $\sigma_{abs}^{(2)}$.

[1] Coefficient d'extinction molaire.

[2] Rendement quantique de fluorescence.

[3] L'autofluorescence issue du processus d'absorption à un photon est assimilée à celle des riboflavines et des FMN. Le coefficient d'extinction molaire des NAD à 473 nm tend vers 0, et $\Phi \simeq 0,019$ [Wolfbeis, 1985](pp 167-380).

*Coefficients d'extinction molaire extrapolés des spectres d'absorption de ces références

† Φ estimé à partir des Φ du DiD et du DiR, deux analogues au DiO

III.5.4 Mesure de l'intensité

Technique de mesure

L'intensité mesurée est une moyenne de l'intensité des pixels associés aux amas dans l'image de fluorescence 2PEF. Les amas de neurones imagés à chaque longueur d'onde d'excitation présentent des ROIs sélectionnées manuellement et leur intensité est mesurée par les plugins classiques d'ImageJ (hand draw tool, ROI Manager et Multimeasure).

Dans le meilleur des cas, les ROI n'évoluent pas en cours d'acquisition. Il arrive cependant que certains amas, plus fragiles, se délient, ce qui conduit à une diminution de l'intensité moyenne associée à une augmentation de la surface des amas. Sur les 68 amas imagés, un tiers environ a subi cette augmentation de surface qui est en moyenne de 10%. Pour corriger cet effet, la surface des amas déformés est ramenée à leur surface initiale et l'intensité moyenne corrigée en conséquence.

Les pages suivantes présentent une compilation d'images représentatives de chaque condition de marquage. Les cellules nerveuses en culture sont imagées en microscopie 2PEF, en couvrant un domaine spectral d'excitation allant de 700 à 900 nm par pas de 10 nm. Les contours jaunes sont les ROIs dans lesquelles nous mesurons l'intensité moyenne de fluorescence. Les puissances en sortie de laser sont indiquées ainsi que les longueurs d'onde d'excitation correspondant à chaque image. L'image "Dark" est réalisée "à vide", c'est-à-dire sans excitation des DRG, pour pouvoir soustraire la réponse globale de la chaîne d'acquisition du signal par le microscope. La dernière image est réalisée en mode confocal avec la source laser à 473 nm. Notons qu'un histogramme des intensités de chaque ROI a été réalisé pour chaque image afin de s'assurer que le nombre de pixels saturés est négligeable (arbitrairement inférieur à 5% du nombre total de pixel de la ROI).

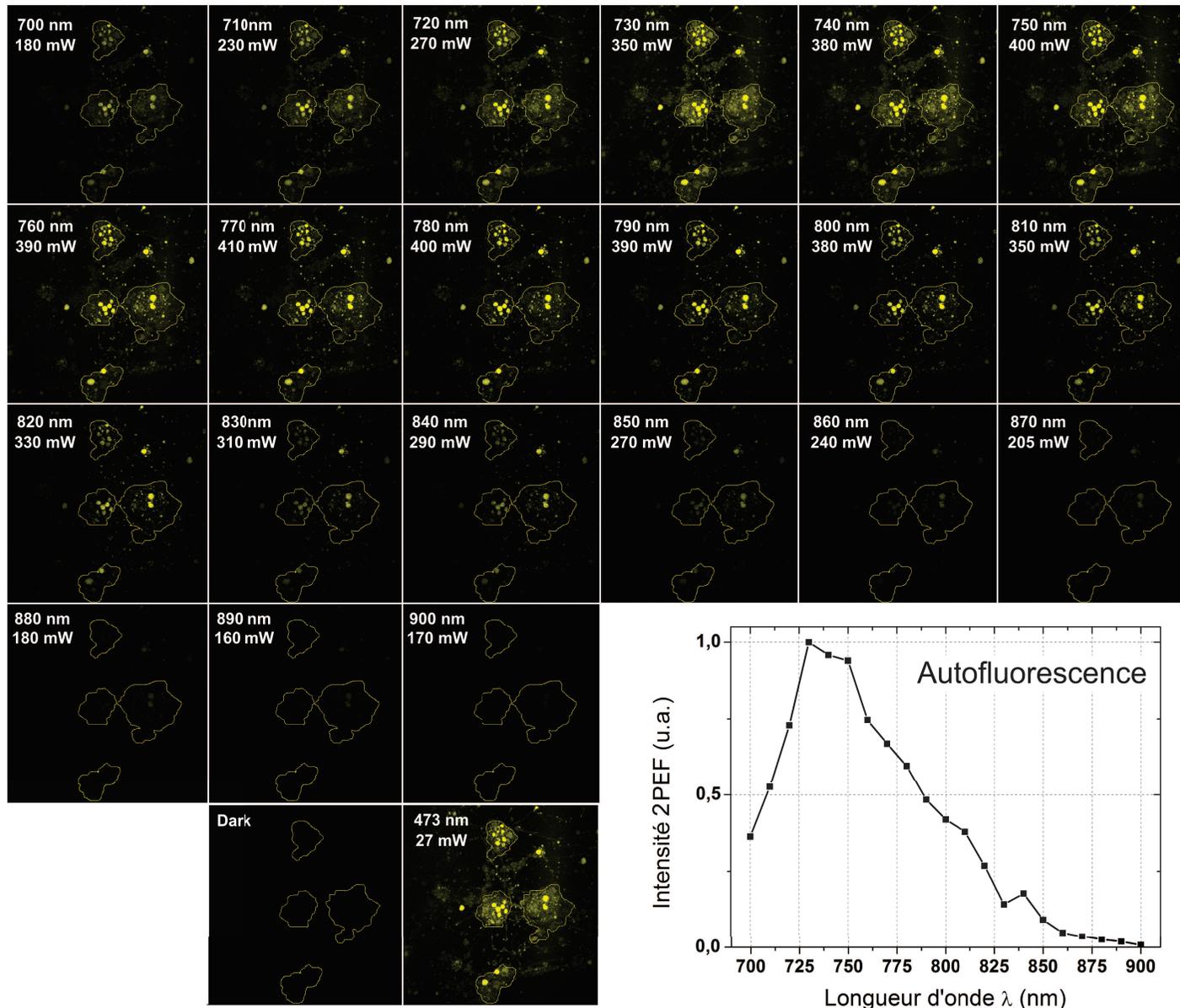


FIGURE III.12 – Imagerie de fluorescence à deux photons d'amas de neurones sensoriels primaires non marqués issus de DRG de rats. Les longueurs d'onde d'excitation sont données, ainsi que les puissances lumineuses associées. La courbe présente l'intensité moyenne de fluorescence des ROIs en fonction de la longueur d'onde.

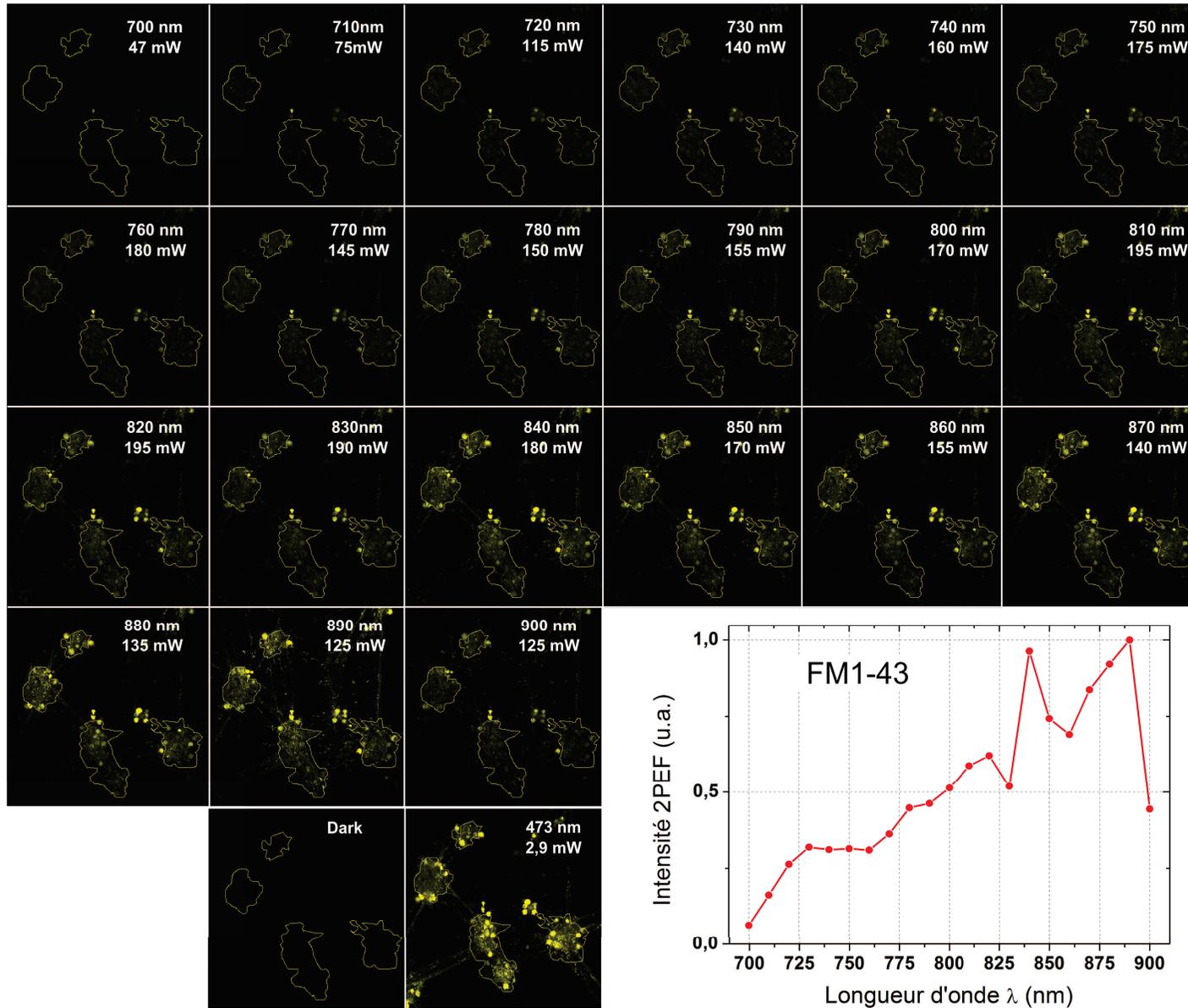


FIGURE III.13 – Imagerie de fluorescence à deux photons d'amas de neurones sensoriels primaires marqués au FM1-43 issus de DRG de rats. Les longueurs d'onde d'excitation sont données, ainsi que les puissances lumineuses associées. La courbe présente l'intensité moyenne de fluorescence des ROIs en fonction de la longueur d'onde.

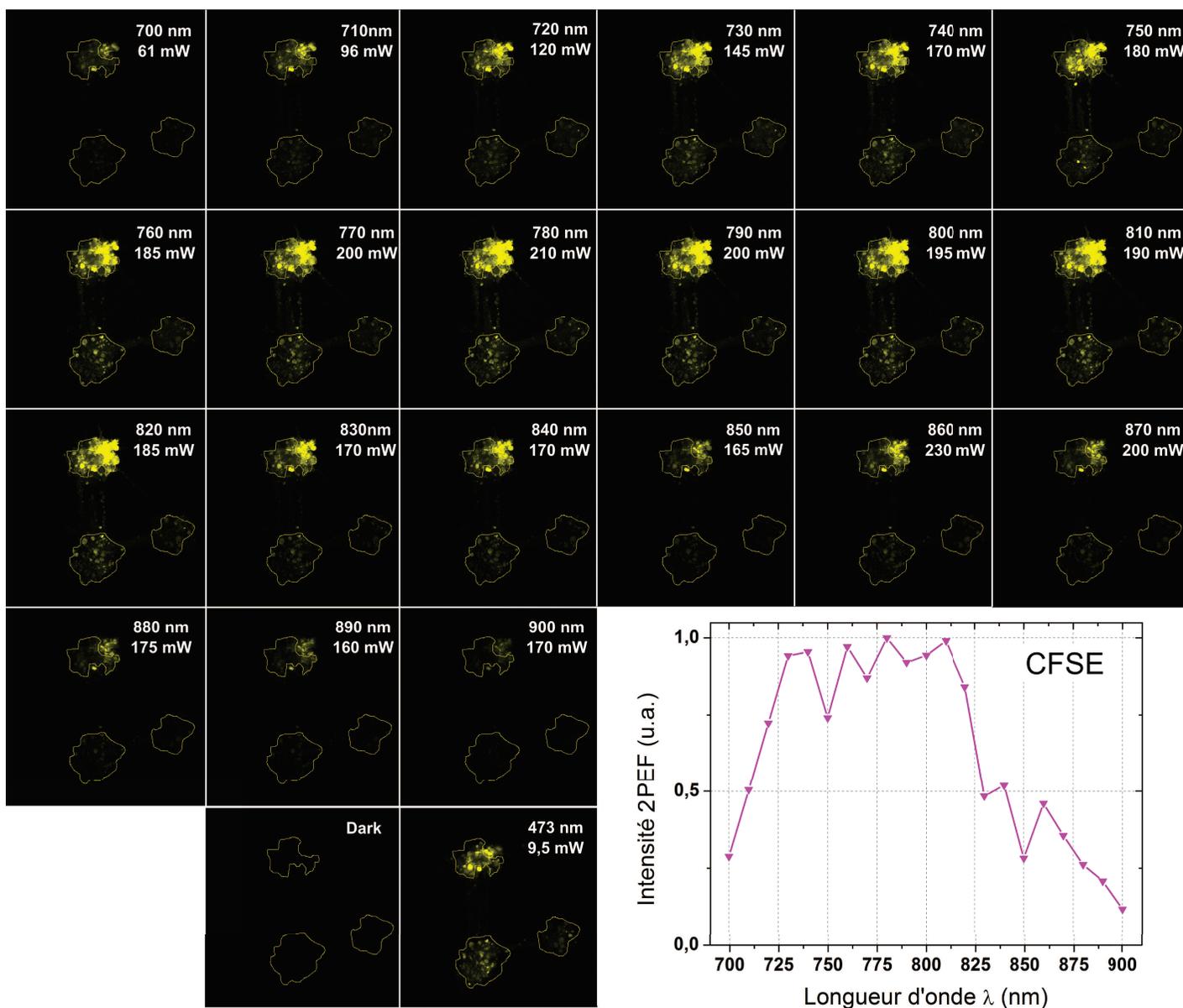


FIGURE III.14 – Imagerie de fluorescence à deux photons d’amas de neurones sensoriels primaires marqués au CFSE issus de DRG de rats. Les longueurs d’onde d’excitation sont données, ainsi que les puissances lumineuses associées. La courbe présente l’intensité moyenne de fluorescence des ROIs en fonction de la longueur d’onde.

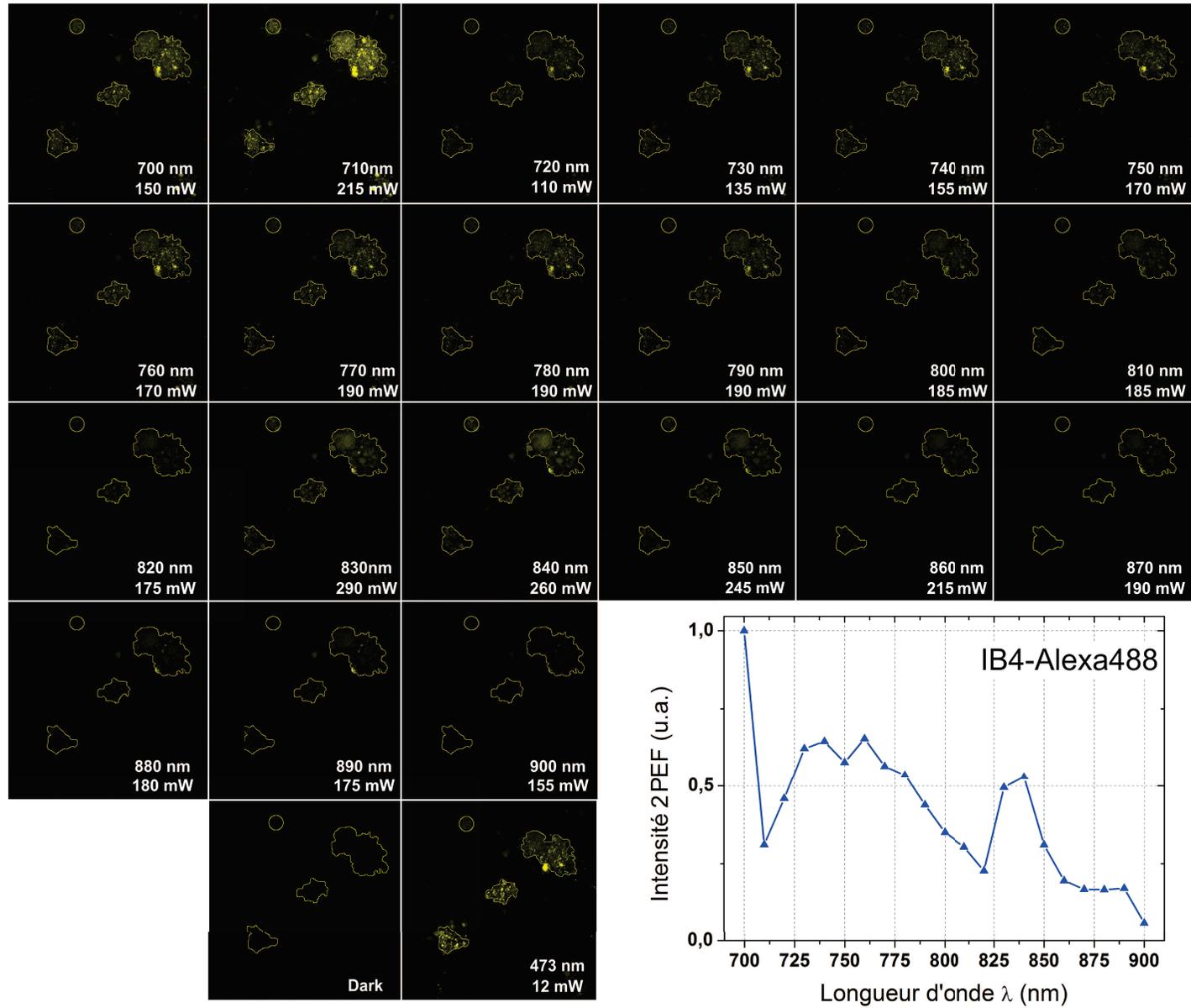


FIGURE III.15 – Imagerie de fluorescence à deux photons d’amas de neurones sensoriels primaires immunomarqués par l’isolectine B_4 couplée à l’Alexa488 issus de DRG de rats. Les longueurs d’onde d’excitation sont données, ainsi que les puissances lumineuses associées. La courbe présente l’intensité moyenne de fluorescence des ROIs en fonction de la longueur d’onde.

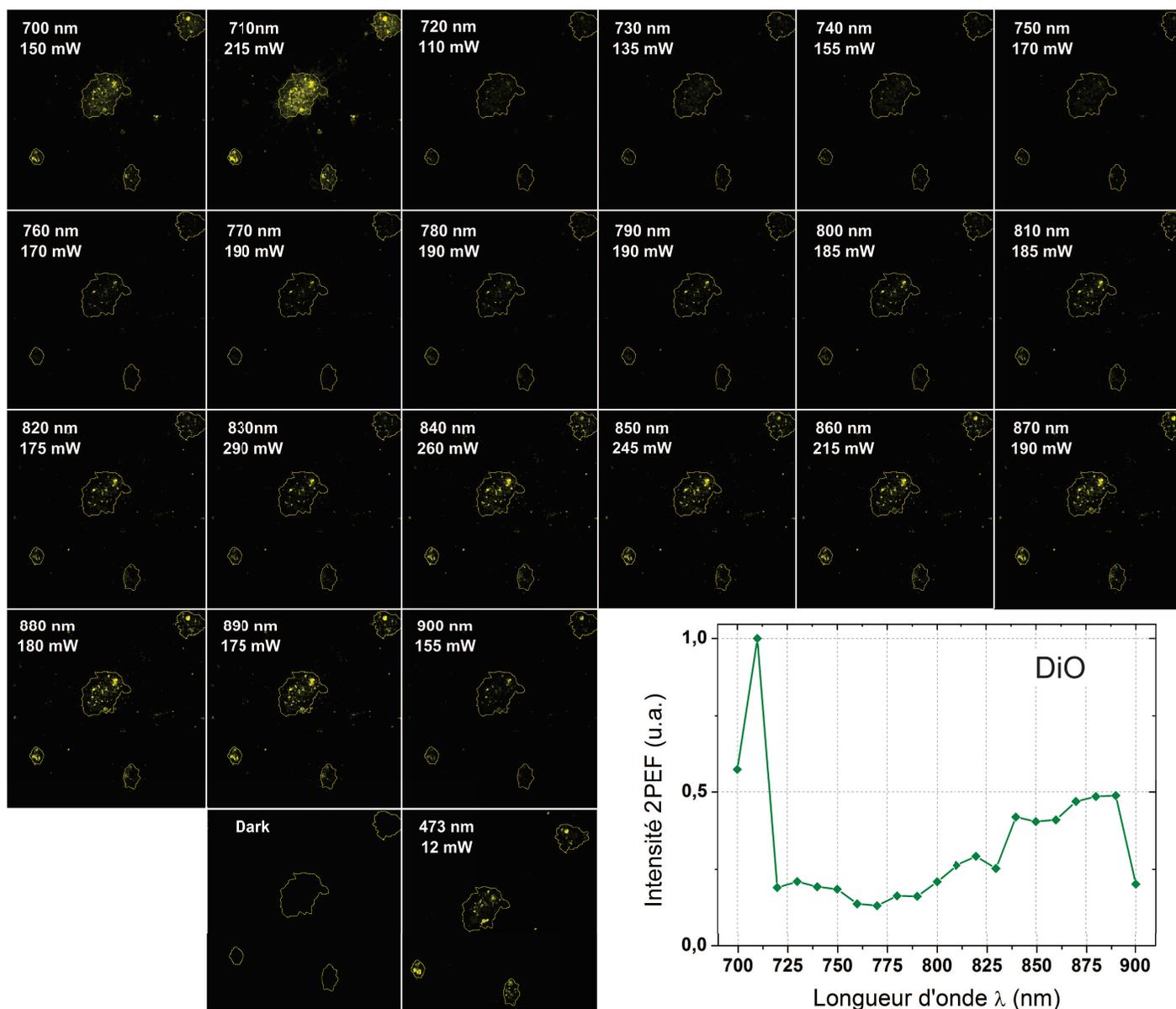


FIGURE III.16 – Imagerie de fluorescence à deux photons d’amas de neurones sensoriels primaires marqués au DiO issus de DRG de rats. Les longueurs d’onde d’excitation sont données, ainsi que les puissances lumineuses associées. La courbe présente l’intensité moyenne de fluorescence des ROIs en fonction de la longueur d’onde.

Afin de s'assurer que les images analysées résultent de l'émission de fluorescence après absorption à deux photons, la dépendance quadratique de l'intensité moyenne dans les ROIs avec la puissance incidente a été vérifiée pour chaque fluorophore. La figure III.17 illustre cette dépendance pour quelques amas représentatifs à des longueurs d'onde d'excitation pour lesquelles le signal de fluorescence est suffisamment élevé. Les pentes de cette représentation graphique sont presque toutes proches de 2, ce qui indique que l'intensité détectée est bien issue du processus de fluorescence excitée à deux photons. Remarquons que la pente associée à l'IB4-Alexa488 est significativement supérieure à 2, résultat probablement dû à un artefact de mesure associé à la grande hétérogénéité spatiale du marquage par ce fluorophore, discutée à la section III.6.1.

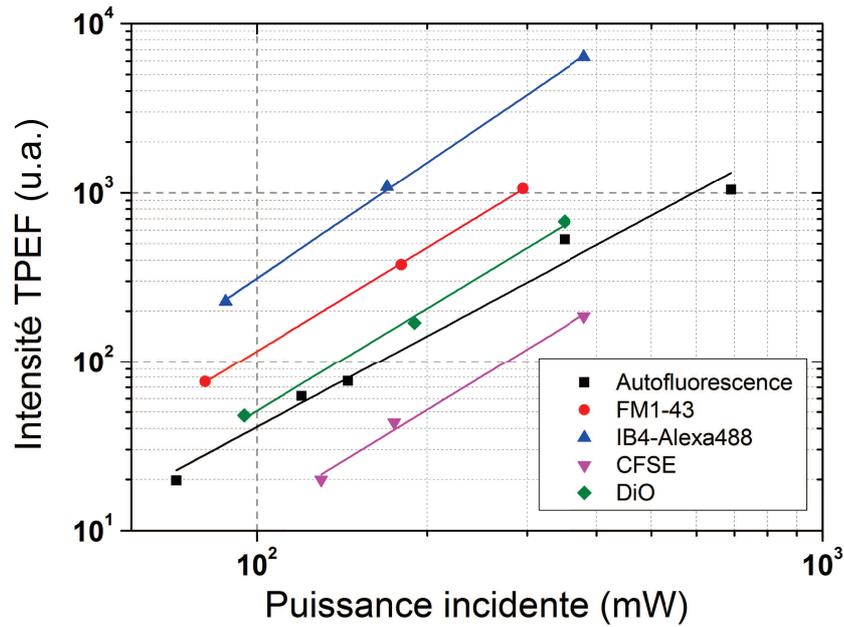
Soustraction du signal d'autofluorescence

Dans toutes les images réalisées l'intensité de fluorescence mesurée est la somme des intensités de fluorescence de la molécule exogène étudiée et de l'autofluorescence d'un ensemble de protéines endogènes. La contribution de ces protéines fluorescentes à l'intensité mesurée pour les 4 fluorophores exogènes étudiés doit être soustraite. Pour ce faire, nous faisons l'hypothèse que pour une même portée de ratons, le contenu en protéines autofluorescentes est sensiblement le même. Il est cependant nécessaire de normaliser les intensités mesurées avec et sans marqueur par le carré de la puissance incidente avant de réaliser cette soustraction.

Justification : soit X l'un des fluorophores exogènes, NM l'autofluorescence et réf le signal de la référence. L'intensité mesurée I'_X est la somme de l'intensité associée à X, I_X et de l'intensité associée à l'autofluorescence des protéines des amas de neurones, I_{NM} : $I'_X = I_X + I_{NM}$. Ainsi la section efficace d'absorption à deux photons de la molécule X peut être déterminée par (cf. (III.3)) :

$$\begin{aligned} \sigma_{abs,X_{corr}}^{(2)} &= \sigma_{abs,réf}^{(2)} \times \frac{\bar{I}_X^{2PEF} / P_X^2}{\bar{I}_{réf}^{2PEF} / P_{réf}^2} \times \frac{C_{réf}}{C_X} \times \frac{\Phi_{réf}}{\Phi_X} \times \frac{(\overline{f_{det}})_{réf}^{2PEF}}{(\overline{f_{det}})_X^{2PEF}} \\ \Leftrightarrow \sigma_{abs,X_{corr}}^{(2)} &= \sigma_{abs,réf}^{(2)} \times \frac{\left(\bar{I}_X^{2PEF} / P_X^2 \right) - \left(\bar{I}_{NM}^{2PEF} / P_X^2 \right)}{\bar{I}_{réf}^{2PEF} / P_{réf}^2} \times \frac{C_{réf}}{C_X} \times \frac{\Phi_{réf}}{\Phi_X} \times \frac{(\overline{f_{det}})_{réf}^{2PEF}}{(\overline{f_{det}})_X^{2PEF}} \end{aligned} \quad (III.7)$$

En supposant que la quantité de protéines autofluorescentes est conservée entre les DRG d'un même groupe de ratons, le rapport $\bar{I}_{NM}^{2PEF} / P_X^2$ est identique à $\bar{I}_{NM_{réf}}^{2PEF} / P_{NM_{réf}}^2$,



Fluorophore	Longueur d'onde (nm)	Pente
Protéines intrinsèques	730	$1,80 \pm 0,14$ ($R^2 = 0,978$)
FM1-43	840	$2,04 \pm 0,02$ ($R^2 = 0,999$)
IB4-Alexa488	750	$2,27 \pm 0,05$ ($R^2 = 0,999$)
CFSE	750	$2,04 \pm 0,16$ ($R^2 = 0,988$)
DiO	780	$2,03 \pm 0,12$ ($R^2 = 0,993$)

FIGURE III.17 – Représentation en échelles logarithmiques des intensités de fluorescence excitée à deux photons émis par des cinq groupes de fluorophores au sein des cellules nerveuses en fonction de la puissance incidente. Le tableau donne les valeurs des pentes et les coefficients de régression linéaire R^2 pour chaque fluorophore ainsi que la longueur d'onde d'excitation.

ce dernier rapport faisant référence à l'intensité et à la puissance lumineuse propres à l'imagerie des échantillons non marqués. Il reste donc :

$$\sigma_{abs,X_{corr}}^{(2)} = \sigma_{abs,réf}^{(2)} \times \frac{\left(\overline{I}_X^{2PEF} / P_X^2\right) - \left(\overline{I}_{NM,réf}^{2PEF} / P_{NM,réf}^2\right)}{\overline{I}_{réf}^{2PEF} / P_{réf}^2} \times \frac{C_{réf}}{C_X} \times \frac{\Phi_{réf}}{\Phi_X} \times \frac{(\overline{f_{det}})_{réf}^{2PEF}}{(\overline{f_{det}})_X^{2PEF}} \quad (III.8)$$

De la même manière que pour les mesures d'intensité 2PEF les cellules nerveuses non marquées ont fourni une intensité de fluorescence de référence à soustraire lors de la mesure des concentrations des fluorophores en mode de microscopie confocale. La concentration du fluorophore X est donc donnée par :

$$C_{X_{corr}} = C_{réf} \times \frac{\left(\overline{I}_X^{1PEF} / P_X\right) - \left(\overline{I}_{NM}^{1PEF} / P_{NM}\right)}{\overline{I}_{réf}^{1PEF} / P_{réf}} \times \frac{\epsilon_{réf}}{\epsilon_X} \times \frac{\Phi_{réf}}{\Phi_X} \times \frac{(\overline{f_{det}})_{réf}^{1PEF}}{(\overline{f_{det}})_X^{1PEF}}$$

III.6 Résultats

III.6.1 Concentrations au sein des cellules nerveuses

Le tableau III.3 récapitule les valeurs du produit $C\Phi$ pour chaque fluorophore, ce paramètre étant directement mesurable par la technique précédemment décrite. Les valeurs de rendement quantique de fluorescence, très dépendantes de l'environnement de la molécule, données dans le tableau III.2 n'ont en effet pas pu être obtenues pour un environnement cellulaire. Les concentrations des marqueurs au sein des cellules obtenues pour chaque fluorophore ne sont que des estimations données à titre indicatif. L'intervalle des valeurs mesurées est donné entre crochets, et les valeurs moyennes et écart-types sur la totalité des amas sont données entre parenthèses.

Le nombre de molécules par cellule est estimé à partir de la concentration en considérant que celle-ci est uniformément répartie entre toutes les cellules de l'amas, assimilées à des sphères de diamètre moyen $15 \mu\text{m}$ estimé sur les images des amas et corroboré par [Benson et al., 1979; Harper et Lawson, 1985]. Les concentrations cellulaires sont assez dispersées suivant les expériences et les amas. Ceci peut provenir des cellules elles-mêmes, plus ou moins perméables selon le donneur, ainsi que de la concentration initiale de la solution de marqueurs. Remarquons que 15 amas sur les 68 imagés ont donné des résultats aberrants, principalement à cause d'une modification trop importante de leurs structures en cours d'acquisition.

Fluorophore	Produit $C\Phi$ (μM)	Concentration estimée (μM)	Nombre de molécules par cellules estimé
Protéines autofluorescentes	[1,6; 6,4] (3,1 \pm 1,4) (16)	[6,0; 24,5] (11,8 \pm 5,2)	[6,43 \times 10 ⁶ ; 2,60 \times 10 ⁷]
FM1-43	[24,0; 84,4] (57,8 \pm 18,4) (9)	[79,9; 281,3] (192,8 \pm 61,4)	[8,50 \times 10 ⁷ ; 6,11 \times 10 ⁸]
IB4-Alexa488	[1,1; 6,2] (2,3 \pm 1,5) (12)	[2,8; 15,6] (5,7 \pm 3,8)	[3,03 \times 10 ⁶ ; 1,66 \times 10 ⁷]
CFSE	[0,5; 5,6] (2,2 \pm 1,9) (9)	[0,5; 6,1] (2,4 \pm 2,1)	[4,94 \times 10 ⁵ ; 6,51 \times 10 ⁶]
DiO	[14,8; 170,8] (67,2 \pm 61,7) (7)	[36,9; 426,9] (168,0 \pm 154,3)	[3,93 \times 10 ⁷ ; 4,54 \times 10 ⁸]

TABLE III.3 – Intervalle des concentrations en molécules fluorescentes mesurées au sein des cellules nerveuses (en micromolaires μM). Entre parenthèses : moyenne et écarts-types de ces concentrations sur les (x) amas exploités.

Le contenu en protéines endogènes reste par ailleurs peu dispersé. Les protéines connues pour leurs propriétés de fluorescence sont les flavoprotéines [Benson et al., 1979] et la nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) [Huang et al., 2002]. Selon [Benson et al., 1979], la concentration cellulaire moyenne de protéines de type flavoprotéines et de ses dérivées (riboflavine, FMN et FAD) est en ordre de grandeur de 10⁷ environ. Ces résultats sont obtenus en considérant des cellules nerveuses sphériques de diamètre compris entre 7,5 μm et 15 μm . En comparant ces valeurs à celles du tableau III.3 et en se référant aux spectres d'absorption des flavines et des NAD donnés par [Baici et al., 1978], nous en déduisons que le signal d'autofluorescence émis après illumination des cellules nerveuses à 473 nm provient majoritairement de ces flavoprotéines, les NAD possédant une section efficace d'absorption à un photon quasiment inexistante à 473 nm.

Les concentrations des autres fluorophores sont plus disparates. Ceci peut s'expliquer par un marquage variable entre les cellules, ainsi que par le processus de

marquage lui-même. En effet, le FM1-43, l'IB4-Alexa488 et le DiO sont des marqueurs membranaires, avec internalisation vers les vésicules synaptiques pour le premier [Henkel et al., 1996; Duncan et al., 2004]. Cette propriété du FM1-43 permet un marquage plus homogène au sein des cellules nerveuses que le DiO, confiné dans la membrane plasmique uniquement, et que l'immunomarquage de l'IB4-Alexa488, qui reste très ponctuel car associé aux sites de fixation que sont les glycoprotéines et glycolipides de la membrane cellulaire. La CFSE doit quant à elle subir un processus de dégradation enzymatique dans le cytoplasme avant de présenter des propriétés de fluorescence. Ceci explique que le marquage par cette molécule soit plus homogène, et que les images obtenues sont semblables aux images d'autofluorescence. Cependant, toutes les cellules nerveuses ne sont pas égales en termes d'assimilation et de conversion enzymatique de la CFSE, ce qui peut expliquer la variabilité de la concentration cellulaire d'une série à une autre pour ce fluorophore.

III.6.2 Sections efficaces d'absorption à deux photons $\sigma_{abs}^{(2)}$

Les produits $C\Phi$ étant désormais connus, l'équation III.8 permet de déterminer les sections efficaces d'absorption à deux photons. Les figures III.18 et III.19 récapitulent les sections efficaces d'absorption à deux photons des 4 molécules testées ainsi que des protéines intrinsèques aux cellules nerveuses. Les sections efficaces les plus importantes sont obtenues pour l'IB4-Alexa488 et la CFSE, pour lesquels un pic d'absorption à deux photons est observé respectivement à 760 nm ($\sigma_{abs}^{(2)}$ à 28,3 GM) et 780 nm ($\sigma_{abs}^{(2)}$ à 30,1 GM), tandis que le DiO et le FM1-43 présentent leurs valeurs maximales à 890 nm (4,5 GM et 9,5 GM respectivement). À notre connaissance, les données bibliographiques concernant les sections efficaces d'absorption à deux photons de ces molécules ne donnent de résultats (1) qu'à quelques longueurs d'onde seulement et (2) en solution, dans des solvants dont la polarité n'est pas la même que celle du milieu cellulaire. Il est pourtant bien établi qu'un changement dans la polarité du solvant modifie les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence [Nag et Goswami, 2009].

Le spectre de la section efficace d'absorption à 2 photons de l'Alexa488 présente une allure similaire à celle obtenue par l'équipe de l'Université de Cornell (site internet : <http://www.drbio.cornell.edu/research.html>) sauf pour les plus basses longueurs d'onde d'excitation, comme le montre la figure III.20.

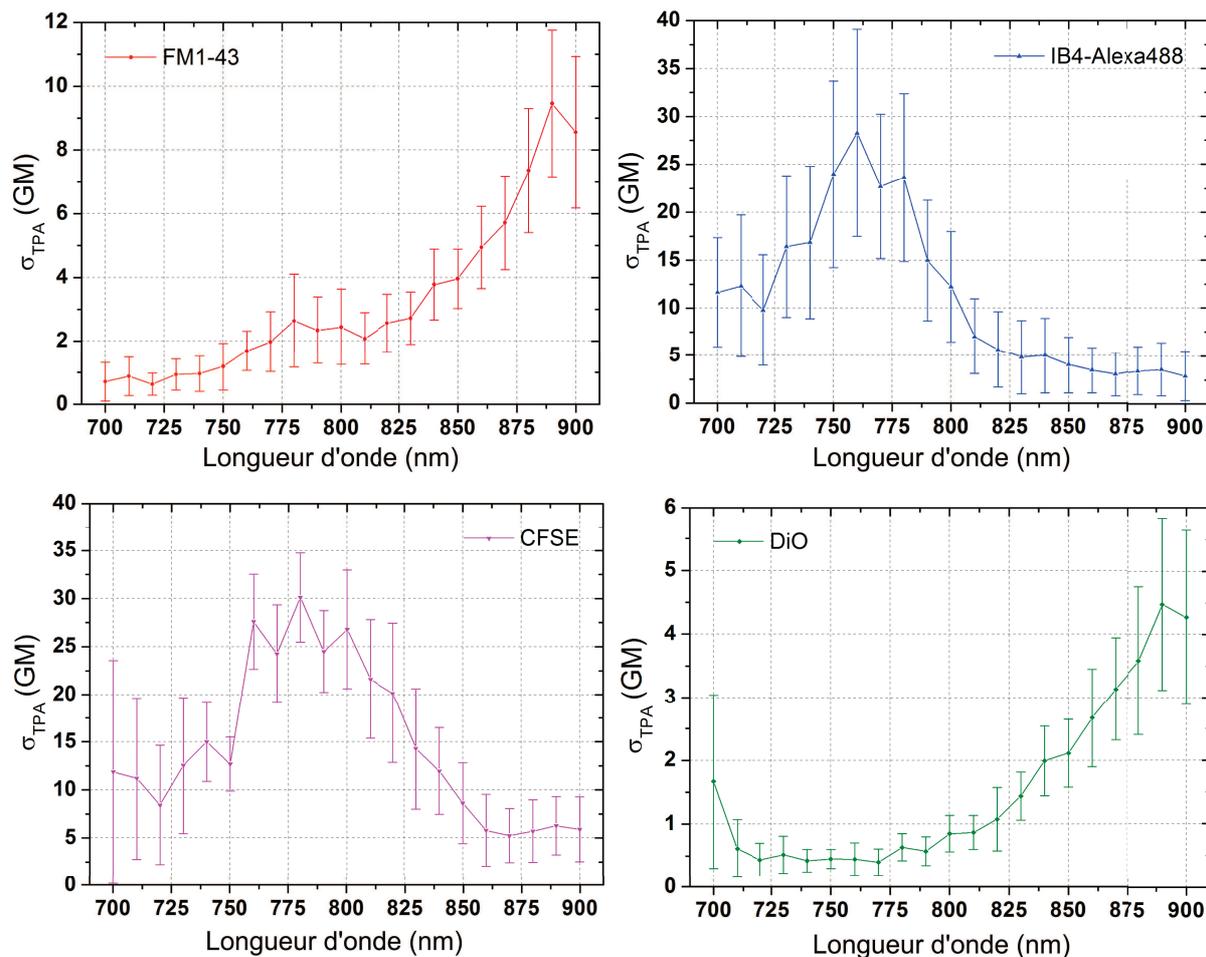


FIGURE III.18 – Sections efficaces d'absorption à deux photons des fluorophores exogènes.

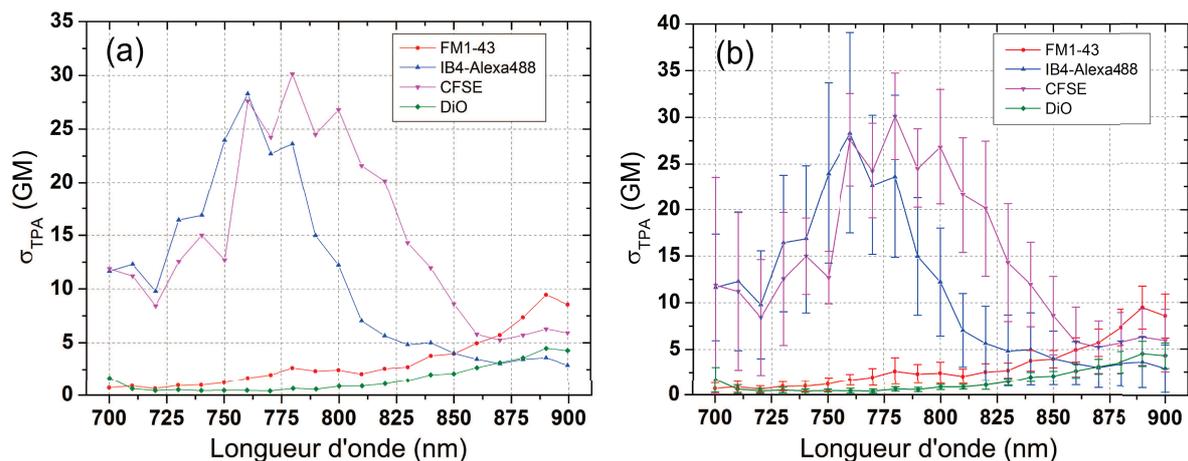


FIGURE III.19 – Sections efficaces d'absorption à deux photons des 4 groupes de molécules fluorescentes (a) sans les barres d'erreur et (b) avec les barres d'erreur.

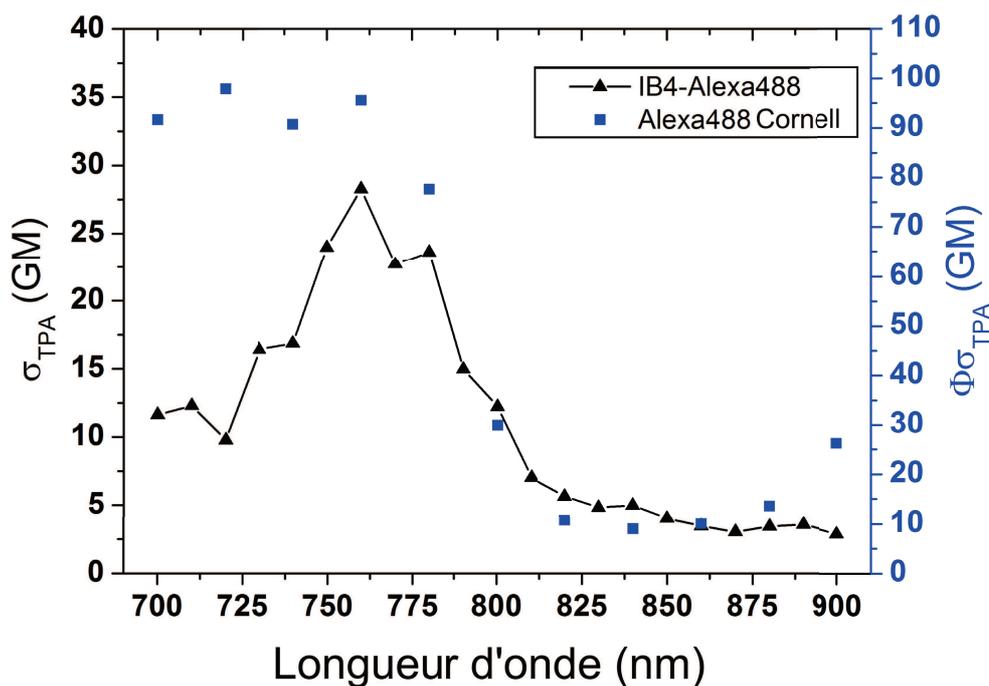


FIGURE III.20 – Section efficace d'absorption à deux photons de l'IB4-Alexa488 dans les cellules nerveuses (en noir) et section efficace d'émission à deux photons de l'Alexa488 seule dans l'eau (en bleu). Cette dernière grandeur correspond au produit du rendement quantique de fluorescence Φ et de la section efficace d'absorption à deux photons $\sigma_{\text{abs}}^{(2)}$ (source : http://www.drbio.cornell.edu/cross_sections.html).

Les résultats diffèrent cependant à la fois pour certaines longueurs d'onde (pic décalé vers le rouge de 20 nm environ) et en valeur absolue. En effet, en multipliant nos résultats par une efficacité quantique de fluorescence supposée de 40%, la section efficace d'émission à deux photons de l'IB4-Alexa488 à 760 nm dans les cellules nerveuses ($\Phi \sigma_{\text{abs}}^{(2)} \simeq 11,3$ GM) est près de neuf fois inférieure à celle de l'Alexa 488 seule dans une solution aqueuse, selon l'équipe de Cornell ($\sigma_{\text{abs}}^{(2)} \Phi \simeq 95,6$ GM). Ceci peut être imputable à la fois à l'ajout de l'anticorps IB4 à l'Alexa488, mais également à la différence de milieu environnant. Évidemment, le problème de l'environnement du fluorophore est le même pour les trois autres molécules étudiées ici. Les comparaisons "en absolu" avec les données bibliographiques est donc délicate, mais les comparaisons entre les qualités des fluorophores sont possibles au sein de notre étude.

En prenant à la fois en compte les fortes concentrations accessibles au niveau cellulaire, une section efficace d'absorption à deux photons suffisamment élevée au-delà de 780 nm et un marquage relativement homogène des structures nerveuses, le FM1-43 apparaît comme la meilleure molécule pour l'étude des cellules nerveuses issues de DRG. La CFSE est également une molécule intéressante. Cependant, sa

faible concentration cellulaire (plus de dix fois inférieure à celle du FM1-43) la rend moins intéressante que le FM1-43 au-delà de 800 nm. Par ailleurs, le protocole de marquage au CFSE est accompagné de lavages supplémentaires pour éliminer son précurseur, le CFDA qui pourrait par la suite s'infiltrer dans d'autres cellules comme celles de la peau. Les opérations de lavage sont souvent coûteuses en matériel biologique et l'on cherche toujours à en minimiser le nombre, ce qui est un argument supplémentaire en faveur du FM1-43. Les deux dernières molécules ne présentent qu'un intérêt limité du fait de l'hétérogénéité de leur marquage, rendant les contours cellulaires difficiles à imager.

III.6.3 Discussion sur l'autofluorescence

Les sections efficaces d'absorption à deux photons des protéines intrinsèques aux cellules nerveuses ont également été déterminées, parallèlement à celles des fluorophores exogènes. Puisque différentes protéines émettent un signal d'autofluorescence, le spectre que l'on obtient est un spectre moyen de toutes les contributions du signal d'autofluorescence. Le traitement de ce problème devient ainsi plus délicat que celui qui consiste à déterminer la section efficace d'absorption à deux photons d'une seule espèce moléculaire. Il peut être intéressant de comparer ce spectre aux spectres des protéines connues pour leur capacité à émettre un signal 2PEF et donnés dans la littérature pour connaître l'origine du signal d'autofluorescence dans les cellules nerveuses étudiées ici. Le spectre que l'on obtient est montré à la figure III.21, et la comparaison entre ce spectre et les spectres des riboflavines et de la NADH est donné par la figure III.22.

Il est reconnu que l'absorption à deux photons des protéines intrinsèques est d'autant plus importante que l'on se situe vers les basses longueurs d'onde [Xu et al., 1996]. L'allure du spectre d'absorption à deux photons obtenu au laboratoire sur les DRG contre-dire cette règle, puisqu'il présente un maximum à 760 nm (4,7 GM). Ceci peut comme précédemment être expliqué par l'environnement des molécules, ceintes d'un milieu cellulaire plus complexe que les solutions tampons habituellement utilisées. Les contraintes associées à ce milieu complexe peuvent expliquer ces changements en modifiant les niveaux électroniques de la molécule [Terenziani et al., 2008]. Notons que l'allure générale du spectre d'absorption à deux photons est proche de celle du spectre d'absorption à un photon [Huang et al., 2002] de molécules comme la FAD, ce qui suggère une contribution importante des flavoprotéines. De plus, comparée aux valeurs de l'équipe de l'Université de Cornell présentées à la

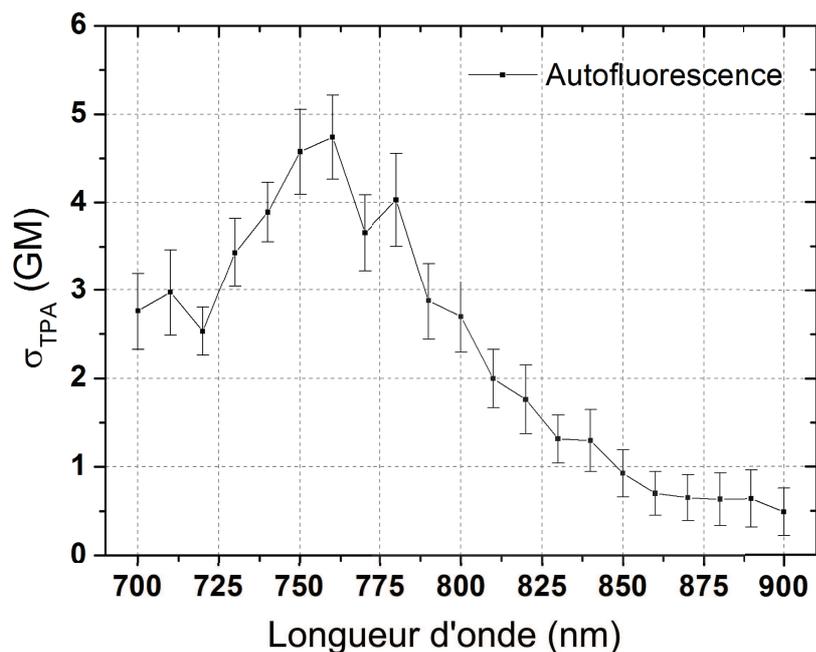


FIGURE III.21 – Section efficace d'absorption à deux photons des protéines intrinsèques aux cellules nerveuses mesurée au laboratoire.

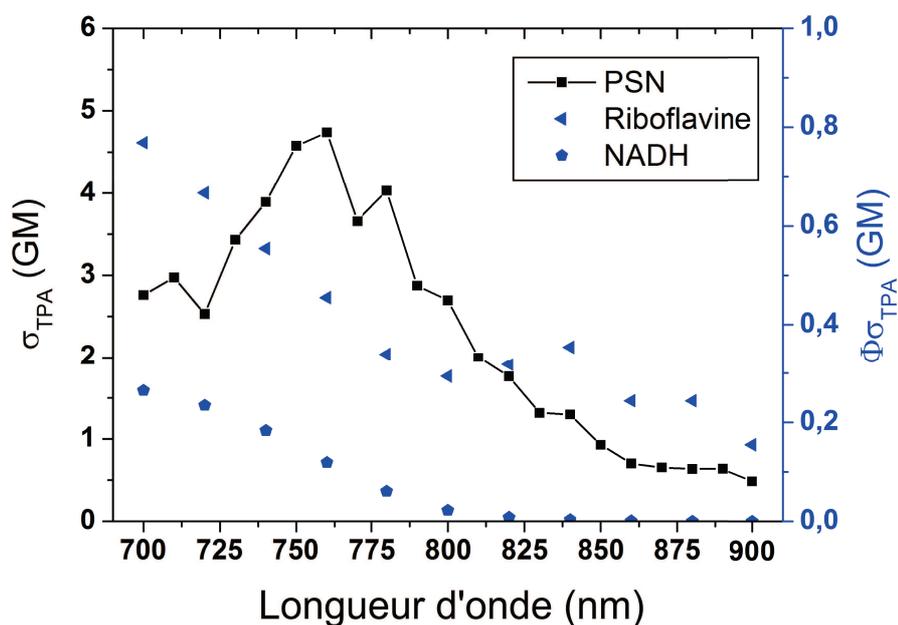


FIGURE III.22 – Section efficace d'absorption à deux photons des protéines intrinsèques aux cellules nerveuses (en noir, notre mesure) et sections efficaces d'émission à deux photons des riboflavines dans l'eau et de la NADH. Cette dernière est attachée à une enzyme, la malate déhydrogénase (MDH) (source : http://www.drbio.cornell.edu/cross_sections.html)

figure III.22, la section efficace d'émission à deux photons que l'on peut calculer à partir de nos valeurs de $\sigma_{abs}^{(2)}$ multipliées par le rendement quantique de fluorescence $\Phi = 0.26$ (cf. tableau III.2) montre une très bonne corrélation de nos résultats avec les $\sigma_{abs}^{(2)}$ des riboflavines au-delà de 820 nm.

La présence des flavoprotéines est également visible sur le spectre d'émission de l'autofluorescence (figure III.11). Ce spectre est obtenu après excitation à une longueur d'onde de 730 nm. Deux éléments apparaissent : une petite "bosse", centrée vers 470 nm et associée à l'émission des NAD et une "bosse" plus importante vers 520 nm, correspondant à l'émission des flavines [Zoumi et al., 2002]. Par ailleurs, les auteurs de ce travail, qui traite de l'émission de fluorescence endogène de fibroblastes au sein d'une matrice riche en collagène fibrillaire, indiquent également que les flavines sont moins excitables en 2 photons à 730 nm qu'à 800 nm au sein des fibroblastes, impliquant une diminution de leur section efficace d'absorption à deux photons pour les longueurs d'onde les plus courtes quand elles sont confinées dans un environnement cellulaire, ce que nos résultats confirment.

Cependant, nous ne pouvons pas valider les valeurs absolues de section efficace d'absorption à deux photons des protéines intrinsèques dans l'intervalle de longueurs d'onde entre 730 et 820 nm. Celles-ci sont en effet près de 3 fois supérieures à celles rapportées par l'équipe de l'Université de Cornell. Nous pouvons émettre deux hypothèses pour expliquer ces résultats : d'une part il n'est pas impossible que l'environnement cellulaire rende plus favorable qu'en solution l'absorption à deux photons pour ces protéines à ces longueurs d'onde, d'autre part nous pourrions sous-estimer la concentration en protéines fluorescentes. En effet, à 473 nm seules les flavines sont excitées, et la concentration obtenue par absorption à un photon est donc celle de ces protéines. Cependant, l'absorption à deux photons des NAD devient de moins en moins négligeable vers les basses longueurs d'onde [Xu et al., 1996]. Ceci impliquerait que beaucoup plus de protéines que ce que la mesure en microscopie confocale laisse penser participent à ce processus d'absorption et que les sections efficaces d'absorption à deux photons moyennes sont plus faibles que celles obtenues ici.

En conclusion, il semble y avoir une très forte contribution des flavines dans le signal d'autofluorescence des PSN. Ce fait a par ailleurs été utilisé assez récemment pour imager l'activité du cortex cérébelleux *in vivo* [Reinert et al., 2004]. Dans ce travail, les auteurs indiquent clairement que les NAD sont très limités optiquement pour réaliser une image de l'activité cérébrale du fait de leur très faible émission de fluorescence, alors que les flavines ont un potentiel plus important.

Conclusion

Nous avons montré la possibilité d'évaluer les sections efficaces d'absorption à deux photons de quatre molécules fluorescentes à l'aide d'une méthode associant microscopie confocale et microscopie à deux photons. Pour la première fois à notre connaissance, ces sections efficaces d'absorption à deux photons sont obtenues dans l'environnement cellulaire de cellules nerveuses de moelle épinière de rats nouveaux-nés. La présence de protéines intrinsèques comme les flavines et les NAD au sein de ces cellules, connues pour leur propriété d'absorption à deux photons, a été prise en compte en tant qu'offset dans le signal de fluorescence total mesuré en présence de marqueur. La sélection des régions d'intérêt doit prendre en compte les possibles modifications morphologiques des amas de cellules du fait de la durée des expériences. Sous ces conditions, nous montrons que le FM1-43 se révèle être le meilleur marqueur pour notre étude des cellules nerveuses de DRG, puisque cette molécule permet un marquage assez homogène des cellules tout en conservant une section efficace d'absorption à deux photons relativement élevée hors de la zone d'excitabilité des protéines autofluorescentes, le tout associé à concentration importante au sein des cellules, assurant une bonne qualité des images. Cette étude confirme donc notre choix du FM1-43 en imagerie de fluorescence à deux photons des amas de cellules nerveuses dans le cadre de la ré-innervation cutanée. La microscopie 2PEF à une longueur d'onde assez élevée (à partir de 830 nm, longueur d'onde pour laquelle $\sigma_{abs}^{(2)} \simeq 3 \text{ GM}$) offre potentiellement la possibilité d'atteindre de plus grande profondeur.

Ce marqueur est utilisé afin de réaliser l'imagerie 2PEF des neurones sensoriels dans la peau. La présence de collagène fibrillaire de type I dans le derme, source de second harmonique, est un atout supplémentaire de la microscopie non linéaire dans ce contexte puisqu'elle permet d'imager les modifications structurelles de la MEC en présence de fibres nerveuses. Nous montrons dans la section suivante l'intérêt de la microscopie bimodale 2PEF/SHG pour l'étude de la ré-innervation de la peau.

III.7 Imagerie de la peau ré-innervée

III.7.1 Ré-innervation de la peau

La peau a la capacité de se reconstruire une fois blessée. Pour cela, un ensemble de mécanismes biologiques est déployé, dépendant de la gravité de la blessure. Lorsque celle-ci atteint les couches les plus basses de la peau (comme une brûlure du 3^{ème} degré par exemple), les terminaisons nerveuses sont atteintes et les propriétés senso-

rielles de la peau, même reconstruite, sont atténuées voire absentes. La régénération des fibres nerveuses est complexe et encore mal comprise, notamment du fait de l'absence de techniques aptes à évaluer le développement des nerfs dans le tégument. Les coupes histologiques de la peau, bien que précieuses pour de nombreuses études structurales, ne peuvent être utilisées ici car elles figent le processus de ré-innervation. Par ailleurs, il est très compliqué de reconstruire la structure 3D des nerfs à partir d'images indépendantes obtenues sur des coupes histologiques sériées.

Des modèles expérimentaux de procédés de peau ré-innervée ont été proposés durant les quinze dernières années afin d'étudier les conditions nécessaires à une bonne croissance des fibres nerveuses issues de DRG [Hsieh et al., 1996; Gingras et al., 2003; Lebonvallet et al., 2010]. Ces techniques se basent sur une co-culture de neurones extraits de DRG et d'explants de tissu cutané. Contrairement aux techniques plus classiques de culture de peau à partir de la prolifération de kératinocytes mimant la couche épidermique, l'utilisation d'explants permet de favoriser la ré-innervation [Lebonvallet et al., 2010] comportant toutes les structures cellulaires de la peau. En mettant en contact, dans un puits de culture, les PSN extraits des DRG de rats et les explants de peau, il a pu être établi que les neurones se regroupaient en amas et fabriquaient au bout de sept jours de culture environ un réseau dense de neurites s'orientant vers l'épiderme et vers d'autres amas par effet neurotrophique (cf. figure III.23, extraite de [Lebonvallet et al., 2012]).

Le LNB de l'Université de Brest s'intéresse depuis plusieurs années à la ré-innervation cutanée. Ce laboratoire a développé un modèle expérimental de peau ré-innervée basé sur des explants humains issus de la chirurgie dans lesquels des neurones murins sont implantés et croissent *ex vivo*. L'étude de cette croissance passe nécessairement par l'imagerie; c'est donc dans ce contexte que nous avons réalisé l'étude qui suit.

III.7.2 Protocole expérimental

De manière générale, un explant est un prélèvement réalisé dans un tissu, mis en culture afin de favoriser sa survie. Les explants cutanés réalisés dans cette étude proviennent souvent de chutes de peau post-opérations chirurgicales. Les prélèvements sont effectués à l'aide d'un punch (perforatrice) à biopsie de 6 mm de diamètre; ils sont chacun placés dans un des 12 puits d'une plaque de culture contenant des neurones (PSN) extraits de DRG de rats. La préparation de ces neurones est réalisée comme indiqué à la section (cf. section III.5.1). Environ 80 000 cellules, soit un quart

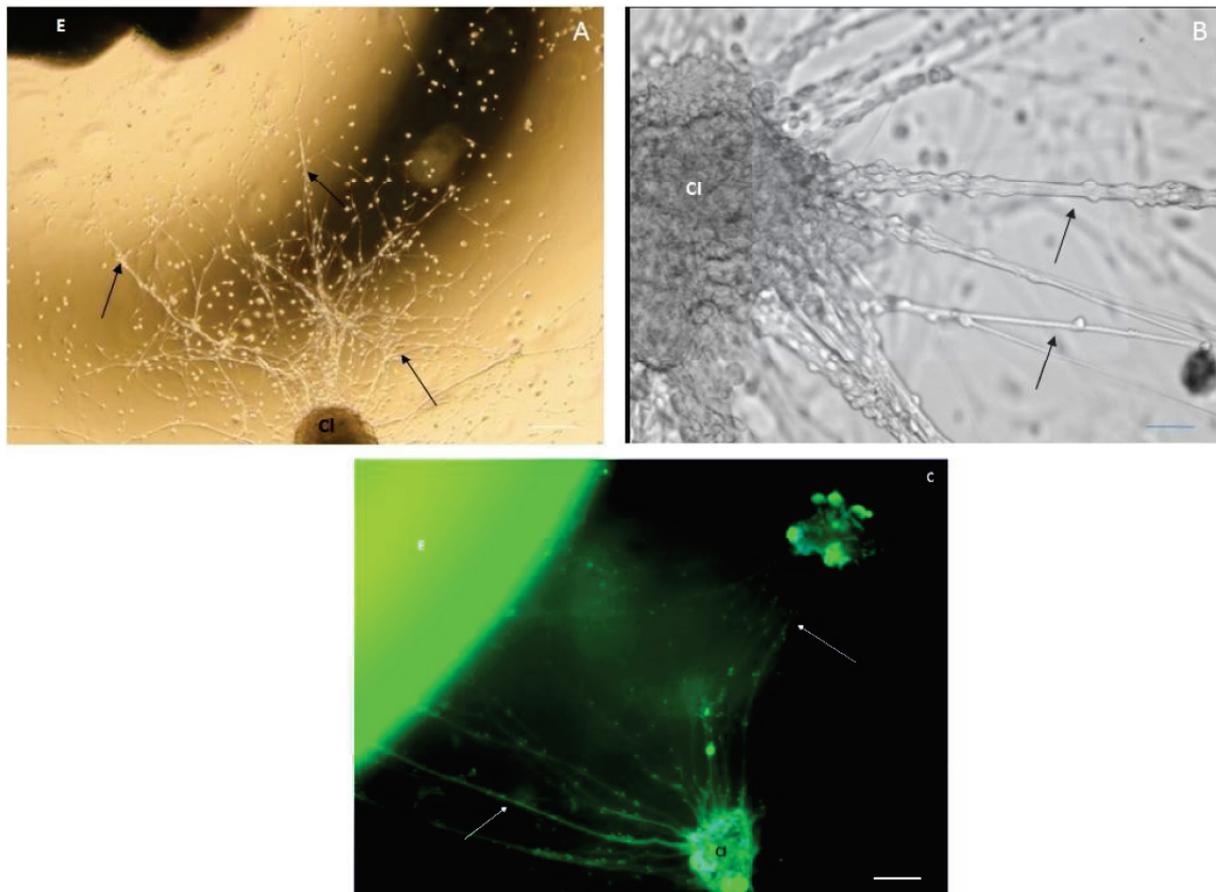


FIGURE III.23 – Neurones sensoriels primaires (PSN) en culture pendant 10 jours avec des explants de peau humaine (E). Des amas de neurones (clusters (Cl)) desquels se développent des fibres nerveuses (flèches noires) sont imagés. (A)(B) Images prises en microscopie à champ large des amas et des fibres nerveuses. (C) Imagerie de fluorescence de neurones immunomarqués par des anticorps anti-PGP9.5, une protéine majoritairement exprimée par les cellules nerveuses. Les cellules immunoréactives (en vert) sont des neurones ; leur noyau est visible par marquage au DAPI (bleu). Les flèches blanches indiquent des cellules révélées par le DAPI mais pas par l'anticorps anti-PGP9.5, suggérant qu'il ne s'agit pas de neurones. (échelle : (A)(C) : 100 μm , (B) : 20 μm).

de la population moyenne d'un DRG, sont placées dans chaque puits de culture après être passées en culture pendant 5 minutes dans une solution contenant du FM1-43. Le but de cette opération est d'amorcer un premier marquage des DRG, celui-ci devant être complété en cours de croissance des neurones pour éviter une dilution trop importante dans les nouvelles neurites. La coculture d'explants et de PSN est effectuée pendant 10 jours à l'interface air-liquide, le derme des explants étant mis en contact avec les neurones. De cette manière, les neurones peuvent développer leurs neurites dans l'explant, voire s'accrocher à celui-ci. De plus, les cellules nerveuses ont tendance à se regrouper pour reconstituer les amas de neurones propres aux

ganglions spinaux au sein même du derme.

Le milieu de culture contient une préparation de DMEM-F12 3 :1 (BE12-719F et BE12-604F/U1, Lonza Ltd) à laquelle est ajoutée de l'insuline à $5\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Sigma, I6634), de l'hydrocortisone à 10 ng.mL^{-1} (Sigma, H0135) et de la NGF à 25 ng.mL^{-1} (Sigma, N1408). Ces molécules sont connues pour participer à la croissance des neurites. Une solution de FM1-43 à $3\mu\text{M}$ est rajoutée dans un premier temps les huit premiers jours de la culture (marquage #1), puis entre le 6^{ème} et le 8^{ème} jour de culture (marquage #2). Le milieu est changé tous les deux jours.

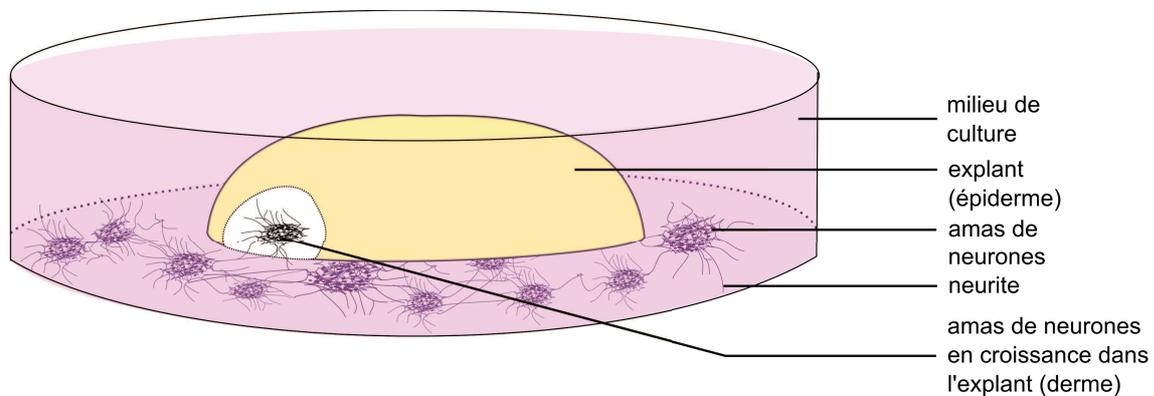


FIGURE III.24 – Schéma descriptif de la coculture des DRG avec l'explant de peau. La couleur rosée est provoquée par le DMEM-F12. L'explant ne présente ici que son épiderme, le derme étant en contact avec le tapis cellulaire formé par les amas.

Une fois les cocultures terminées, les explants sont fixés dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% et conservés dans une solution tampon de PBS (Phosphate Buffer Saline) à 4°C. L'impact de la fixation et du marquage sont discutés dans la section suivante. Le but de cette méthode est de permettre aux fibres nouvellement formées et fragiles de se maintenir après l'extraction de l'explant de son milieu de culture, opération nécessaire avant de les imager au microscope. Pour se faire, les explants sont placés à l'intérieur d'un joint torique de 2 mm d'épaisseur et 1 cm de diamètre fixé sur une lame de microscope. Un agent anti-fading est ajouté (Prolong Gold, Life Technologies, Cergy, France). Il joue le rôle d'agent de montage et sert à limiter le photoblanchiment. Les images sont réalisées à l'aide du microscope déjà décrit en introduction à une longueur d'onde d'excitation de 830 nm. Le signal 2PEF est épicollecté par la voie descannée associée à l'ouverture confocale la plus grande (ouverture #5, 5,2 mm de diamètre), tandis que la collection du signal SHG provenant du collagène fibrillaire de type I présent dans le derme se fait en transmission. L'objectif de microscope choisi est le même que celui utilisé

pour déterminer les sections efficaces d'absorption à deux photons (UPLSAPO 20X ($NA = 0,75$), Olympus).

Plusieurs explants ont été imagés afin d'évaluer l'impact de la préparation sur l'observation des amas de neurones. Certains échantillons ont été imagés sans fixation ou sans marquage pour avoir une base de comparaison avec les échantillons marqués au FM1-43.

III.7.3 Aspect des explants non innervés en microscopie 2PEF

Avant d'imager les amas de neurones et leurs neurites présents dans la peau ré-innervée, il est nécessaire de visualiser l'aspect des explants bruts. L'image 2PEF d'un explant de ce type est donnée figure III.25. L'épiderme apparaît clairement sur l'image. Les petites cellules apparentes en haut à gauche sont probablement des kératinocytes de la couche cornée, et l'autofluorescence de l'épiderme est attribuée à la kératine [Pena et al., 2005].

Nous avons réalisé le même type d'image sur un explant de peau non innervé mais cette fois-ci marqué au FM1-43 en suivant le protocole #1 afin de s'assurer que toutes les structures de la peau soient bien observables (figure III.26). L'image est obtenue avec l'objectif 4X (cf. tableau I.1), afin d'explorer la plus grande surface possible de l'échantillon et vérifier ainsi l'absence de fibre nerveuse. Le signal de fluorescence est associé au marquage de structures comme les cellules de l'épiderme et possiblement des fibres de type élastine dans le derme ainsi que des cellules de glandes (sébacées, sudoripares...). Le FM1-43 peut donc marquer d'autres structures que les cellules nerveuses si l'on suit le protocole de marquage #1. Ceci est discuté dans la section suivante.

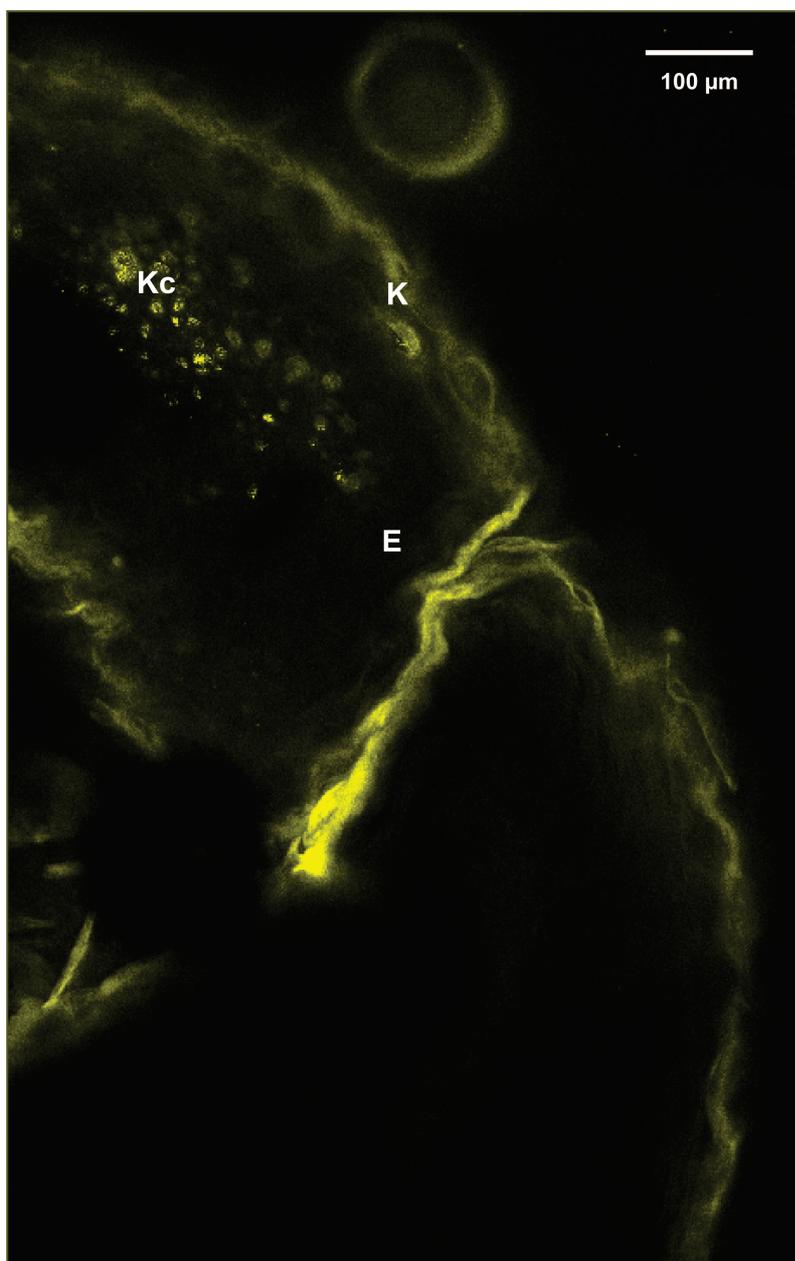


FIGURE III.25 – Image en autofluorescence d'un explant de peau non innervé, non marqué et fixé au PFA, obtenue par microscopie 2PEF à la longueur d'onde d'excitation de 830 nm. Image obtenue avec un objectif 20X ($NA = 0,75$), à une profondeur d'imagerie d'environ 70 μm sous la surface de l'explant. La puissance lumineuse moyenne est de 100 mW. E : épiderme. Kc : kératinocytes. K : kératine.

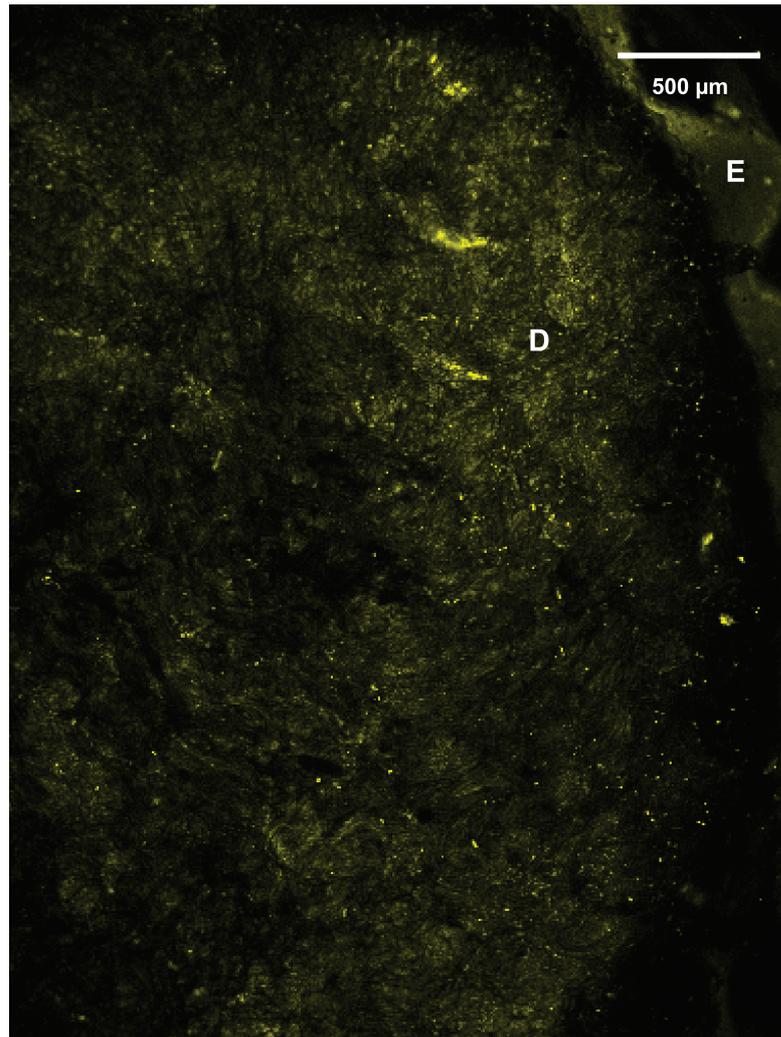


FIGURE III.26 – Image d'un explant de peau non innervé, marqué au FM1-43 et fixé au PFA. Cette image été obtenue avec l'objectif 4X décrit dans le manuscrit. E : épiderme. D : derme.

III.7.4 Influence du marquage au FM1-43 et du protocole de fixation

Nous cherchons à imagier de manière sélective les neurones et les neurites présents dans la peau. Le marquage au FM1-43 réalisé selon le protocole #1 a montré que les autres structures de la peau pouvaient être marquées. Par ailleurs, le protocole de fixation au PFA pourrait altérer la fluorescence et/ou l'échantillon lui-même. Nous avons donc imagé dans un premier temps des explants ré-innervés sans marquage préalable au FM1-43, avec et sans fixation au PFA, et dans un second temps un explant marqué au FM1-43 et fixé au PFA (figure III.27).

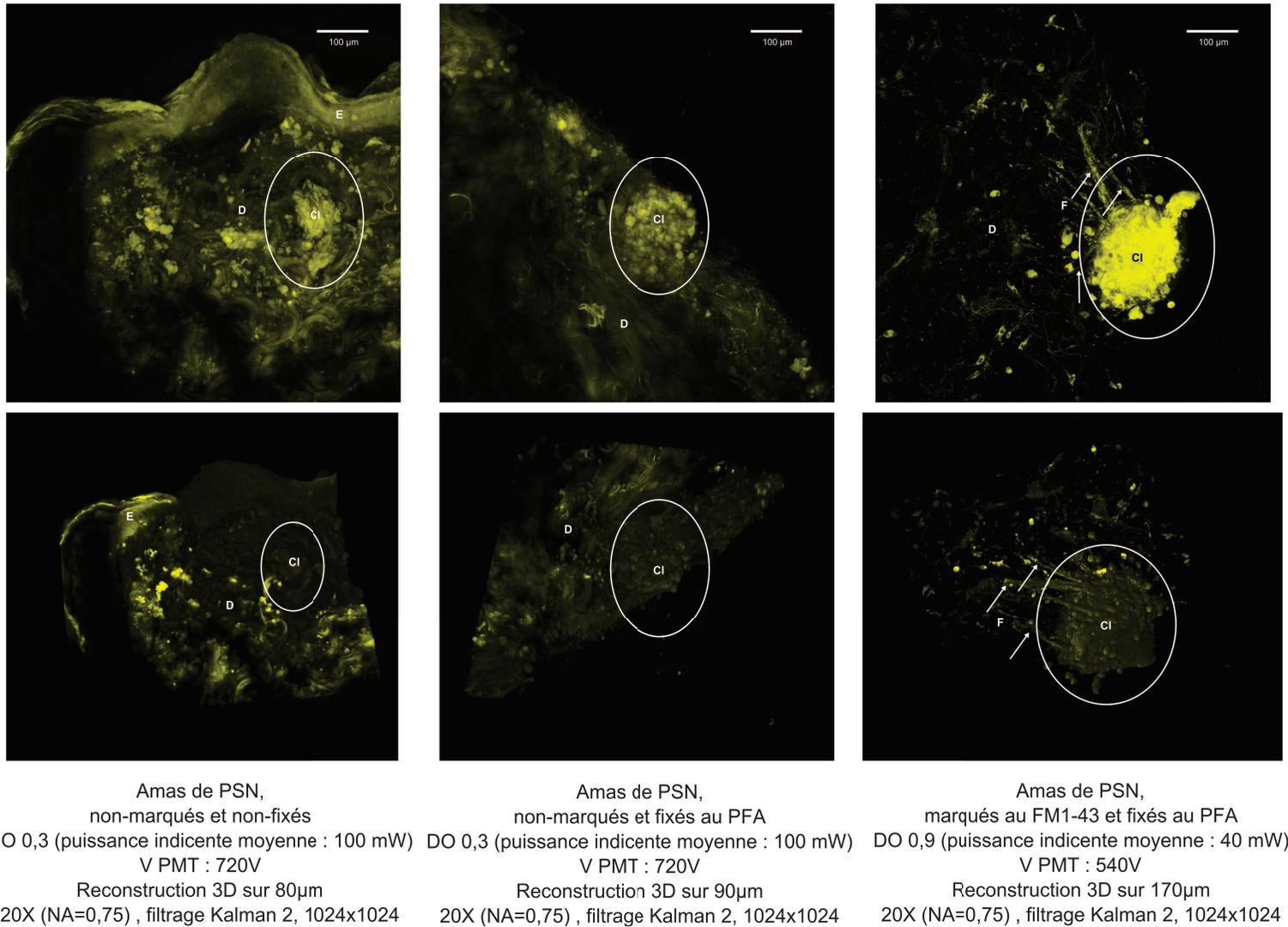


FIGURE III.27 – Images 2PEF des amas de neurones sensoriels primaires issus de DRG de rats. Ligne du haut : images uniques des explants à une profondeur intermédiaire. Ligne du bas : reconstruction 3D des mêmes zones. L'épaisseur de chaque reconstruction est donnée en légende. Les conditions d'imagerie sont données en légende (DO : densité optique du filtre neutre contrôlant la puissance laser injectée dans le microscope). E : épiderme, D : derme, Cl : cluster ou amas de neurones, F : fibres nerveuses.

Deux informations peuvent être tirées de l'examen de ces images. Tout d'abord, la fixation au PFA ne semble pas modifier la fluorescence naturelle, ni des composants du derme, ni de ceux des amas. Ces derniers ne présentent pas de modifications apparentes de leur structure. L'intérêt de la fixation au PFA est la possibilité d'observer l'échantillon beaucoup plus longtemps en-dehors du milieu de culture, la fixation ayant pour effet de figer tous les processus biochimiques.

Par ailleurs, la comparaison entre les images centrales et de droite démontre clairement l'intérêt du FM1-43 en termes de spécificité du marquage et de contraste de fluorescence qui en découle. En présence du marqueur, l'amas neuronal et les neurites se détachent nettement du reste du tissu qui autofluoresce. Les neurites peuvent ainsi être imagés sur au moins 200 μm de profondeur dans l'explant. En outre, la puissance laser nécessaire est plus faible en présence du marqueur (réduction d'un facteur de l'ordre de 2,5) et la tension du PMT abaissée d'environ 25%. Notons pour finir que l'épaisseur particulièrement grande de l'amas marqué et fixé au PFA est fortuite.

Comparaison des deux protocoles de marquage

En suivant le protocole de marquage #1, c'est-à-dire une exposition à la solution de FM1-43 pendant les huit premiers jours de la co-culture, il est très difficile de distinguer les amas de neurones de l'épiderme si ces deux structures sont proches l'une de l'autre. En effet, comme le montre la figure III.28 le FM1-43 marque de façon non spécifique les structures de l'épiderme lorsque l'explant est trop longtemps exposé au marqueur.

En cas d'exposition prolongée au FM1-43 toutes les membranes lipophiles finissent donc par être marquées, malgré la plus grande affinité du FM1-43 pour les vésicules synaptiques. Nous en avons donc conclu qu'il était nécessaire de réduire le temps d'exposition des explants au FM1-43. Puisque le réseau de neurites est déjà bien développé dès le 6^{ème} jour de coculture, nous avons décidé de rajouter le FM1-43 à partir de là et de le retirer après incubation pendant 36 heures afin de limiter le marquage des structures cellulaires autres que les neurones. Il est également intéressant de noter que le marquage au FM1-43 ne semble pas limiter ou ralentir la croissance des neurites, quelque soit le protocole utilisé.

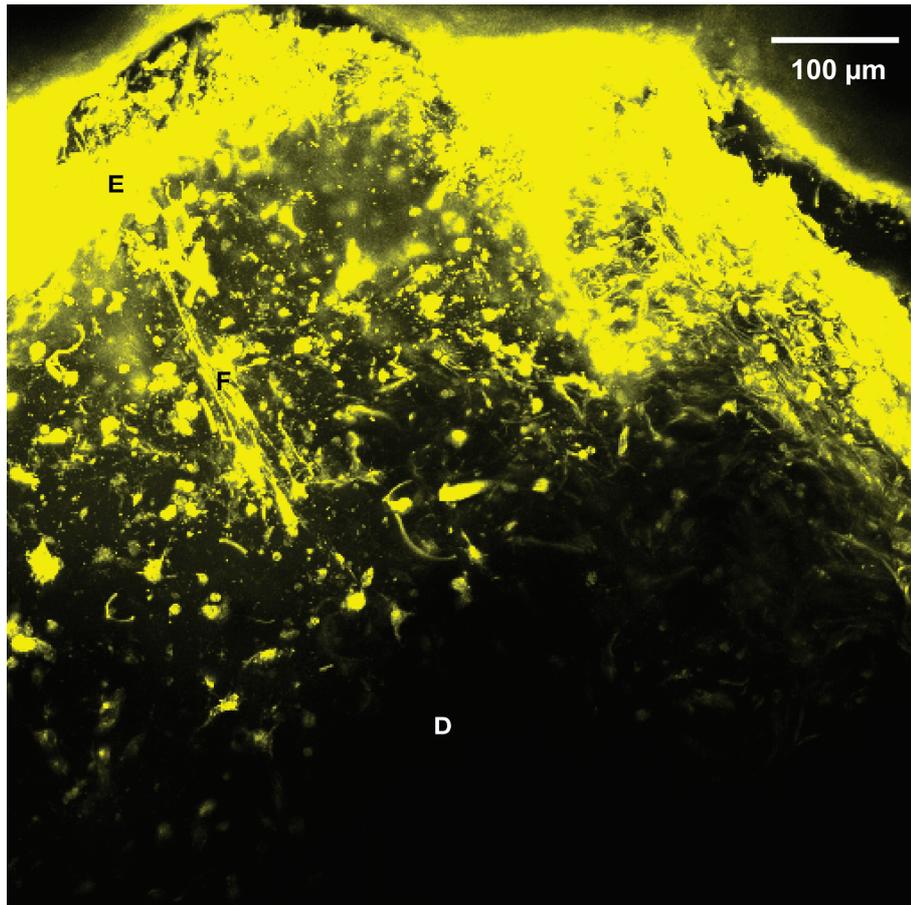


FIGURE III.28 – Explant de peau ré-innervée marqué au FM1-43 selon le protocole #1 et fixé au PFA. Cette image résulte de la superposition de 56 images acquises entre 190 et 300 μm de profondeur avec un pas de 2 μm . Définition de l'image : 512×512 pixels². E : épiderme, D : derme, F : fibres nerveuses.

III.7.5 Modifications qualitatives du derme et de l'épiderme

Lorsque l'amas croît dans l'explant, de nombreuses molécules médiatrices sont échangées entre le tissu nerveux en formation et le tissu cutané [Misery, 2000]. Ceci n'est pas sans incidences sur l'aspect général de l'amas et de l'explant dans lequel il se développe. Dans tous les explants ré-innervés étudiés, les amas se situent dans le derme. Ceci était prévisible puisque l'aire de contact entre l'explant et la culture de PSN issus des DRG de rats est située au niveau du derme. Nous avons pu imager en profondeur plusieurs amas. L'image présentée à la figure III.29 est une reconstruction tridimensionnelle d'un amas de neurones marqué au FM1-43 et imagé via l'objectif 20X. Toutes les reconstructions sont effectuées à l'aide du plug-in ImageJ 3D Viewer.

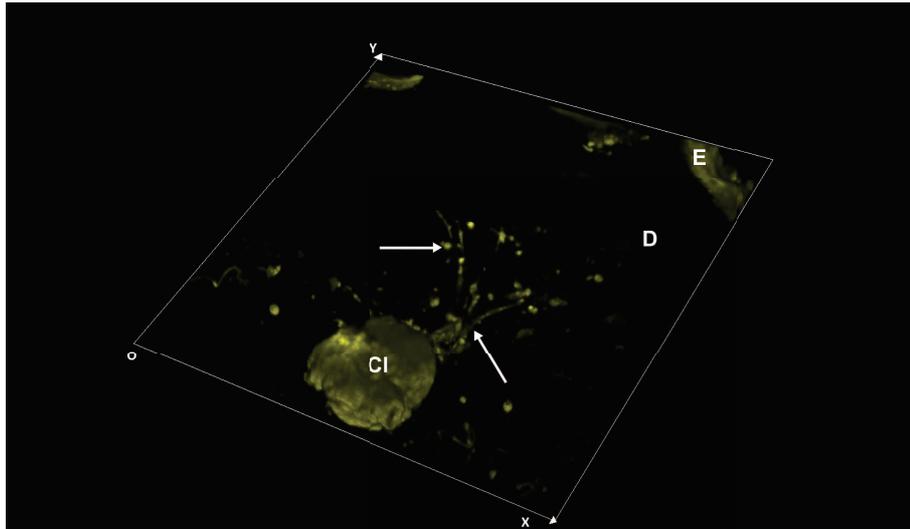


FIGURE III.29 – *Reconstruction 3D 2PEF d'un amas de neurones ré-innervant un explant de peau. Les flèches blanches indiquent les neurites néo-fabriquées par l'amas au cours de la coculture. E : épiderme, D : derme, Cl : amas. La reconstruction est effectuée sur une pile d'images prises sur 94 μm de profondeur. L'axe X mesure 704 μm et l'axe Y 680 μm .*

Comme attendu, l'amas est capable de fabriquer des neurites et ceux-ci sont imageables en microscopie 2PEF jusqu'à une profondeur d'environ 100 μm grâce au marquage au FM1-43. Le sectionnement optique lié à l'objectif de microscope est ici de l'ordre de 2,5 μm , et la résolution transverse d'environ 0,6 μm . Par ailleurs, le développement des neurites se fait clairement vers l'épiderme, ce qui montre l'impact tropique des cellules de ce dernier sur le déploiement des terminaisons nerveuses dans la peau. Nous avons également pu observer la propagation de fibres nerveuses entre deux amas le long de l'épiderme. La figure III.30 en est une illustration.

Les fibres nerveuses sont donc capables de connecter deux amas entre eux et ces amas croissent dans le derme, à la limite de l'épiderme, montrant une nouvelle fois le rôle neurotrophique de ce dernier. Par ailleurs, le collagène entoure les amas sans les pénétrer. Ce phénomène est clairement visible sur la figure III.31.

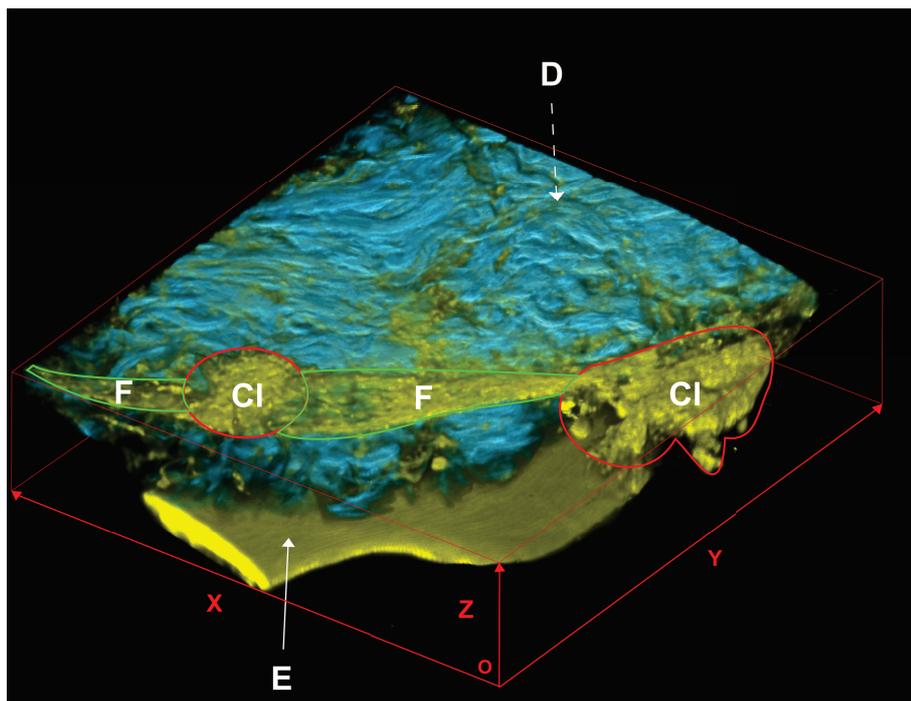


FIGURE III.30 – Reconstruction 3D en fausses couleurs de deux amas de neurones ré-innervant un explant de peau. Ces amas sont liés entre eux par des fibres nerveuses (F). Les fibres de collagène de type I constituant la MEC du derme apparaissent en bleu. E : épiderme, D : derme, Cl : amas. La reconstruction est effectuée à partir d'une pile d'images acquises sur $230\ \mu\text{m}$ de profondeur (axe Z). Les axes X et Y mesurent $707\ \mu\text{m}$.

L'exploitation du contraste SHG inhérent aux fibres de collagène de type I, est ainsi un atout puisqu'il permet ainsi de suivre l'inclusion des amas nerveux et de leurs fibres dans les explants de peau.

Conclusion

Nous avons donc validé le protocole de ré-innervation des explants de peau en imageant la structure tridimensionnelle des amas de neurones au sein de la matrice dermique. Nous pourrions étendre ce travail par une évaluation quantitative de la densité moyenne de neurites par amas et l'impact de la ré-innervation sur des paramètres comme l'épaisseur de l'épiderme. La possibilité de suivre en temps réel l'innervation des explants serait envisageable si on disposait d'une chambre de culture appropriée. Ceci permettrait également d'évaluer les modifications de structure de la peau en fonction de l'avancée du processus de ré-innervation.

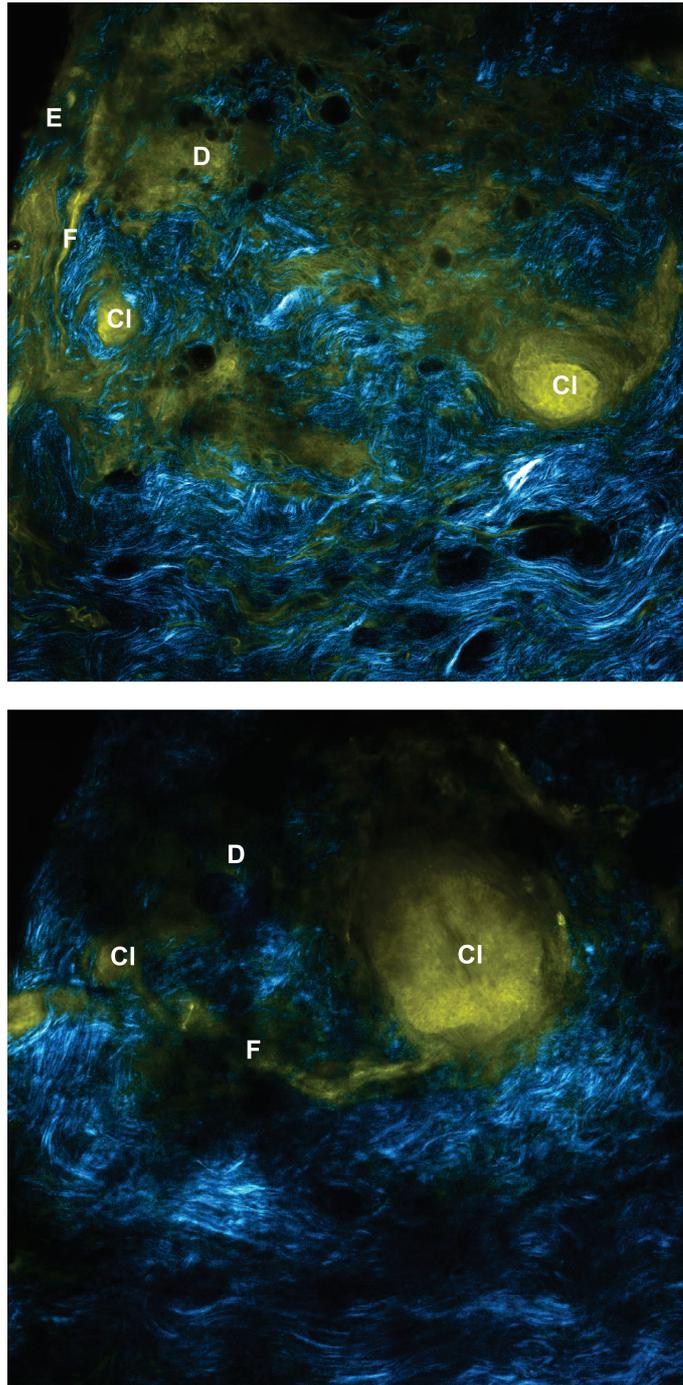


FIGURE III.31 – Explant ré-innervé présentant deux amas. Les images sont prises à des profondeurs d'imagerie différentes. En haut : amas imagés à $25\ \mu\text{m}$ sous la surface de l'échantillon. En bas : amas imagés à $75\ \mu\text{m}$ sous la surface de l'échantillon. Les fausses couleurs correspondent aux signaux de 2PEF (jaune) et SHG (fibres de collagène de type I, bleu). E : épiderme, D : derme, Cl : amas, F : fibres nerveuses. Taille de l'image : $700 \times 700\ \mu\text{m}^2$.

Bibliographie

A

- M. A. Albota, C. Xu, et W. W. Webb. Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm. *Applied Optics*, 37(31) : 7352–7356, November 1998.
- N. Axmacher, J. Winterer, P. K. Stanton, A. Draguhn, et W. Müller. Two-photon imaging of spontaneous vesicular release in acute brain slices and its modulation by presynaptic GABAA receptors. *NeuroImage*, 22(2) :1014–1021, 2004.

B

- L. Bagatolli et E. Gratton. Two photon fluorescence microscopy of coexisting lipid domains in giant unilamellar vesicles of binary phospholipid mixtures. *Biophysical journal*, 78(1) :290–305, 2000.
- A. Baici, R. Joppich-Kuhn, P. L. Luisi, A. Olomucki, M. O. Monneuse-Doublet, et F. Thomé-Beau. Fluorescence properties of reduced thionicotinamide–adenine dinucleotide and of its complex with octopine dehydrogenase. *European journal of biochemistry / FEBS*, 83(2) :601–607, February 1978.
- T. Baumgart, G. Hunt, E. R. Farkas, W. W. Webb, et G. W. Feigenson. Fluorescence probe partitioning between Lo/Ld phases in lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(9) :2182–2194, September 2007.
- R. Bazin, F. Flament, A. Colonna, R. Le Harzic, R. Bückle, B. Piot, F. Laizé, M. Kaatz, K. König, et J. W. Fluhr. Clinical study on the effects of a cosmetic product on dermal extracellular matrix components using a high-resolution multiphoton tomograph. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*, 16(3) :305–310, August 2010.

- R. C. Benson, R. A. Meyer, M. E. Zaruba, et G. M. McKhann. Cellular autofluorescence—is it due to flavins? *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 27(1) :44–48, 1979.
- A. Bouchet et J. Cuilleret. Anatomie topographique, descriptive et fonctionnelle : le système nerveux central. 1982.
- N. Boulais et L. Misery. Merkel cells. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 57(1) :147–165, July 2007.
- P. Breeuwer, J. L. Drocourt, F. M. Rombouts, et T. Abee. Energy-dependent, carrier-mediated extrusion of carboxyfluorescein from *saccharomyces cerevisiae* allows rapid assessment of cell viability by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(5) :1467–1472, January 1994.
- S. Brewer, A. Kahn, V. Dumont, et S. Tamitegama. Le corps humain guide d'anatomie. 2010.

C

- W.-F. Cheong, S. Prahl, et A. Welch. A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 26(12) :2166–2185, 1990.
- L. L. Chiu, C. H. Sun, A. T. Yeh, B. Torkian, A. Karamzadeh, B. Tromberg, et B. J. Wong. Photodynamic therapy on keloid fibroblasts in tissue-engineered keratinocyte-fibroblast co-culture. *Lasers in surgery and medicine*, 37(3) :231–244, 2005.
- S.-W. Chu, S.-Y. Chen, G.-W. Chern, T.-H. Tsai, Y.-C. Chen, B.-L. Lin, et C.-K. Sun. Studies of $\chi^{(2)}/\chi^{(3)}$ tensors in submicron-scaled bio-tissues by polarization harmonics optical microscopy. *Biophysical journal*, 86(6) :3914–3922, 2004.

D

- G. A. Di Lullo, S. M. Sweeney, J. Korkko, L. Ala-Kokko, et J. D. San Antonio. Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. *The Journal of biological chemistry*, 277(6) :4223–4231, February 2002.
- H. Diehl. Studies on fluorescein-VI absorbance of the various prototropic forms of yellow fluorescein in aqueous solution. *Talanta*, 36(3) :413–415, March 1989.

E. Dimitrow, M. Ziemer, M. J. Koehler, J. Norgauer, K. König, P. Elsner, et M. Kaatz. Sensitivity and specificity of multiphoton laser tomography for in vivo and ex vivo diagnosis of malignant melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(7) :1752–1758, 2009.

R. R. Duncan, A. Bergmann, M. A. Cousin, D. K. Apps, et M. J. Shipston. Multi-dimensional time-correlated single photon counting (TCSPC) fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to detect FRET in cells. *Journal of microscopy*, 215 (Pt 1) :1–12, July 2004.

E

C. L. Evans, E. O. Potma, M. Puoris' haag, D. Côté, C. P. Lin, et X. S. Xie. Chemical imaging of tissue in vivo with video-rate coherent anti-stokes raman scattering microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(46) :16807–16812, 2005.

G

M. Gingras, J. Bergeron, J. Déry, H. D. Durham, et F. Berthod. In vitro development of a tissue-engineered model of peripheral nerve regeneration to study neurite growth. *The FASEB journal*, 17(14) :2124–2126, 2003.

B. S. Grewal, A. Naik, W. J. Irwin, G. Gooris, C. J. de Grauw, H. G. Gerritsen, et J. A. Bouwstra. Transdermal macromolecular delivery : Real-time visualisation of iontophoretic and chemically enhanced transport using two-photon excitation microscopy. *Pharmaceutical research*, 17(7) :788–795, 2000.

H

Z. Halata, M. Grim, et K. I. Bauman. Friedrich sigmund merkel and his "Merkel cell", morphology, development, and physiology : review and new results. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*, 271(1) :225–239, March 2003.

K. M. Hanson et C. J. Bardeen. Application of nonlinear optical microscopy for imaging skin. *Photochemistry and Photobiology*, 85(1) :33–44, January 2009.

K. M. Hanson et R. M. Clegg. Observation and quantification of ultraviolet-induced reactive oxygen species in ex vivo human skin. *Photochemistry and photobiology*, 76(1) :57–63, 2002.

- K. M. Hanson, M. J. Behne, N. P. Barry, T. M. Mauro, E. Gratton, et R. M. Clegg. Two-photon fluorescence lifetime imaging of the skin stratum corneum pH gradient. *Biophysical journal*, 83(3) :1682–1690, 2002.
- M. Hara, M. Toyoda, M. Yaar, J. Bhawan, E. M. Avila, I. R. Penner, et B. A. Gilchrist. Innervation of melanocytes in human skin. *The Journal of Experimental Medicine*, 184(4) :1385–1395, January 1996.
- A. A. Harper et S. N. Lawson. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *The Journal of physiology*, 359 :31–46, February 1985.
- A. W. Henkel, J. Lübke, et W. J. Betz. FM1-43 dye ultrastructural localization in and release from frog motor nerve terminals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(5) :1918–1923, March 1996.
- A. J. Hodge, J. A. Petruska, et G. N. Ramachandran. Aspects of protein structure. 1963.
- K. Hoffmann, M. Stücker, P. Altmeyer, K. Teuchner, et D. Leupold. Selective femto-second pulse-excitation of melanin fluorescence in tissue. *Journal of Investigative Dermatology*, 116(4) :629–630, 2001.
- J. Hosoi, G. F. Murphy, C. L. Egan, E. A. Lerner, S. Grabbe, A. Asahina, et R. D. Granstein. Regulation of langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature*, 363(6425) :159–163, May 1993.
- S.-T. Hsieh, S. Choi, W.-M. Lin, Y. Chang, J. C. Mcarthur, et J. W. Griffin. Epidermal denervation and its effects on keratinocytes and langerhans cells. *Journal of neurocytology*, 25(1) :513–524, 1996.
- S. Huang, A. A. Heikal, et W. W. Webb. Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein. *Biophysical journal*, 82(5) :2811–2825, May 2002.

J

- I. Johnson. Fluorescent probes for living cells (review). *The Histochemical Journal*, 30(3) :123–140, March 1998.

K

- C. S. Koblenzer. The emotional impact of chronic and disabling skin disease : a psychoanalytic perspective. *Dermatologic clinics*, 23(4) :619–627, October 2005.
- M. J. Koehler, K. König, P. Elsner, R. Bückle, et M. Kaatz. In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography. *Optics letters*, 31(19) :2879–2881, 2006.
- K. Koenig et I. Riemann. High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution. *Journal of biomedical optics*, 8(3) :432–439, 2003a.
- K. Koenig et I. Riemann. High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution. *Journal of Biomedical Optics*, 8(3) :432–439, 2003b.
- K. König, A. Ehlers, F. Stracke, et I. Riemann. In vivo drug screening in human skin using femtosecond laser multiphoton tomography. *Skin pharmacology and physiology*, 19(2) :78–88, 2006.
- J. Koziol. Fluorometric analyses of riboflavin and its coenzymes. *Methods in enzymology*, 18 :253–285, 1971.
- T.-R. Kuo, C.-L. Wu, C.-T. Hsu, W. Lo, S.-J. Chiang, S.-J. Lin, C.-Y. Dong, et C.-C. Chen. Chemical enhancer induced changes in the mechanisms of transdermal delivery of zinc oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 30(16) :3002–3008, 2009.
- A. C. Kwan, D. A. Dombeck, et W. W. Webb. Polarized microtubule arrays in apical dendrites and axons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(32) :11370–11375, December 2008.

L

- L. H. Laiho, S. Pelet, T. M. Hancewicz, P. D. Kaplan, et P. T. So. Two-photon 3-d mapping of ex vivo human skin endogenous fluorescence species based on fluorescence emission spectra. *Journal of biomedical optics*, 10(2) :024016–02401610, 2005.
- G. Lazorthes. Le système nerveux périphérique. 1981.

- N. Lebonvallet, C. Jeanmaire, L. Danoux, P. Sibille, G. Pauly, et L. Misery. The evolution and use of skin explants : potential and limitations for dermatological research. *European Journal of Dermatology*, 20(6) :671–684, 2010.
- N. Lebonvallet, N. Boulais, C. Le Gall, U. Pereira, D. Gauché, E. Gobin, J.-O. Pers, C. Jeanmaire, L. Danoux, G. Pauly, et al. Effects of the re-innervation of organotypic skin explants on the epidermis. *Experimental dermatology*, 21(2) : 156–158, 2012.
- J.-N. Lee, S.-H. Jee, C.-C. Chan, W. Lo, C.-Y. Dong, et S.-J. Lin. The effects of depilatory agents as penetration enhancers on human stratum corneum structures. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(9) :2240–2247, 2008.
- H. Li, S. Nomura, et N. Mizuno. Binding of the isolectin i-b4 from griffonia simplicifolia to the general visceral afferents in the vagus nerve : a light- and electron-microscope study in the rat. *Neuroscience Letters*, 222(1) :53–56, January 1997.
- S.-J. Lin, S.-H. Jee, C.-J. Kuo, R. Wu Jr, W.-C. Lin, J.-S. Chen, Y.-H. Liao, C.-J. Hsu, T.-F. Tsai, Y.-F. Chen, et al. Discrimination of basal cell carcinoma from normal dermal stroma by quantitative multiphoton imaging. *Optics letters*, 31 (18) :2756–2758, 2006.
- S.-J. Lin, S.-H. Jee, C.-Y. Dong, et al. Multiphoton microscopy : a new paradigm in dermatological imaging. *Eur. J. Dermatol*, 17(5) :361–366, 2007.

M

- D. Magde, R. Wong, et P. G. Seybold. Fluorescence quantum yields and their relation to lifetimes of rhodamine 6G and fluorescein in nine solvents : improved absolute standards for quantum yields. *Photochemistry and photobiology*, 75(4) : 327–334, April 2002.
- B. R. Masters, P. So, et E. Gratton. Multiphoton excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of in vivo human skin. *Biophysical journal*, 72(6) :2405–2412, 1997a.
- B. Masters, P. So, et E. Gratton. Multiphoton excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of in vivo human skin. *Biophysical Journal*, 72(6) :2405–2412, June 1997b.
- F. Merkel. Tastzellen und tastkörperchen bei den hausthieren und beim menschen. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 11(1) :636–652, December 1875.

- L. Misery. Skin, immunity and the nervous system. *British Journal of Dermatology*, 137(6) :843–850, 1997.
- L. Misery. La peau neuronale : les nerfs à fleur de peau. 2000.
- A. Méliopoulos, C. Levacher, et L. Robert. La peau : structure et physiologie. 1998.
- W. J. Mulholland, E. A. Arbuthnott, B. J. Bellhouse, J. F. Cornhill, J. M. Austyn, M. A. Kendall, Z. Cui, et U. K. Tirlapur. Multiphoton high-resolution 3d imaging of langerhans cells and keratinocytes in the mouse skin model adopted for epidermal powdered immunization. *Journal of investigative dermatology*, 126(7) : 1541–1548, 2006.

N

- A. Nag et D. Goswami. Solvent effect on two-photon absorption and fluorescence of rhodamine dyes. *Journal of Photochemistry and Photobiology. A, Chemistry*, 206 (2-3) :188–197, August 2009.
- F. A. Navarro, P. T. So, R. Nirmalan, N. Kropf, F. Sakaguchi, C. S. Park, H. B. Lee, et D. P. Orgill. Two-photon confocal microscopy : A nondestructive method for studying wound healing. *Plastic and reconstructive surgery*, 114(1) :121–128, 2004.

O

- C. Odin, T. Guilbert, A. Alkilani, O. P. Boryskina, V. Fleury, Y. Le Grand, et al. Collagen and myosin characterization by orientation field second harmonic microscopy. *Opt. Express*, 16(20) :16151–16165, 2008.

P

- J. Paoli, M. Smedh, A.-M. Wennberg, et M. B. Ericson. Multiphoton laser scanning microscopy on non-melanoma skin cancer : morphologic features for future non-invasive diagnostics. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(5) :1248–1255, 2007.
- J. Paoli, M. Smedh, et M. B. Ericson. Multiphoton laser scanning microscopy—a novel diagnostic method for superficial skin cancers. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, 28(3) :190–195, September 2009.

- S. Pelet, M. Previte, L. Laiho, et P. So. A fast global fitting algorithm for fluorescence lifetime imaging microscopy based on image segmentation. *Biophysical journal*, 87(4) :2807–2817, 2004.
- A.-M. Pena, M. Strupler, T. Boulesteix, et M.-C. Schanne-Klein. Spectroscopic analysis of keratin endogenous signal for skin multiphoton microscopy. *Optics Express*, 13(16) :6268, 2005.
- S. Puschmann, C.-D. Rahn, H. Wenck, S. Gallinat, et F. Fischer. Approach to quantify human dermal skin aging using multiphoton laser scanning microscopy. *Journal of biomedical optics*, 17(3) :036005, March 2012.

R

- B. Rappaz, P. Marquet, E. Cuhe, Y. Emery, C. Depeursinge, et P. Magistretti. Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy. *Opt. Express*, 13(23) :9361–9373, 2005.
- K. C. Reinert, R. L. Dunbar, W. Gao, G. Chen, et T. J. Ebner. Flavoprotein autofluorescence imaging of neuronal activation in the cerebellar cortex in vivo. *Journal of Neurophysiology*, 92(1) :199–211, January 2004.
- A. Rich et F. H. Crick. The structure of collagen. *Nature*, 176(4489) :915–916, November 1955.
- B. Roediger, L. G. Ng, A. L. Smith, B. F. de St Groth, et W. Weninger. Visualizing dendritic cell migration within the skin. *Histochemistry and cell biology*, 130(6) :1131–1146, 2008.

S

- R. Saxod, L. Pays, et F. J. Hemming. Développement du système nerveux cutané. *Pathologie et biologie*, 44(10) :838–848, 1996.
- M. D. Shoulders et R. T. Raines. Collagen structure and stability. *Annual review of biochemistry*, 78 :929, 2009.
- P. So, H. Kim, et I. Kochevar. Two-photon deep tissue ex vivo imaging of mouse dermal and subcutaneous structures. *Optics Express*, 3(9) :339–350, October 1998.

F. Stracke, B. Weiss, C.-M. Lehr, K. König, U. F. Schaefer, et M. Schneider. Multiphoton microscopy for the investigation of dermal penetration of nanoparticle-borne drugs. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(10) :2224–2233, 2006.

Y. Sun, W.-L. Chen, S.-J. Lin, S.-H. Jee, Y.-F. Chen, L.-C. Lin, P. T. So, et C.-Y. Dong. Investigating mechanisms of collagen thermal denaturation by high resolution second-harmonic generation imaging. *Biophysical journal*, 91(7) :2620–2625, 2006.

T

F. Terenziani, C. Katan, E. Badaeva, S. Tretiak, et M. Blanchard-Desce. Enhanced two-photon absorption of organic chromophores : Theoretical and experimental assessments. *Advanced Materials*, 20(24) :4641–4678, 2008.

K. Teuchner, J. Ehlert, W. Freyer, D. Leupold, P. Altmeyer, M. Stücker, et K. Hoffmann. Fluorescence studies of melanin by stepwise two-photon femtosecond laser excitation. *Journal of Fluorescence*, 10(3) :275–275, 2000.

T.-H. Tsai, S.-H. Jee, J.-Y. Chan, J.-N. Lee, W.-R. Lee, C.-Y. Dong, et S.-J. Lin. Visualizing laser-skin interaction in vivo by multiphoton microscopy. *Journal of biomedical optics*, 14(2) :024034–024034, 2009a.

T.-H. Tsai, S.-H. Jee, C.-Y. Dong, et S.-J. Lin. Multiphoton microscopy in dermatological imaging. *Journal of dermatological science*, 56(1) :1–8, 2009b.

V

M. d. l. Vega, M. Marin, N. Kondo, K. Miyauchi, Y. Kim, R. F. Epand, R. M. Epand, et G. B. Melikyan. Inhibition of HIV-1 endocytosis allows lipid mixing at the plasma membrane, but not complete fusion. *Retrovirology*, 8(1) :99, December 2011.

W

A. Y. Wang, C. A. Foss, S. Leong, X. Mo, M. G. Pomper, et S. M. Yu. Spatio-temporal modification of collagen scaffolds mediated by triple helical propensity. *Biomacromolecules*, 9(7) :1755–1763, July 2008.

H. Wang, B. Robertson, et G. Grant. Anterograde transport of horseradish-peroxidase conjugated isolectin b4 from griffonia simplicifolia i in spinal primary sensory neurons of the rat. *Brain Research*, 811(1–2) :34–39, November 1998.

- R. Wang, M. Hosaka, L. Han, H. Yokota-Hashimoto, M. Suda, D. Mitsushima, S. Torii, et T. Takeuchi. Molecular probes for sensing the cholesterol composition of subcellular organelle membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(10) :1169–1181, October 2006.
- R. Westerman, R. Carr, C. Delaney, M. Morris, et R. Roberts. The role of skin nociceptive afferent nerves in blister healing. *Clinical and experimental neurology*, 30 :39–60, 1992.
- L. G. Whitby. A new method for preparing flavin-adenine dinucleotide. *Biochemical Journal*, 54(3), 1953.
- J. Winterer, P. K. Stanton, et W. Müller. Direct monitoring of vesicular release and uptake in brain slices by multiphoton excitation of the styryl FM® 1-43. *BioTechniques*, 40(3) :343–350, 2006.
- O. S. Wolfbeis. Molecular luminescence spectroscopy : Methods and applications. May 1985.

X

- C. Xu, W. Zipfel, J. B. Shear, R. M. Williams, et W. W. Webb. Multiphoton fluorescence excitation : new spectral windows for biological nonlinear microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(20) :10763–10768, January 1996.

Y

- A. T. Yeh, B. Kao, W. G. Jung, Z. Chen, J. S. Nelson, et B. J. Tromberg. Imaging wound healing using optical coherence tomography and multiphoton microscopy in an in vitro skin-equivalent tissue model. *Journal of biomedical optics*, 9(2) : 248–253, 2004.
- B. Yu, C.-Y. Dong, P. T. So, D. Blankschtein, et R. Langer. In vitro visualization and quantification of oleic acid induced changes in transdermal transport using two-photon fluorescence microscopy. *Journal of investigative dermatology*, 117(1) : 16–25, 2001.

Z

- A. Zoumi, A. Yeh, et B. J. Tromberg. Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(17) :11014–11019, August 2002.

Chapitre IV

Microscopie à deux photons et fibrose hépatique

IV.1 Introduction

La fibrose hépatique est un symptôme évolutif de l'agression chronique du foie. Elle se traduit par une accumulation de collagène cicatriciel, empêchant l'organe de fonctionner correctement. Au dernier stade de son évolution, la fibrose est qualifiée de cirrhose, dont la principale complication est l'hémorragie hépatique provoquant le décès du patient. L'évaluation de l'avancée de cette maladie est réalisée par l'analyse anatomopathologique de coupes histologiques et passe par l'utilisation d'échelles semi-quantitatives dont les plus connues sont les échelles METAVIR et Ishak. Ces échelles permettent d'orienter le diagnostic et la prise en charge du patient.

Nous proposons dans ce chapitre d'étendre la méthode de scoring SHG, déjà décrite pour l'étude de la fibrose hépatique par microscopie non linéaire dans la thèse de T. GILBERT, à l'étude d'une nouvelle cohorte de patients dont la fibrose est la conséquence d'une infection par le virus de l'hépatite C. Les scores SHG obtenus via cette technique sont comparés à l'échelle METAVIR et, pour la première fois, à l'échelle Ishak.

Nous présentons dans un premier temps quelques généralités sur la fibrose hépatique et les outils de diagnostic connus à ce jour pour l'évaluer. La méthode de scoring SHG est rappelée dans un second temps, puis nous l'appliquons à une cohorte de patients. Nous proposons ensuite des outils de traitement d'image pour exploiter le plus pertinemment possible l'information qu'elles contiennent, notamment dans

des situations particulières où les échantillons présentent des structures parasites empêchant d'obtenir de manière satisfaisante le score SHG. Enfin, au-delà de la simple évaluation de la quantité de collagène, nous envisageons d'autres critères de discrimination de la fibrose hépatique qui permettraient d'améliorer le diagnostic.

IV.2 Généralités sur la fibrose hépatique

IV.2.1 Le foie

Le foie est un organe filtrant présent chez les vertébrés. Il assure à la fois les fonctions d'épuration du sang, de synthèse et de stockage [Couinaud, 1957]. Il est composé en grande partie de cellules spécifiques, les **hépatocytes**, et sa vascularisation est assurée par un réseau de veines et d'artères qui lui sont propres (veines hépatiques et artères hépatiques). Ce réseau s'infiltré dans tout l'organe sous forme de sinusoides et de capillaires, faisant de celui-ci l'un des mieux irrigués du corps humain. Anatomiquement, le foie est découpé en lobules, groupements de cellules hépatiques dont la forme dépend de l'agencement des canaux sanguins et des voies biliaires intrahépatiques concentrés dans les espaces interstitiels entre chaque lobule, appelés espaces portes. Ces espaces sont riches en tissus conjonctifs (**matrice extracellulaire**, ou MEC) et s'organisent en lame basale notamment autour des vaisseaux sanguins et des canaux biliaires. La MEC participe de manière générale au maintien de la structure globale du foie.

IV.2.2 La fibrose hépatique

Quelques chiffres autour de la fibrose

La fibrose hépatique est un symptôme du dysfonctionnement du foie caractérisé par l'accumulation de matrice extracellulaire (MEC) sous forme de tissu cicatriciel. Ce tissu, généré par les cellules stellaires, est composé de fibres de collagène de type I et III. Lors d'atteintes chroniques du foie, un dépôt progressif de collagène cicatriciel est observé. Au dernier stade de cette évolution (cirrhose), le foie ne joue plus son rôle de filtre ni de stockage. La principale complication associée à la cirrhose est l'hémorragie massive, qui entraîne la mort de l'individu [Cadier-Lagnès et al., 2009]. Les origines de ces atteintes chroniques sont nombreuses : absorption répétée de toxines (alcool), de médicaments (atteintes médicamenteuses), obésité (excès en lipides), excès en fer ou atteintes chroniques d'origine virale (hépatites virales A (VHA), B (VHB) ou C (VHC)).

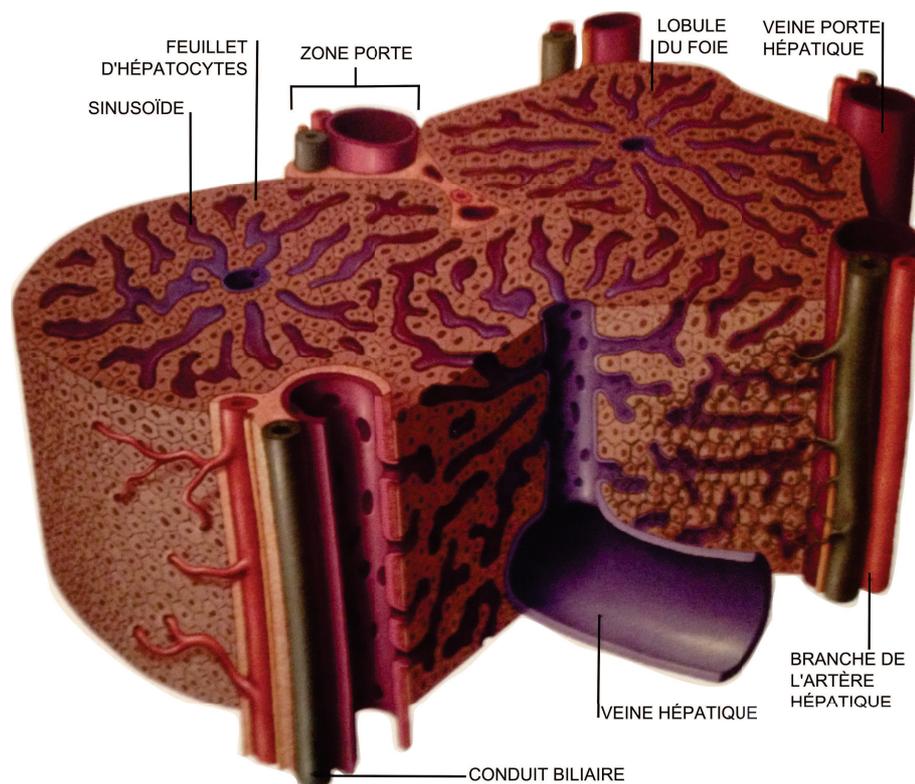


FIGURE IV.1 – Structure du foie humain [Brewer et al., 2010].

Les conséquences des infections virales sur le foie ne sont que depuis peu reconnues comme un important problème de santé par les organismes de santé internationaux. La première résolution de l'Assemblée mondiale de la Santé qui reconnaît la gravité de ce problème ne date que de 2010, date à partir de laquelle l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a appelé à une vigilance particulière et à l'augmentation du dépistage de ces infections. La mise en place de la Journée mondiale de lutte contre l'hépatite en 2011, célébrée tous les 28 juillet, et la création du Réseau Mondial de l'hépatite en juin 2013 constituent l'aboutissement de cette démarche.

Les décès associés aux complications de ces infections (majoritairement hépatiques) sont établis à près de 1 million de personnes chaque année dans le monde, dont 122 000 en Europe [Organisation Mondiale de la Santé, 2010]. Il est estimé qu'environ 57% des cirrhoses et 78% des carcinomes hépatiques (cancers du foie) sont imputables aux seules infections par le VHB ou le VHC [Perz et al., 2006]. Les signes cliniques de ces infections sont souvent asymptomatiques et leur évolution est lente. Lorsque les premiers signes de maladie apparaissent, il est souvent trop tard pour guérir le patient, d'où l'appellation d'"épidémie silencieuse", de nombreuses

personnes porteuses des virus les transmettant souvent sans en avoir conscience. Au stade terminal, on estime ainsi que le coût associé au traitement de l'hépatite C est bien supérieur à 100 000\$ par patient, en ne prenant en compte que le coût des méthodes de diagnostic et celui des traitements chroniques ou basés sur une greffe de foie [El Khoury et al., 2012]. Il a par ailleurs été montré récemment que malgré la faiblesse des symptômes, la productivité des personnes infectées par le virus de l'hépatite C serait globalement diminuée par rapport à celle de personnes saines, engendrant des pertes économiques non négligeables [Su et al., 2010]. L'urgence de la situation est également révélée par l'étude de [Deuffic et al., 1999] pour laquelle un pic de prévalence des cancers du foie est prévu dans les années 2015 pour les hommes et 2020 pour les femmes, en France.

Mécanisme originel de la fibrose : la fibrogénèse

Une agression chronique du foie entraîne une nécroinflammation des tissus, c'est-à-dire la destruction des hépatocytes associée à une réaction inflammatoire mettant en jeu les cellules de l'immunité (cellules de Kupffer) et les cellules étoilées du foie [Lamireau et al., 2002]. De manière générale, tout tissu détruit est réparé par le remplacement progressif des cellules détruites et par un processus de fabrication de la MEC afin de retrouver un tissu de structure normale. La fibrose est un processus dynamique lié à la dérégulation des processus de génération (fibrogénèse) et de dégradation (fibrolyse) de la MEC consécutive à l'inhibition de certaines enzymes de dégradation (comme les matrice-métalloprotéases). On observe alors une accumulation progressive de tissu cicatriciel. Un foie cirrhotique contient ainsi environ six fois plus de MEC qu'un foie sain. Le point de départ de cette accumulation varie suivant l'étiologie de la maladie. Elle est par exemple située autour des zones portales dans le cas d'une infection par le VHC.

Le dépôt matriciel est principalement constitué de collagène fibrillaire de type I. L'interaction du réseau de collagène avec les cellules environnantes modifient progressivement leurs comportements et certains marqueurs membranaires apparaissent en cours de fibrose. Par ailleurs, l'accumulation de tissu cicatriciel dans les espaces portes et périsinusoïdaux modifie l'élasticité globale du tissu, les dépôts de collagène formant une matrice rigide dont le coefficient d'élasticité est largement diminué. Les altérations du tissu hépatique sont schématisées sur la figure IV.2.

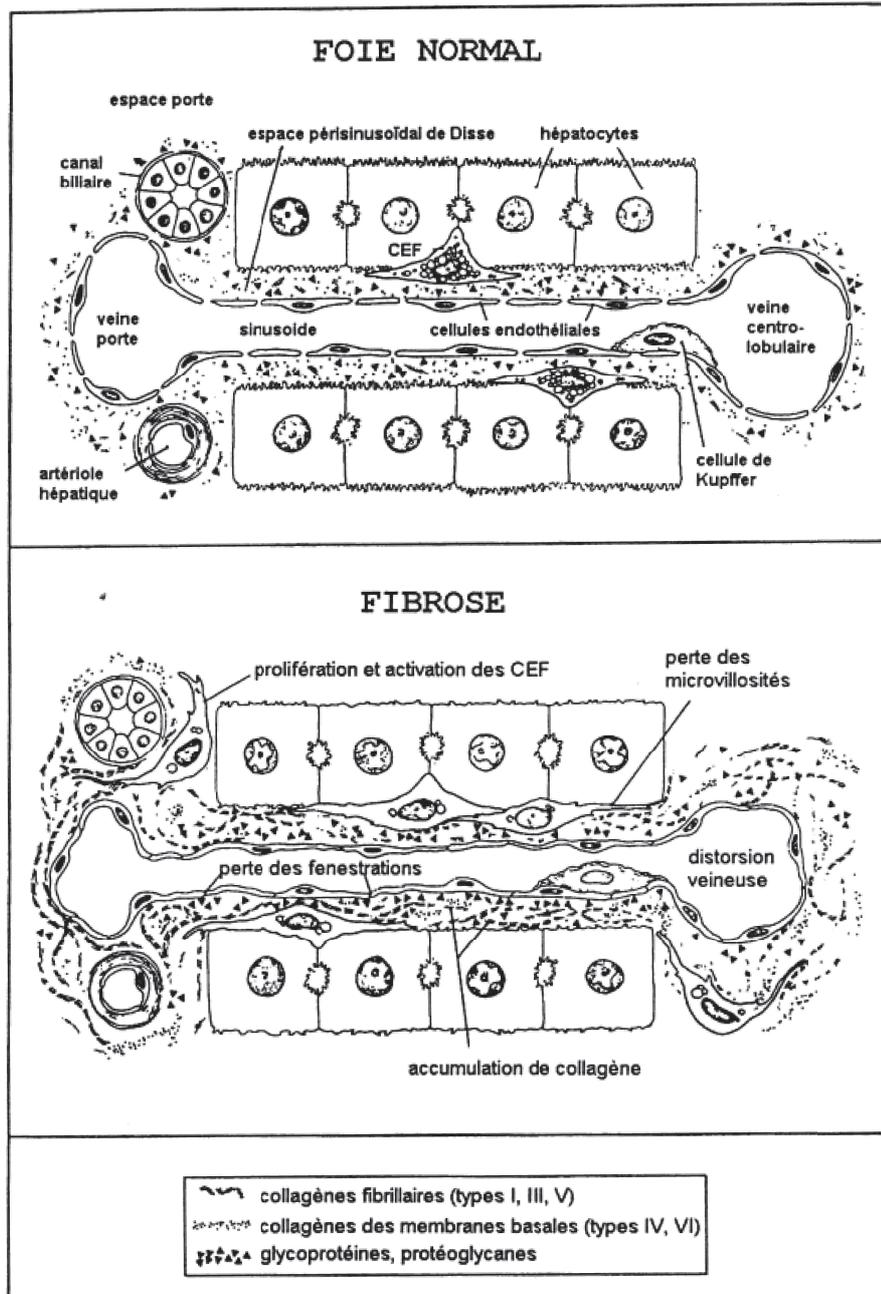


FIGURE IV.2 – Altérations des cellules hépatiques et de la matrice extracellulaire en cas de fibrose hépatique. La fenestration permet, dans le foie sain une grande perméabilité des capillaires sanguins sinusoiïdaux qui communiquent ainsi très efficacement avec les hépatocytes. En cas de perte de fenestration, l'activité métabolique des hépatocytes est largement diminuée et l'augmentation de la rigidité des sinusoiïdes provoque une augmentation de la pression portale [Lamireau et al., 2002].

IV.2.3 Diagnostic de la fibrose hépatique

La Haute Autorité de Santé française (HAS) a publié en 2006 un document répertoriant les différentes méthodes d'évaluation de la fibrose hépatique cliniquement adaptées au diagnostic de la fibrose associée à une infection par le VHC [Haute Autorité de Santé, 2006]. Le groupe de travail recommande ainsi trois techniques : la ponction-biopsie hépatique (PBH), les marqueurs sanguins et l'élastographie impulsionnelle ultrasonore. Les techniques d'imagerie appliquées au diagnostic de la fibrose comme l'échographie abdominale [Aubé et al., 1999] ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM) de diffusion [Aubé et al., 2004] sont actuellement reconnues comme insuffisantes pour délivrer un diagnostic précis. Nous faisons dans la suite un rapide bilan de ces méthodes, en gardant en tête que seule une analyse comparée des résultats obtenus via ces méthodes permet de poser un diagnostic fiable.

La référence : la PBH

Historiquement, la biopsie du foie est une des plus anciennes techniques de diagnostic des maladies chroniques de cet organe, décrite pour la première fois par Paul Ehrlich il y a plus de 130 ans [Fierbinteanu et al., 2011]. La biopsie du foie et son analyse anatomopathologique basée sur l'observation des structures remarquables de coupes histologiques de foie est devenu l'examen de référence (*Gold Standard*) pour évaluer l'avancée de la fibrose hépatique, ceci pour deux raisons. En premier lieu, l'analyse directe des structures de l'organe malade permet un diagnostic précis et indiscutable de la pathologie. De plus, il s'agit de la seule technique efficace pour évaluer l'avancée de la fibrose [Goodman, 2007]. L'examen anatomopathologique agit donc comme une référence lorsqu'une description qualitative précise est requise.

La PBH, dans sa forme de "biopsie à l'aiguille", consiste à prélever sous anesthésie un morceau de foie à l'aide d'une aiguille appropriée. Afin d'éviter un effet d'échantillonnage qui pourrait sous-évaluer des stades très avancés comme la cirrhose, il est recommandé de prélever un morceau d'environ 25 mm de long [Bedossa et al., 2003] pour une section de quelques centaines de μm . L'échantillon d'organe issu du prélèvement est d'abord finement découpé et un marquage des fibres de collagène de la MEC au rouge Sirius [Gheyle et al.; Montes, 1996] est réalisé. Ce marqueur permet de colorer spécifiquement les fibres de collagène en rouge, facilitant leur observation en microscopie à champ large. À partir de cet examen, plusieurs échelles semi-quantitatives ont été créées pour décrire l'avancée de la maladie. Ces échelles ont pour but général de proposer un diagnostic précis de la maladie et par conséquent un traitement adapté. Elles se basent sur trois paramètres :

- une classification à partir de **l'étiologie**, déterminée par des paramètres indépendants à la PBH.
- la **gravité** et la **distribution** de l'activité nécro-inflammatoire (le "grade" histologique).
- le **degré de fibrose** (le "stade" histologique).

Deux échelles se distinguent par leur usage de routine à l'échelle internationale : l'échelle METAVIR [The METAVIR cooperative group, 1993] et l'échelle Ishak [Kamal Ishak, 1995]. Bien qu'elles décrivent de manière différente les mécanismes caractéristiques de la fibrose déclenchée par une infection au VHC, des équivalences entre ces deux échelles ont été démontrées [Shiha et Zalata, 2011].

Échelle METAVIR

Le grade d'activité de l'hépatite s'échelonne de **A0** (pas d'activité de nécrose ni d'inflammation) à **A3** (activité sévère). Ces grades sont relatifs à l'état général des espaces portes (de peu/pas altérés à l'altération prononcée dans tous les espaces portes de la biopsie) et à la quantité extrapolée de nodules nécro-inflammatoires à l'échelle d'un lobule du foie (plus ces nodules sont nombreux, plus le grade est élevé). Le stade de l'hépatite est quant à lui relatif à l'étendue de la fibrose. Cinq niveaux sont associés à l'échelle METAVIR : **F0**, pas de fibrose ; **F1**, fibrose portale sans septa ; **F2**, fibrose portale avec peu de septa ; **F3**, nombreux septa sans cirrhose ; **F4**, cirrhose. Une fibrose est considérée comme cliniquement significative si son stade est supérieur ou égal au stade **F2**. Les termes "fibrose portale" insistent sur l'origine de la fibrose, c'est-à-dire les espaces portes, et les "septa" sont des ponts de collagène entre ces espaces portes.

Échelle Ishak

Le score Ishak est établi à partir de l'ancien système de Knodell. L'activité nécro-inflammatoire est divisée en quatre sous-échelles, prenant en compte la nécrose fragmentaire des espaces portes, la nécrose confluyente dans les lobules du foie, l'inflammation locale et l'apoptose et enfin l'inflammation portale. À cela s'ajoute le stade de fibrose réparti sur 7 échelons : **I0**, pas de fibrose ; **I1**, quelques espaces portes (EP) présentant une fibrose étendue, avec ou sans septa de petite taille ; **I2**, grand nombre d'EP présentant une fibrose étendue, avec ou sans septa de petite

taille ; **I3**, grand nombre d'EP présentant une fibrose étendue, avec des ponts d'EP à EP ; **I4**, fibrose portale étendue avec des ponts d'EP à EP et d'EP à espace central (EC) (veines centro-lobulaires incluses) ; **I5**, fibrose portale étendue avec des ponts EP-EP et EP-EC avec quelques nodules (cirrhose incomplète) ; **I6**, cirrhose probable ou définitive. Les nodules cirrhotiques sont des zones de régénération dans lesquelles les hépatocytes n'arrivent plus à assurer leurs fonctions du fait d'une mauvaise disposition architecturale. Les stades METAVIR et Ishak ainsi que leur équivalence sont récapitulés sur la figure IV.3.

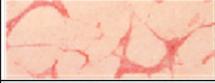
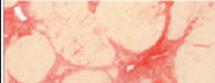
	Description Stade Ishak	ISHAK	METAVIR
	Pas de fibrose (foie normal)	10	F0
	Quelques EP présentant une fibrose étendue, avec ou sans septa de petite taille	11	F1
	Grand nombre d'EP présentant une fibrose étendue, avec ou sans septa de petite taille	12	F2
	Grand nombre d'EP présentant une fibrose étendue, avec des ponts d'EP à EP	13	
	Fibrose portale étendue avec des ponts d'EP à EP et d'EP à EC	14	F3
	Fibrose portale étendue avec des ponts EP-EP et EP-EC avec quelques nodules (cirrhose incomplète)	15	
	Cirrhose probable ou définitive	16	F4

FIGURE IV.3 – Stades de fibrose METAVIR et Ishak. Les images de gauche sont obtenues par microscopie en lumière blanche de coupes histologiques de biopsies de foie marquées au rouge Sirius.

Bien que la PBH soit considérée comme le standard dans le diagnostic et l'évaluation de l'avancée de la fibrose hépatique, son utilisation n'est pas anodine. En effet, la biopsie hépatique reste un geste invasif dont le risque de complications graves, c'est-à-dire nécessitant une hospitalisation du patient, était de près de 3‰ avec un risque de mortalité évalué à près de 0,3‰ en France (année 2000) [Cadranel et al., 2000].

Par ailleurs, les variabilités intra-opérateur et inter-opérateur au niveau du diagnostic de la fibrose hépatique ne sont souvent pas négligeables. Ainsi, il a été montré qu'un même médecin devant analyser à l'aveugle deux lames de foie issues de PBH de lobes gauche et droit d'un même patient donne en moyenne une différence de

score d'au moins un stade entre les deux biopsies dans 33% des cas, et de deux stades dans 3% des cas [Regev et al., 2002]. Dans 14,5% des cas, une cirrhose peut être diagnostiquée pour un lobe mais pas pour l'autre. Enfin, le coût total de l'acte de biopsie est évalué par la HAS à près de 1000 €.

Malgré ces inconvénients la PBH n'en reste pas moins la méthode la plus sensible, la plus précise et la plus fiable pour le diagnostic de la fibrose hépatique. La section suivante présente les efforts menés ces dernières années pour proposer des techniques alternatives aussi efficaces mais moins invasives que la PBH.

Tests sanguins

La fibrose hépatique perturbe l'expression de certaines protéines. Le bilan sanguin initial (transaminases, numération des plaquettes, prothrombine...) ne présentant pas de marqueurs fiables de fibrose, des analyses comparées de la quantité dans le sang de différentes protéines doivent être menées. Ces mesures produisent des scores composites performants mais nécessitant souvent une analyse complémentaire. Parmi ces tests se trouvent le Fibrotest[®], qui combine l'évaluation de cinq marqueurs sériques avec un ajustement selon le sexe et l'âge du patient [Poynard et al., 2003], le Fibromètre[®] [Calès et al., 2005] et l'Hepascore [Adams et al., 2005]. Les tests basés sur la mesure des concentrations en marqueurs spécifiques à la MEC (acide hyaluronique, collagènes...)(score ELF[™] de Siemens AG, par exemple) présentent des résultats intéressants qui restent à confirmer par des études complémentaires. Il faut noter que ces méthodes, basées sur une simple analyse sanguine, sont peu contraignantes et économiquement rentables, mais malheureusement pas suffisamment spécifiques à la fibrose. Ainsi la présence d'une inflammation d'origine non hépatique, d'un sepsis, d'une hémolyse ou d'une thrombopénie peuvent fausser les résultats de ces analyses [Fierbinteanu et al., 2011].

Elastographie impulsionnelle

Un dispositif médical prometteur, l'élastographe (Fibroscan[®]), a été développé il y a quelques années à partir d'une étude de 2003 sur les modifications de l'élasticité du foie en présence de fibrose [Sandrin et al., 2003]. Cette étude a corrélé l'augmentation de la rigidité des tissus hépatiques à l'augmentation de la concentration en collagène.

Une onde sismique basse fréquence (50 Hz) est générée par un dispositif vibrant adapté entre les côtes du patient, à la surface de la peau, en regard du lobe hépatique droit. La vitesse de propagation des ondes dépend de leur fréquence (fixée par l'émetteur) et du coefficient d'élasticité du milieu de propagation. La mesure de cette vitesse permet alors de remonter au stade de la fibrose à l'aide d'une grille de mesure (cf. figure IV.4). Cette technique est suffisamment développée pour que la HAS la recommande depuis 2009 comme examen de première intention dans l'évaluation de la fibrose associée à une infection au VHC isolée, ou dans l'évaluation de la cirrhose dans le cadre d'une co-infection VIH/VHC.

Les valeurs de coefficient d'élasticité critiques pour poser un diagnostic évolutif de la fibrose n'ont cependant pas encore été standardisées, et pas assez de données existent sur l'impact d'un traitement médical approprié sur la mesure de ce coefficient. Par ailleurs, la condition physique du patient (obésité...) et la présence de co-infections diminuent la fiabilité de cette méthode. Enfin, cette technique est bien adaptée aux stades les plus avancés de la fibrose mais ne permet pas un découpage précis de l'avancée de la maladie aux stades inférieurs.

Le schéma de la figure IV.4 présente les répartitions statistiques en boîtes à moustaches de différentes méthodes non invasives en fonction des stades METAVIR. Le tableau donne l'AUROC (*Area Under Receiver Operating Characteristics*) associé à ces techniques, un outil statistique d'évaluation d'une méthode de diagnostic qui sera expliqué à la section IV.2.4. Ces données serviront à évaluer la pertinence de la méthode de scoring SHG utilisée dans nos travaux.

Des techniques plus récentes existent, comme l'élastographie par résonance magnétique (MRE) [Huwart et al., 2008] dans laquelle l'élastographie classique est couplée à la technique d'imagerie par résonance magnétique. Cette technique est plus coûteuse et plus chronophage que l'élastographie, mais peut être employée si le patient est obèse. L'imagerie par force acoustique (ARFI) détermine quant à elle l'élasticité du foie à partir de la mesure de la vitesse des ondes de cisaillement provoquées par la propagation d'ondes ultrasonores à hautes fréquences dans le foie [Friedrich-Rust et al., 2009]. Cette technique est rapide, adaptée aux patients obèses et peut être implantée dans les échographes déjà existants. Enfin, une méthode originale propose d'évaluer l'activité du foie en mesurant, au spectromètre infrarouge, la quantité de CO₂ marqué au ¹³C expirée par le patient, après l'ingestion et la métabolisation de produits nutritifs marqués de cette manière [Braden et al., 2005]. Cette mesure est ensuite corrélée à un stade de fibrose supérieur à F2.

	Technique	Échelle de comparaison	Diagramme en boîte	AUROC																											
Marqueurs sanguins	Fibrotest®	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Indice Fibrotest</th> <th>METAVIR</th> <th>Ishak</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0.73-1.00</td><td>F4</td><td>F6</td></tr> <tr><td>0.73-0.74</td><td>F3-F4</td><td>F5</td></tr> <tr><td>0.59-0.72</td><td>F3</td><td>F4</td></tr> <tr><td>0.49-0.58</td><td>F2</td><td>F3</td></tr> <tr><td>0.32-0.48</td><td>F1-F2</td><td>F2-F3</td></tr> <tr><td>0.28-0.31</td><td>F1</td><td>F2</td></tr> <tr><td>0.22-0.27</td><td>F0-F1</td><td>F1</td></tr> <tr><td>0.00-0.21</td><td>F0</td><td>F0</td></tr> </tbody> </table> <p>(1)</p>	Indice Fibrotest	METAVIR	Ishak	0.73-1.00	F4	F6	0.73-0.74	F3-F4	F5	0.59-0.72	F3	F4	0.49-0.58	F2	F3	0.32-0.48	F1-F2	F2-F3	0.28-0.31	F1	F2	0.22-0.27	F0-F1	F1	0.00-0.21	F0	F0	<p>(2)</p>	0,86 ⁽³⁾
	Indice Fibrotest	METAVIR	Ishak																												
0.73-1.00	F4	F6																													
0.73-0.74	F3-F4	F5																													
0.59-0.72	F3	F4																													
0.49-0.58	F2	F3																													
0.32-0.48	F1-F2	F2-F3																													
0.28-0.31	F1	F2																													
0.22-0.27	F0-F1	F1																													
0.00-0.21	F0	F0																													
	Fibromètre®	<p>(1)</p>	<p>(1)</p>	0,91 ⁽²⁾																											
Elastométrie impulsionnelle	Fibroscan®	<p>(1)</p>	<p>(4)</p>	0,91 ⁽⁴⁾																											

FIGURE IV.4 – Exemples de résultats obtenus pour trois techniques d'évaluation non invasive de la fibrose hépatique. Deux tests sont basés sur des mesures de concentrations de marqueurs sanguins (Fibrotest® et Fibromètre®) dont les valeurs s'échelonnent entre 0,0 et 1,0. Le Fibroscan® donne le coefficient d'élasticité du foie, d'unité le kiloPascal (kPa). Les références dont sont issues ces données sont :

- (1) : extrait de la présentation de P. CALÈS (CHU d'Angers), 32ème journées du Gerico (2012).
- (2) : [Leroy et al., 2007].
- (3) : extrait de la présentation de B. GULBIS et P. THIRY (Hôpital Erasme, Bruxelles) lors des Jeudis de Fleurus (2010).
- (4) : extrait de la présentation de M. BEAUGRAND (Hôpital Verdier, Université Paris XIII) pour la 6ème Journée Paris - Ile-de-France sur l'état de l'Art en Endoscopie Digestive (2006).

Nous insistons une nouvelle fois sur le fait que ces méthodes non invasives ne peuvent pas se suffire à elles-mêmes mais doivent souvent être associées. Actuellement, le diagnostic de la fibrose ne peut se passer de la PBH. C'est dans ce contexte que s'inscrit la méthode de scoring SHG que nous présentons dans la section suivante.

IV.2.4 Scoring SHG adapté à la fibrose hépatique

Le diagnostic et l'évaluation du stade de la fibrose par un examen anatomopathologique passe par la coloration de lames minces de biopsies de foie à l'aide d'un agent de contraste spécifique au collagène, le rouge Sirius. Cependant, ce marqueur nécessite une manipulation supplémentaire des échantillons, ce qui alourdit les protocoles expérimentaux. Par ailleurs, cette approche souffre de la variabilité intra et inter-anatomopathologistes ainsi que de la variabilité de la coloration et de son évolution au cours du temps. Il existe donc un besoin de développer un outil quantitatif robuste et rapide qui permettrait de s'affranchir de l'étape préalable de coloration de la MEC et ainsi de gagner un temps considérable dans l'observation des échantillons.

Nous avons vu dans le chapitre précédent que les fibres de collagène de type I et III produisent un signal de second harmonique (SHG) (cf.section III.2.3). Des travaux précurseurs sur l'imagerie du collagène fibrillaire par génération de second harmonique ont été menés sur des tissus biologiques variés et ont montré la capacité de cette technique à imagier spécifiquement et avec une très haute résolution les fibres de collagène et leur orientation au sein de tissus biologiques variés [Odin et al., 2008c,a]. L'imagerie SHG du collagène fibrillaire a également montré son potentiel dans l'observation des modifications de structures de la MEC et/ou du contenu en collagène fibrillaire dans le cas de maladies présentant une prolifération de cette molécule aussi bien dans les reins [Strupler et al., 2007], dans les poumons [Pena et al., 2007] ou encore dans l'étude du cancer ovarien [Campagnola, 2011]. Il a récemment été proposé d'utiliser l'imagerie de second harmonique des fibres de collagène pour apprécier les différents stades de la fibrose du foie [Gailhouste et al., 2010; Guilbert et al., 2010].

Nous nous appuyons sur les résultats obtenus lors des travaux de thèse de T. GUILBERT [Guilbert, 2010], eux-mêmes précédés de ceux de L. GAILHOUSTE [Gailhouste, 2009] qui ont consisté à développer un outil de quantification automatisé de la fibrose par microscopie SHG du collagène fibrillaire de lames de foie fibrosé : le scoring SHG. Ces travaux sont présentés dans la section suivante, et c'est à partir

de cette base de connaissances que nous avons cherché à améliorer la méthode de scoring SHG en proposant de nouvelles modalités au traitement des images et en montrant l'intérêt de cette méthode pour distinguer les stades de fibrose définis par l'échelle METAVIR et, pour la première fois, par l'échelle Ishak.

IV.3 Méthode de scoring SHG

L'évaluation de l'avancée de la fibrose par la méthode de scoring SHG requiert a priori un échantillonnage spatial le plus exhaustif possible visant à évaluer à la fois la quantité et la répartition en volume du collagène fibrillaire de type I. Cet échantillonnage passe par l'imagerie SHG à haute résolution spatiale (objectifs à fort NA), ce qui conduit à devoir acquérir, manipuler et traiter une très grande quantité d'images [Strupler et al., 2007; Pena et al., 2007]. Cette approche très précise est évidemment coûteuse en temps d'acquisition, en espace mémoire, en temps de traitement d'image et d'exploitation des données. Elle s'avère donc inadaptée à l'évaluation rapide de la quantité de collagène fibrillaire sur un grand nombre de coupes histologiques minces (5 à 10 μm d'épaisseur), demandée par les hépatologues.

Dans ce contexte, il a été montré que la microscopie non linéaire à faible résolution spatiale (objectif de faible NA) permettait d'obtenir un score SHG de manière rapide et fiable à partir d'un nombre limité d'images peu résolues échantillonnant l'ensemble de la coupe histologique [Guilbert et al., 2010].

Principe

La principale hypothèse de la méthode de scoring SHG est l'existence d'une corrélation entre le stade de la fibrose et la quantité de collagène fibrillaire de type I. Le but de la méthode est donc d'évaluer cette quantité de collagène. Pour cela, il est nécessaire de définir un protocole expérimental reproductible, permettant de comparer la quantité de collagène entre des échantillons de stades très différents. Cette méthode doit autant que possible permettre d'éliminer la contribution du collagène de la MEC du foie initialement sain, c'est-à-dire le collagène non associé à la fibrose (collagène basal).

Pour ce faire, la méthode retenue consiste à seuiller les images de second harmonique, dans l'hypothèse où le collagène basal produit un signal SHG plus faible et est réparti de façon relativement homogène dans le foie. En effet, l'examen des histo-

grammes d'intensité des zones non fibrosées et fibrosées, ces dernières apparaissant clairement sur les images SHG brutes, montre que les pixels des zones fibrosées ont une intensité SHG moyenne très forte par rapport au reste du tissu hépatique. Il est donc naturel de fixer une valeur de seuil en intensité t , de telle sorte que la valeur de chaque pixel d'intensité $I < t$ soit ramenée à 0, et celle de chaque pixel d'intensité $I \geq t$ à 1 (opération de binarisation de l'image). Ainsi, dans la méthode développée au cours de la thèse de T. GUILBERT [Guilbert, 2010], le ratio du nombre de pixels à 1 au nombre total de pixels N de la coupe histologique de foie définit le score SHG $S(t)$, qui formellement s'écrit de la manière suivante :

$$S(t) = \frac{1}{N} \sum_{i,j} H(I_{ij} - t) \quad , \quad (\text{IV.1})$$

où I_{ij} est l'intensité SHG du pixel situé à la i -ème ligne et la j -ème colonne et $H(x)$ la fonction de Heaviside, nulle pour $x < 0$ et égale à 1 sinon. Le score SHG issu de la méthode de scoring correspond donc à l'aire relative de la coupe histologique occupée par les pixels associés aux fibres de collagène dont l'intensité SHG est supérieure à un seuil prédéfini, dont on suppose qu'elles sont d'origine fibrotique.

L'intérêt de définir un score SHG basé sur la mesure d'un nombre de pixels relatif au-dessus d'un certain seuil en intensité, plutôt que de mesurer l'intensité SHG proprement dite, est essentiellement lié à la nature de la SHG. En effet, la dynamique en intensité des signaux SHG produits par le collagène fibrillaire est énorme du fait de la nature cohérente du phénomène et probablement aussi d'une très large diversité de tailles des fibres de collagène. Comme on l'a vu au chapitre I, l'intensité SHG est proportionnelle au carré de la concentration moléculaire lorsque les molécules ou les assemblées de molécules sont orientées parallèlement les unes aux autres, ce qui est le cas pour l'ultra-structure du collagène fibrillaire de type I. Dans ces conditions, il est difficile, voire impossible compte-tenu de la dynamique de la chaîne d'acquisition du signal d'un microscope et du rapport signal à bruit dans l'image (numérisation sur 12 bits dans le cas de notre microscope et temps de résidence par pixel inférieur à $10 \mu\text{s}$), d'imager à la fois les très petites fibres de collagène, qui ont tendance à être noyées dans le bruit de l'image, et les plus grosses fibres de collagène qui ont tendance à saturer l'image. Le fait de pouvoir travailler sur des images saturées permet alors de ne pas perdre d'information relativement aux pixels de faible intensité, qui regroupent une grande partie de l'information relative à la fibrose (voir les histogrammes de l'intensité SHG dans la suite du manuscrit), tout en comptant les pixels dont l'intensité est saturée.

En outre, afin de pouvoir faire des mesures reproductibles dans le temps (à des moments différents) et l'espace (éventuellement sur d'autres microscopes), il est indispensable de définir une méthode de calibration ou d'étalonnage en intensité du microscope. Au cours des travaux de thèse de L. GAILHOUSTE [Gailhouste, 2009], il a été montré qu'il était possible d'utiliser comme référence interne l'intensité SHG produite par les zones non fibrosées des échantillons. En effet, si on compare les intensités SHG moyennes produites par des échantillons de foie sain (stade F0), à l'intensité moyenne de zones apparaissant non fibrosées (en fait quasiment "noires") dans les images d'échantillons fibrosés, on s'aperçoit que leurs valeurs sont égales, à la variabilité intra-échantillon naturelle près.

Il a de plus été montré, dans le travail de thèse de T. GUILBERT qui a suivi, que l'intensité moyenne correspondant à ce signal SHG basal devait être ajustée à environ 4% de l'intensité de saturation de l'image pour permettre à la fois de faire sortir l'ensemble des structures fibrillaires du signal de bruit ou du fond de l'image, tout en évitant de saturer l'électronique d'acquisition du signal d'image du microscope (dans ce cas l'acquisition de l'image par le microscope s'interrompt automatiquement pour éviter une dégradation des détecteurs). Donc, dans une série de coupes histologiques préparées dans les mêmes conditions (en général, une cohorte de patients suivis dans le même hôpital), il suffit de prendre au hasard une lame, de rechercher dans son image SHG une zone "noire" et de régler les paramètres du microscope (puissance laser et/ou tension de PMT) de manière à ce que l'intensité SHG de cette zone soit d'environ 4% (soit le niveau 164 en intensité pour notre microscope qui numérise le signal d'image sur 12 bits). Ensuite, on conserve ces réglages pour imager l'ensemble des échantillons de la cohorte, ce niveau restant constant quelque soit le stade de la fibrose, comme le montre la figure IV.5.

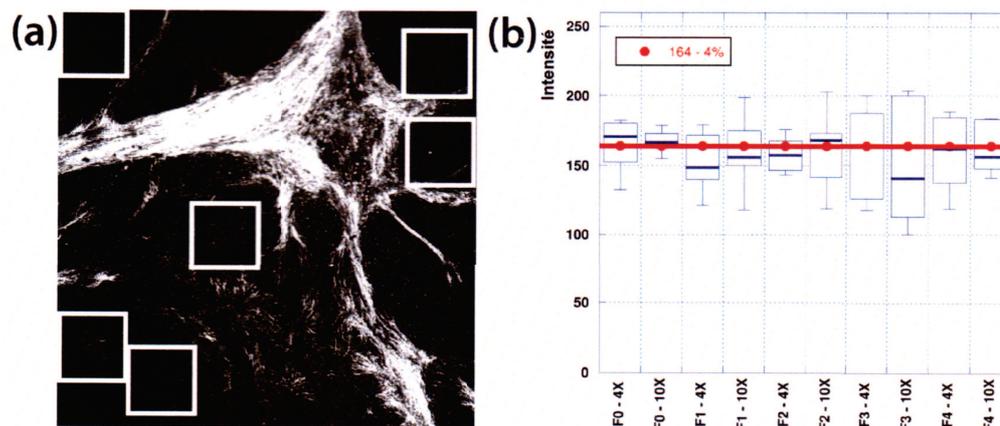


FIGURE IV.5 – a) Exemple de sélection de 6 ROIs de 80×80 pixels² de MEC saine sur une image SHG de foie fibrosé au stade F₄ prise avec l'objectif 4X ($NA = 0,1$). b) Dispersion de l'intensité moyenne des ROIs sélectionnées sur différentes images à tous les stades METAVIR. Le gain du PMT est identique entre toutes les acquisitions. Il a été ajusté pour obtenir une valeur de r de 4%, soit une intensité moyenne de 164 u.a. environ sur l'image de foie au stade F₀ (ligne horizontale) (extrait de [Guilbert, 2010]).

Une fois l'ensemble des images acquises, il faut choisir un seuil de binarisation. Au cours des travaux de thèse cités précédemment, il a été montré qu'un seuil de binarisation correspondant à 25% de l'intensité de saturation de l'image (soit le niveau 1024 en intensité pour notre microscope), permettait d'obtenir la plus grande dynamique possible du score SHG (rapport du nombre de pixels SHG allumés au nombre total de pixels de la biopsie) en fonction du score METAVIR. Nous avons mesuré les histogrammes des intensités SHG des zones fibrosées et non fibrosées d'un échantillon de foie à un stade de fibrose très avancé afin de rendre compte des distributions des intensités dans ces zones (figure IV.6). Nous nous sommes donc placés dans ces conditions pour toute notre étude, menée en collaboration avec une équipe de médecins de Digestive disease centre de Nottingham (GB) qui nous ont sollicités au vu des travaux publiés à l'occasion des thèses citées précédemment [Gailhouste et al., 2010; Guilbert et al., 2010].

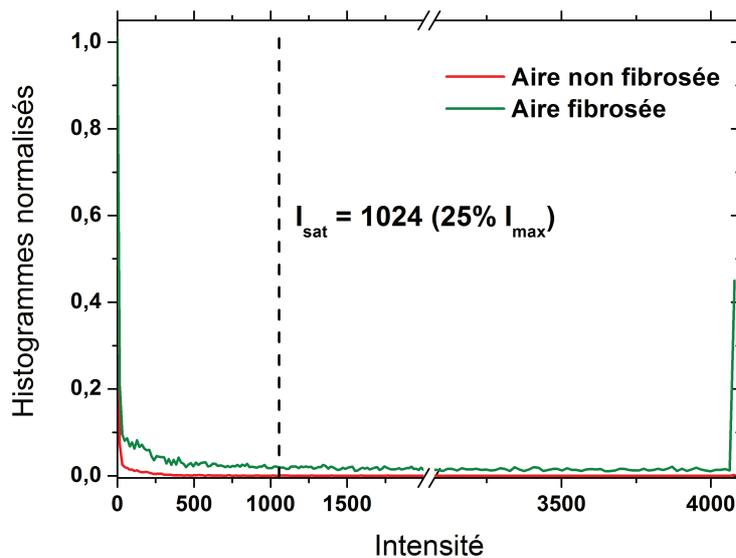


FIGURE IV.6 – Histogrammes d'intensité de zones fibrosées et non fibrosées obtenues sur une image de coupe histologique de foie fibrosé aux stades F4-I5 avec un objectif 4X ($NA = 0,16$). L'intensité de référence de la MEC saine est de 164 u.a. ($r = 4\%$).

IV.4 Étude d'une cohorte d'échantillons de foie fibrosé

IV.4.1 Échantillons

Les coupes histologiques étudiées dans cette thèse ont été fournies par le Trend Study of Patient with Hepatitis C Virus (Nottingham Digestive Diseases Center, Biomedical Research Unit, Nottingham). Elles sont datées de 1986 à 2008, ce qui permet aux anatomopathologistes de ce groupe d'évaluer le devenir au long terme des patients ayant développé une fibrose à la suite d'une infection chronique par le virus de l'hépatite C.

Les échantillons présentent pour une grande majorité des stades de fibrose avancés, c'est-à-dire supérieurs ou égaux à F2. Des coupes sériées de ces biopsies ont été préalablement analysées en anatomopathologie et classées selon les échelles METAVIR et Ishak. Afin de rendre cette étude objective, nous n'avons eu accès à ces résultats qu'*a posteriori*.

Ces échantillons proviennent tous de biopsies à l'aiguille. Une fois le prélèvement réalisé, le morceau de foie est fixé dans un bain de formaldéhyde à température ambiante pendant 30 minutes afin de préserver le tissu et d'arrêter toutes les réactions biochimiques. De nombreux bains d'alcool sont ensuite nécessaires pour déshydrater le tissu, pour une durée totale de plus de six heures, suivies de cinq heures de bain au xylène pour chasser l'alcool. Enfin, on trempe le tissu ainsi traité dans un bain de paraffine pendant une heure à 62°C. Cette opération est répétée deux fois supplémentaires pour s'assurer que tout le xylène est remplacé par de la paraffine.

L'étude a porté sur une cohorte de 152 patients infectés par le virus de l'hépatite C. Les coupes histologiques présentent une épaisseur standardisée de 4 μm et une longueur supérieure à 20 mm.

IV.4.2 Conditions d'imagerie

Les images ont été réalisées avec un objectif de grossissement 4X et d'ouverture numérique 0,16, en accord avec le protocole précédemment établi. Les protéines des hépatocytes, notamment les flavines et les nicotinamides, génèrent un signal de 2PEF endogène qui est épicollecté à travers la voie descannée associée à l'ouverture la plus grande de la roue confocale du microscope (ouverture #5, diamètre $\simeq 5,2$ mm).

Comme les biopsies n'occupent en général pas toute l'image (des zones hors biopsies sont également imagées) et que le principe du scoring SHG est de déterminer le nombre de pixels SHG "allumés" relativement au nombre total de pixels de la biopsie, il est indispensable de disposer d'une image permettant d'accéder de façon robuste aux contours de la biopsie, de manière à générer un masque dans lequel le comptage des pixels allumés sera réalisé. Ainsi le masque est obtenu à partir de l'image 2PEF endogène, qui fait bien apparaître les contours de la biopsie du fait de la relative homogénéité spatiale de la fluorescence produite par les hépatocytes. Le signal SHG émis par les fibres de collagène est quant à lui collecté en transmission par la voie décrite dans l'introduction générale.

La longueur d'onde d'excitation est fixée à 830 nm pour tous les échantillons. Pour rappel, la source utilisée est un laser femtoseconde $Ti :Sa$ qui délivre des impulsions de 200 fs environ, cadencées à 76 MHz. La polarisation du laser est rendue circulaire grâce à une lame quart-d'onde placée avant la pupille d'entrée de l'objectif. Ceci permet d'avoir une réponse des fibres de collagène qui soit indépendante de leur orientation.

Par ailleurs, les résolutions latérale et axiale associées à l'objectif 4X utilisé sont respectivement $w_{xy}^{2PEF} = 2,2 \mu\text{m}$ et $w_z^{2PEF} = 48,4 \mu\text{m}$ (cf. équations I.26, I.27 et I.28). L'objectif 4X permet donc à la fois de bénéficier du champ de vue maximal du microscope ($3,5 \times 3,5 \text{ mm}^2$) et d'intégrer optiquement sur une seule image le signal SHG produit par la totalité de l'épaisseur de la coupe, très inférieure à w_z^{2PEF} (il a été par ailleurs montré l'absence d'effets de cohérence dans l'épaisseur de l'échantillon, probablement causé par le désordre fibrillaire [Guilbert et al., 2010]). La définition des images est de 512×512 pixels². Le balayage le plus lent disponible sur le microscope a été utilisé afin d'obtenir un rapport signal à bruit suffisant dans les images. Le temps de résidence par pixel est ainsi de l'ordre de $10 \mu\text{s}$, et la durée d'acquisition d'une image est inférieure à trois secondes. Dans ces conditions, aucun phénomène de photobleaching n'a pu être observé sur les images 2PEF endogènes, et encore moins sur les images SHG dont le contraste est produit par l'interaction non linéaire (non dissipative) avec des fibres de collagène très résistantes à l'éclairement.

L'objectif 4X ne possède pas un champ de vue suffisant pour imager l'intégralité de la coupe histologique, dont la superficie est de l'ordre de 1 cm^2 , en une seule fois. Afin d'évaluer le score SHG sur la totalité de la biopsie, nous avons développé un pilote LabView pour la platine de translation du microscope (platine Marzhaüser, Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co.). Ce pilote permet en particulier de synchroniser déplacement de la platine de translation avec le signal de fin d'image du microscope. Après avoir renseigné les coordonnées du point de départ (en haut à gauche de la coupe) et celles du point d'arrivée (en bas à droite), le pilote active la translation de la platine à la fin de chaque image, ce qui permet de couvrir toute la biopsie en lançant une séquence d'acquisition d'images ("image stack") à partir du logiciel du microscope. Le compositage des images est réalisé sous ImageJ, à l'aide du plugin "RC Montage". Nous décrivons dans la section suivante la macro ImageJ que nous avons développée afin de déterminer le score SHG des 152 coupes histologiques de foie fibrosé.

IV.4.3 Principe d'automatisation du score SHG

Nous avons développé un programme compilable sous ImageJ (macro) pour analyser les images 2PEF et SHG et en tirer le score SHG. Ce programme est basé sur celui écrit par T. GUILBERT à l'occasion de ses travaux de thèse, et fonctionne selon le protocole décrit à la figure IV.7.

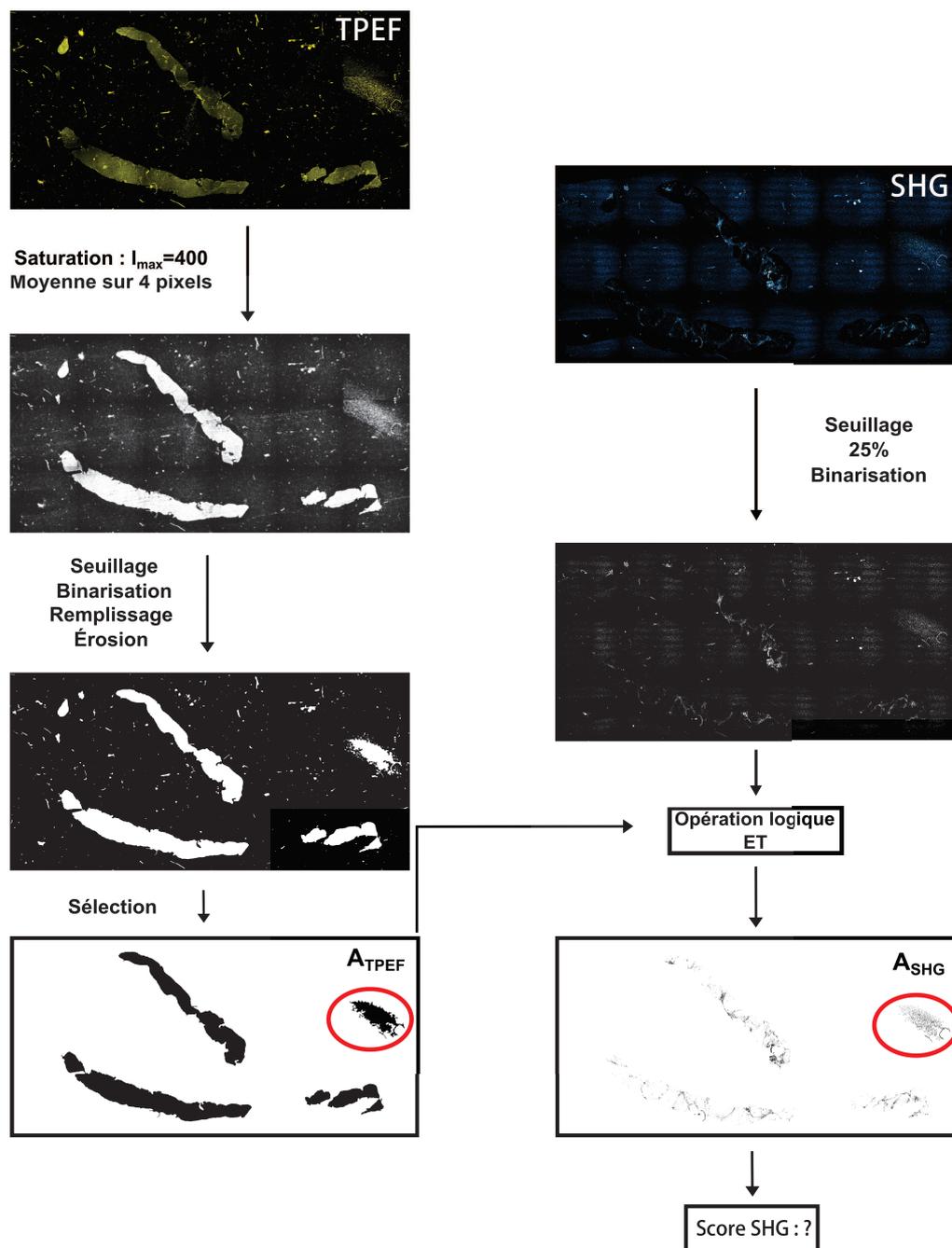


FIGURE IV.7 – Schéma explicatif des différentes étapes du traitement des images 2PEF et SHG permettant d'obtenir de manière quasiment automatique le score SHG. Les cercles rouges soulignent des amas de paraffine. Les différentes étapes sont développées dans le texte.

La première étape consiste à reconstruire les images totales 2PEF et SHG, et les sauvegarder au format **.tif*. Les étapes successives permettant d'obtenir le score *S* sont les suivantes :

Traitement de l'image 2PEF

Comme nous l'avons expliqué en début de chapitre, il est nécessaire de repérer les contours de la biopsie pour pouvoir déterminer le nombre relatif de pixels SHG "allumés", ou encore ce que nous pouvons appeler l'aire relative occupée par la fibrose, à l'origine de notre score SHG. Pour ce faire, nous utilisons donc l'image 2PEF, produite par l'autofluorescence des hépatocytes, pour générer un masque. Les réglages de la voie de collection de la fluorescence sont ajustés de manière à obtenir un contraste 2PEF suffisant tout en conservant un niveau d'intensité suffisamment faible en dehors de la biopsie. On applique ensuite une opération de saturation à l'image de sorte d'augmenter le contraste. Le seuil de saturation est déterminé de manière empiriquement et de manière automatisée à partir de la moyenne de l'intensité 2PEF de l'image. Un moyennage sur des blocs de 4 pixels adjacents est alors réalisé pour éliminer les hautes fréquences spatiales dans l'image et remplir le masque. Dès lors on binarise l'image en choisissant un seuil adapté pour obtenir un masque logique.

Une fois l'image binaire obtenue, on utilise une routine d'ImageJ (plugin "Analyse Particules") qui permet d'éliminer les petits objets du masque, qui n'ont a priori rien à voir avec la biopsie (signaux parasites). Ce masque binaire 2PEF est enregistré au format **.tif*, et le nombre de pixel qu'il contient est calculé et assimilé dans la suite à l'aire totale de la biopsie A_{2PEF} .

Seuillage de l'image SHG

L'image SHG reconstruite est quant à elle directement seuillée à 25% de l'intensité maximale, et l'image binarisée ainsi obtenue est enregistrée au format **.tif*.

Combinaison des images 2PEF et SHG

Les deux images enregistrées sont combinées par une opération booléenne de type "ET". Ainsi seuls les pixels associés à la fibrose ET appartenant à la biopsie sont retenus. Le nombre de pixels respectant ces conditions est enregistré dans la variable A_{SHG} . La dernière étape consiste à réaliser le rapport des grandeurs A_{SHG} et A_{2PEF} pour obtenir le score SHG S , exprimé en % :

$$S = 100 \frac{A_{SHG}}{A_{2PEF}} \quad (\text{IV.2})$$

Cette liste de commandes est très bien adaptée à un traitement post-acquisition rapide à condition que les images ne soient pas remplies de signaux parasites. Les images idéales (bon contraste, pas de parasites) sont cependant rares dans notre étude, puisque très souvent la paraffine vient perturber l'obtention du masque 2PEF en émettant un signal très fort sur de larges zones. Le cercle rouge observable sur la figure IV.7 entoure une zone paraffinée qui au vu de sa taille peut être considérée par le programme comme un morceau de biopsie.

Par ailleurs, la paraffine génère également un signal SHG clairement visible dans le fond de l'image SHG. Dans le meilleur des cas, ce signal se situe en dehors de la biopsie et l'opération de corrélation par le masque 2PEF l'élimine. En revanche, il est possible d'observer un recouvrement entre ce signal et le signal SHG propre à la biopsie, comme cela est présenté à la figure IV.8. Nous décrivons dans la section suivante les tentatives que nous avons faites afin de nous affranchir de cette contribution.

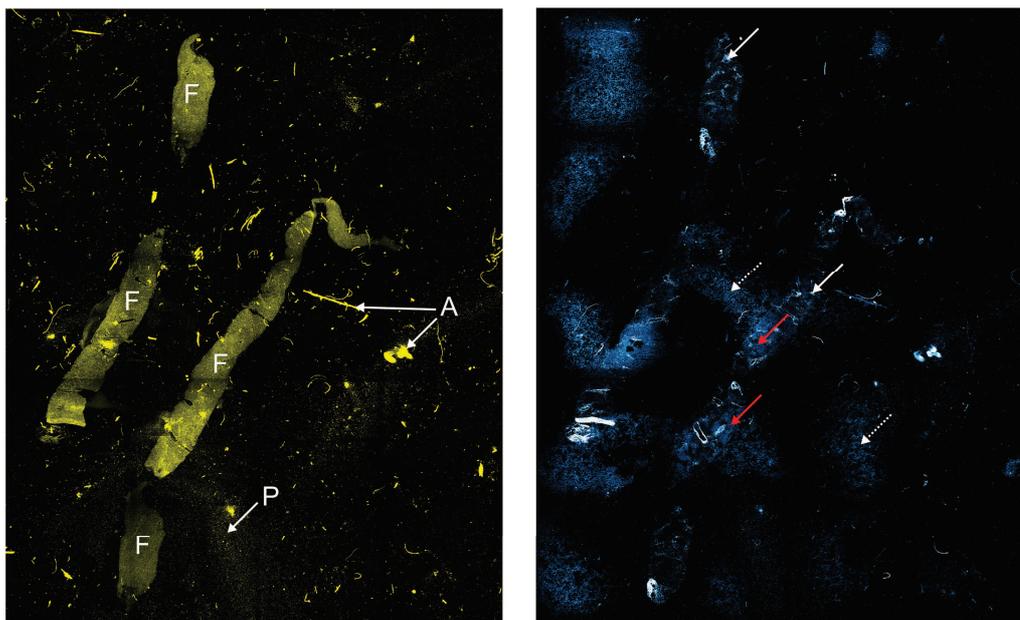


FIGURE IV.8 – Images 2PEF (à gauche, en fausse couleur) et SHG (à droite, en fausse couleur) d'une des 152 coupes histologiques de foie fibrosé. Le stade de fibrose sur cette coupe a été évalué indépendamment à F2/I3. Le signal SHG de la paraffine, repérable par sa structure très découpée (flèches en pointillés), se superpose en de nombreux endroits à celui des fibres de collagène (flèches blanches). Les flèches rouges indiquent la superposition de ces signaux. (F) : foie, (P) : paraffine, (A) : artefacts indéterminés.

IV.4.4 Traitement de la paraffine

Observations

Les images 2PEF présentent, sur plus de la moitié des échantillons, des aires de forte émission en dehors de la coupe de foie souvent corrélées à une émission SHG également importante. Ces signaux sont attribués à la paraffine qui vient parasiter les images.

La présence de la paraffine peut être révélée par la technique de transmission autoconfocale [Yang et Mertz, 2003]. Le principe de cette technique est le suivant : le faisceau laser transmis par la biopsie, habituellement filtré, est focalisé sur un cristal de quartz positionné dans la voie de détection SHG, avant le filtre infrarouge BG39. Le cristal de quartz est connu pour ses propriétés de génération de second harmonique [Harada et al., 2005]. Du fait de la dépendance quadratique du signal de SHG avec l'intensité du faisceau de pompe, seuls les photons balistiques transmis par l'échantillon sont capables de générer un signal de doublage de fréquence significatif dans le cristal de quartz. Dans ces conditions, on détecte via la SHG la contribution non diffusée du faisceau de pompe, et si le cristal est suffisamment large et homogène, tout se passe comme si on déplaçait, au fur et à mesure du balayage du microscope, un trou confocal placé en transmission, d'où le terme de *détection autoconfocale*. Les zones sombres sur ce genre d'image sont associées aux structures diffusantes de l'échantillon, et les zones les plus intenses sont les structures de moindre diffusion. La figure IV.9 présente trois images de nos échantillons obtenues par microscopie autoconfocale.

Nous pouvons voir sur ces images que le signal de transmission autoconfocale du foie est relativement homogène, sauf sur les bords où la diffusion semble plus importante, sûrement à cause d'effets d'interface. En revanche, l'extérieur de la coupe est fortement structuré, avec des formes en pétales révélant l'organisation de la paraffine et ses zones plus ou moins diffusantes. Les structures parasites repérables par leurs signaux 2PEF intenses présentent en revanche une faible intensité en transmission autoconfocale, ce qui correspond à des zones de forte diffusion. Une étude récente a montré que ces macrocristaux pouvaient être associées à un type de paraffine composée aux deux tiers de chaînes d'alcane dites normales (*n-paraffine*) et le tiers restant de leurs isomères (*iso-paraffine*) [Kuszlik et al., 2010]. Lors d'un recuit de la paraffine, des blocs cristallins de *n-paraffines* entrecoupés de portions amorphes liées à leurs isomères se développent, ce qui produit ces formes en pétales caractéristiques.

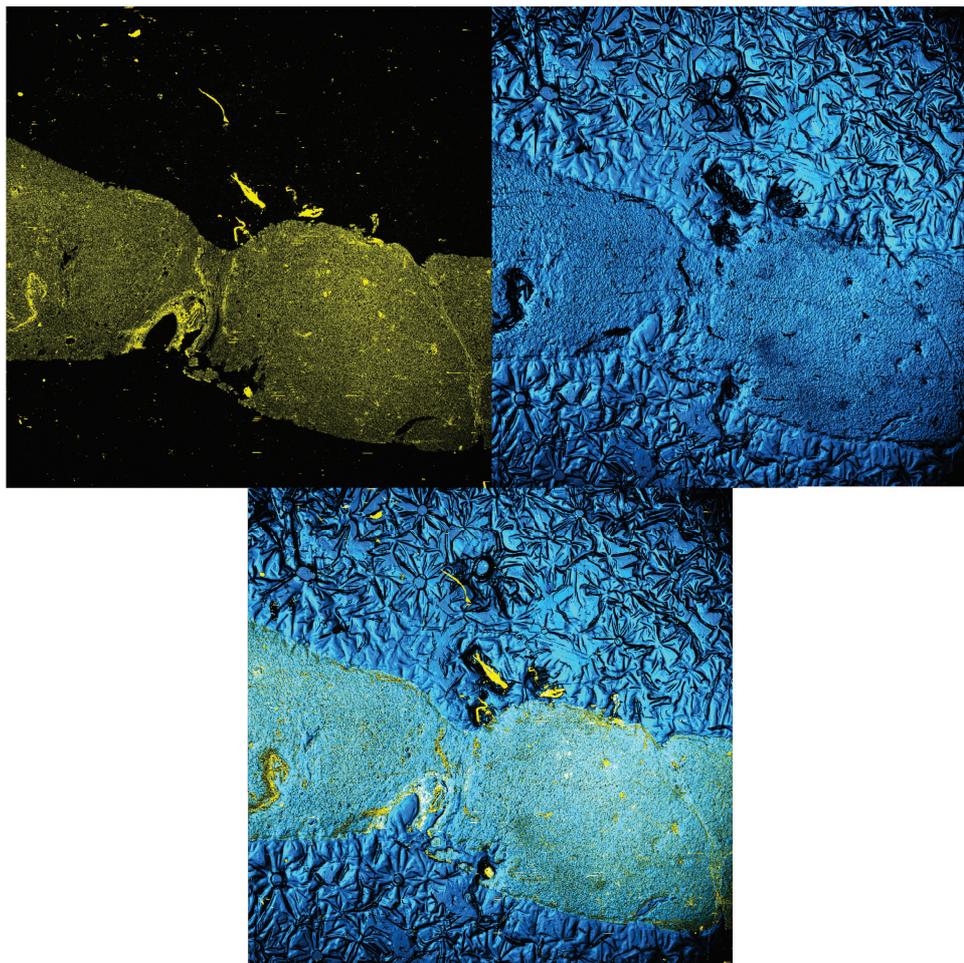


FIGURE IV.9 – Images 2PEF en épifluorescence (en haut à gauche) et en transmission autoconfocale (en haut à droite) d'une des 152 coupes histologiques de foie fibrosé. L'image du dessous résulte de la superposition des deux images. Le stade de fibrose sur cette coupe a été évalué indépendamment à F4/I6. Les images ont été prises à l'objectif 4X, avec une définition de 1024×1024 pixels².

Comme pour l'image SHG présentée à la figure IV.8, où les signaux SHG de la paraffine et des fibres de collagène sont indiscernables, d'autres échantillons présentent une contamination de leurs signaux de SHG de fibrose par celui de la paraffine. Nous avons tenté de séparer ces deux composantes du signal en partant du principe que les structures cristallines de ces deux macromolécules présentent possiblement des symétries différentes, donc des réponses polarimétriques différentes.

Traitement de la paraffine par effet de polarisation

Comme souligné dans l'introduction générale de ce manuscrit (cf. section I.2.3), la génération d'harmoniques fait intervenir un jeu de polarisations électroniques non

linéaires à l'échelle d'une molécule ou d'un ensemble de molécules. Suivant la polarisation de l'onde excitatrice incidente et de la conformation cristalline du milieu étudié, la génération de second harmonique est plus ou moins efficace.

Effets de polarisation

L'intensité SHG est très dépendante de la polarisation de l'onde excitatrice. Cet effet a été utilisé pour déterminer les champs d'orientation de molécules du vivant comme les fibres de collagène ou les complexes actine-myosine du muscle [Odin et al., 2008c], ainsi que la chiralité de matériaux artificiels [Valev et al., 2010].

Mathématiquement, le terme de polarisation non linéaire P_{NL} (décrit dans l'équation I.5) associé à la SHG peut être écrit sous la forme :

$$(P_{NL})_i = \chi_{ijk}^{(2)} E_j E_k \quad , \quad (\text{IV.3})$$

où i , j et k sont les trois coordonnées de l'espace x , y ou z . Cette relation peut être écrite sous forme matricielle en s'aidant de la notation de Voigt :

$$\begin{pmatrix} P_x^{2\nu} \\ P_y^{2\nu} \\ P_z^{2\nu} \end{pmatrix} = \begin{bmatrix} d_{11} & d_{12} & d_{13} & d_{14} & d_{15} & d_{16} \\ d_{21} & d_{22} & d_{23} & d_{24} & d_{25} & d_{26} \\ d_{31} & d_{32} & d_{33} & d_{34} & d_{35} & d_{36} \end{bmatrix} \times \begin{pmatrix} E_x^2 \\ E_y^2 \\ E_z^2 \\ 2E_z E_y \\ 2E_z E_x \\ 2E_x E_y \end{pmatrix} \quad (\text{IV.4})$$

avec $[d^{(2)}]$ le tenseur d'ordre 3 dérivé de $[\chi^{(2)}]$ par la notation de Voigt qui à chaque couple de variables de coordonnées associe un chiffre : $\{x, x\} \rightarrow 1$, $\{y, y\} \rightarrow 2$, $\{z, z\} \rightarrow 3$, $\{y, z\} \rightarrow 4$, $\{x, z\} \rightarrow 5$ et $\{x, y\} \rightarrow 6$.

Structure cristalline et propriété de SHG du collagène

Les propriétés non linéaires de la molécule de collagène, liées à l'hyperpolarisabilité microscopique du tropocollagène, et la symétrie à l'échelle macromoléculaire caractérisée par un axe C_∞ de l'assemblage des microfibrilles en l'absence de centre d'inversion, confèrent à la matrice de collagène fibrillaire une symétrie hexagonale de groupe ponctuel $6mm$ (ou C_{6v}) qui se répercute sur le tenseur $[d^{(2)}]$ [Strupler, 2008] :

$$d_{C_{6v}}^{(2)} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & d_{31} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & d_{31} & 0 & 0 \\ d_{31} & d_{31} & d_{33} & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (\text{IV.5})$$

Cette forme de tenseur prend également en compte la symétrie de Kleinman, qui reste valable tant que la fréquence de l'émission de SHG reste assez éloignée des bandes d'absorption propres à la molécule (hypothèse de faible dispersion du tenseur d'hyperpolarisabilité). Comme l'absorption du collagène présente un pic vers 300 nm, et que dans notre étude l'émission de SHG se situe à 415 nm, nous pouvons considérer que cette hypothèse est vérifiée. Nous supposons ici que le faisceau exciteur est peu convergent, ce qui est encore le cas pour l'objectif 4X d'ouverture numérique 0,16. Cette condition implique que le champ électrique ne présente pas de composante axiale. En prenant pour axe de symétrie de la fibre de collagène l'axe (Oz) et en supposant une propagation du faisceau incident selon (Oy), il est possible d'écrire l'intensité SHG émise par les fibres de collagène sous la forme :

$$I_{C_{6v}}(\phi) \propto \left(\rho \cos^2(\phi) + \sin^2(\phi) \right)^2 + \sin^2(2\phi) \quad , \quad (\text{IV.6})$$

où ϕ est l'angle entre le champ électrique de l'onde incidente et la fibre de collagène. Le rapport $\rho = d_{33}/d_{31}$ est un indicateur de l'organisation des molécules de collagène [Freund et al., 1986]. Ses valeurs varient entre 0,8 et 2 suivant l'échantillon observé [Williams et al., 2005; Sevrain, 2010]. À noter que ce facteur est à la base des études sur l'imagerie des champs d'orientation moléculaire des fibres de collagène dans les tissus biologiques [Odin et al., 2008b], ainsi que des études évaluant l'impact de facteurs externes sur la structure des fibres de collagène [Williams et al., 2005].

Structure cristalline et propriété de SHG de la paraffine

Le même raisonnement peut être tenu pour la paraffine. En effet, il a été montré que la structure cristalline la plus fréquente dans laquelle se trouve la paraffine est la structure orthorhombique, soit de groupe ponctuel C_{2v} et souvent de groupe d'espace Ama2 [Dorset, 1995], soit de groupe ponctuel D_2 et de groupe d'espace Pcam [Denicolo et al., 1984]. Dans ces groupes, les tenseurs non linéaires $d^{(2)}$ s'écrivent :

$$d_{C_{2v}}^{(2)} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & d'_{15} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & d'_{24} & 0 & 0 \\ d'_{31} & d'_{32} & d'_{33} & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (\text{IV.7})$$

$$d_{D_2}^{(2)} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & d''_{14} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & d''_{25} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & d''_{36} \end{bmatrix} \quad (\text{IV.8})$$

Sous les conditions de symétrie de Kleinman, nous pouvons écrire que $d'_{15} = d'_{31}$ et $d'_{24} = d'_{32}$ [Verbiest et al., 2009]. Les apostrophes soulignent le fait que les composantes des tenseurs $d_{C_{2v}}^{(2)}$ et $d_{D_2}^{(2)}$ ne sont pas les mêmes que celles du tenseur $d_{C_{6v}}^{(2)}$. En orientant le repère de la même manière que dans le cas des fibres de collagène, et en définissant la grandeur ρ' telle que $\rho' = d'_{33}/d'_{31}$, les intensités SHG émises suivant l'angle de polarisation ϕ pour chaque structure cristalline deviennent :

$$I_{C_{2v}}(\phi) \propto \left(\rho' \cos^2(\phi) + \sin^2(\phi) \right)^2 + \sin^2(2\phi) \quad (\text{IV.9})$$

$$I_{D_2}(\phi) \propto (d''_{25})^2 \sin^2(2\phi) \quad (\text{IV.10})$$

La dépendance de l'intensité SHG émise par la paraffine en fonction de l'orientation de la polarisation de la pompe est donc théoriquement identique à celle de l'intensité SHG émise par les fibres de collagène si la paraffine cristallise dans la forme C_{2v} . L'utilisation de la polarisation comme moyen de discrimination de ces deux macromolécules n'est donc possible que si la paraffine présente une structure plus proche du groupe D_2 . Par ailleurs, cette macromolécule peut se présenter sous la forme d'un mélange de macrocristaux et de phases amorphes riches en iso-paraffines, ce qui pourrait modifier le signal SHG émis suivant la polarisation incidente.

Pour le vérifier, nous utilisons le montage expérimental déjà décrit précédemment, dont la lame quart-d'onde a été remplacée par une lame demi-onde adaptée à 830 nm (half-waveplate zero-order, Tower Optical Corporation). Nous décrivons dans la section suivante les intensités SHG que nous avons mesurées expérimentalement suivant la polarisation de l'onde incidente d'abord dans des portions d'échantillon uniquement constituées de collagène ou de paraffine, puis dans une zone où les deux macromolécules sont présentes.

Intensités SHG suivant la polarisation

Intensité SHG des fibres de collagène

Afin de vérifier que le signal SHG émis par le collagène au sein de la coupe histologique dépend de l'angle de polarisation de la manière décrite par l'équation IV.6, nous imageons sous différentes polarisations une portion de biopsie présentant des

zones de fibrose. L'intensité SHG est mesurée en quatre zones de la portion de biopsie : deux zones présentant un signal SHG important associé à la fibrose, une zone qui recouvre toute la portion de biopsie et la dernière zone constituant l'image totale. De cette manière, nous pouvons évaluer l'impact de l'échantillonnage spatial sur les résultats. L'image SHG est présentée à la figure IV.10 avec les quatre zones de sélection et les résultats de nos mesures.

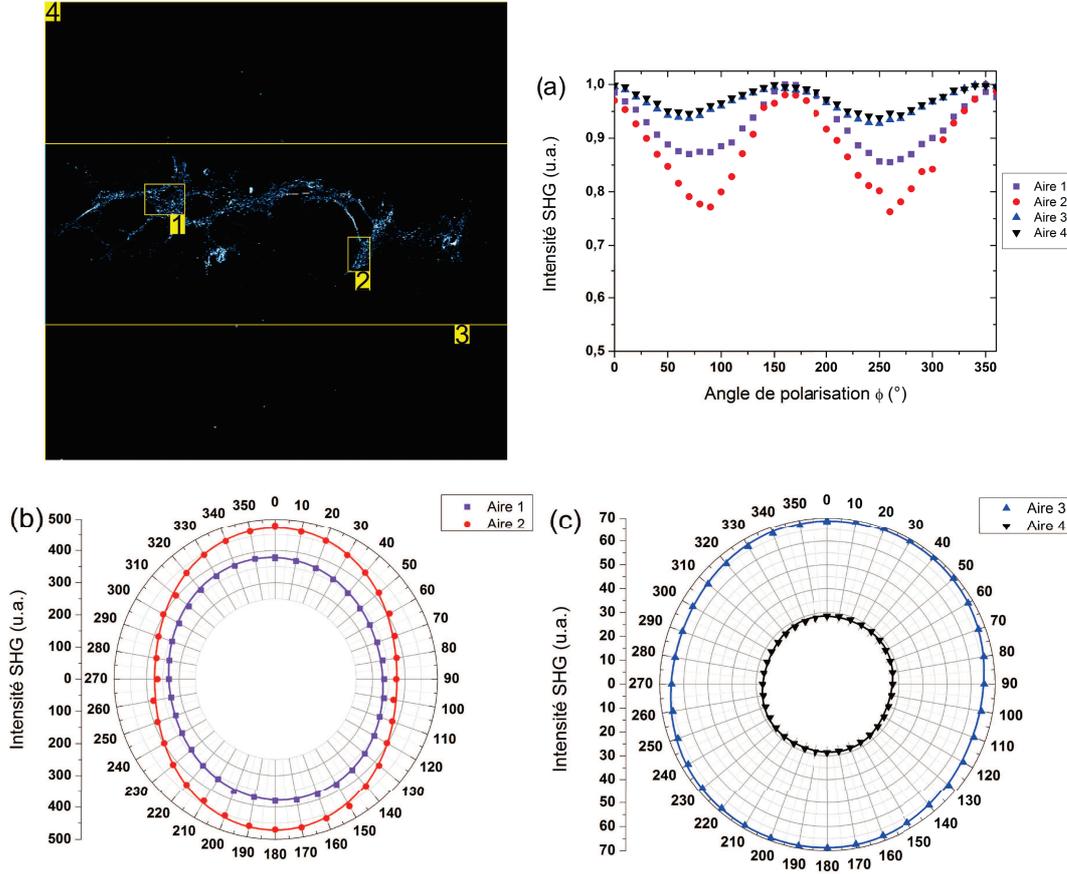


FIGURE IV.10 – Image SHG d'une portion de coupe histologique de foie fibrosé obtenue avec l'objectif $4X$ d'ouverture numérique $NA = 0,16$ et une définition de 512×512 pixels². L'intensité de cette image suivant l'angle de polarisation ϕ pour les quatre zones encadrées en jaune est représentée en cartésien (a) ou en polaire ((b) et (c)). Les points indiquent les mesures, les lignes représentent les régressions sur les données à partir de l'équation IV.6.

Le lissage effectué sur les courbes de la figure IV.10 est de la forme :

$$I = A \left[\left(\rho \cos^2(\phi + B) + \sin^2(\phi + B) \right)^2 \right] + \sin^2 [2(\phi + B)] \quad (\text{IV.11})$$

A et B constituent des paramètres d'ajustement de la régression. Le paramètre important de cette fonction, ρ , ainsi que les coefficients de régression associés à chaque lissage sont donnés, pour les quatre zones analysées, par le tableau IV.1.

Zone	Taille (pixels ²)	ρ	R^2
1	45 × 35	1,12	0,98
2	25 × 40	1,15	0,98
3	512 × 204	1,03	0,91
4	512 × 512	1,03	0,59

TABLE IV.1 – Paramètres de régression des représentations graphiques de la figure IV.10.

Nos résultats sont donc cohérents avec les valeurs de ρ trouvées dans la littérature pour le collagène fibrillaire de type I. Notons cependant que les valeurs de ρ et de R^2 sont plus faibles pour les aires les plus importantes (zones 3 et 4), ce qui est probablement lié au moyennage sur un grand nombre d'orientations de fibres.

Ce résultat est corroboré par le contraste des courbes des intensités SHG représentées en coordonnées cartésiennes (figure IV.10(a)). Le contraste est lié à l'orientation des fibres. Si toutes les orientations possibles des fibres sont présentes et équiprobables dans la zone de mesure, le contraste est nul. En revanche, une orientation unique donne un contraste maximal. Nous remarquons effectivement que les variations d'intensité sont très contrastées pour les aires 1 et 2, relativement petites, et restent peu contrastées pour les plus grandes.

Intensité SHG de la paraffine

Le comportement de l'émission SHG de la paraffine suivant l'angle de polarisation est décrit par la figure IV.11. Le même protocole d'imagerie que celui décrit précédemment a été utilisé.

Selon la représentation cartésienne de l'intensité en fonction de l'angle ϕ , une variation périodique est observable pour la plus petite aire mais plus difficilement pour les autres, pour les mêmes arguments que précédemment. Le tableau IV.2 donne les coefficients associés au lissage des courbes du diagramme polaire.

Zone	Taille (pixels ²)	ρ'	R^2
1	15 × 13	0,91	0,89
2	45 × 35	1,02	0,62
3	28600	0,99	0,62
4	512 × 512	1,01	0,68

TABLE IV.2 – Paramètres de régression des représentations graphiques de la figure IV.11.

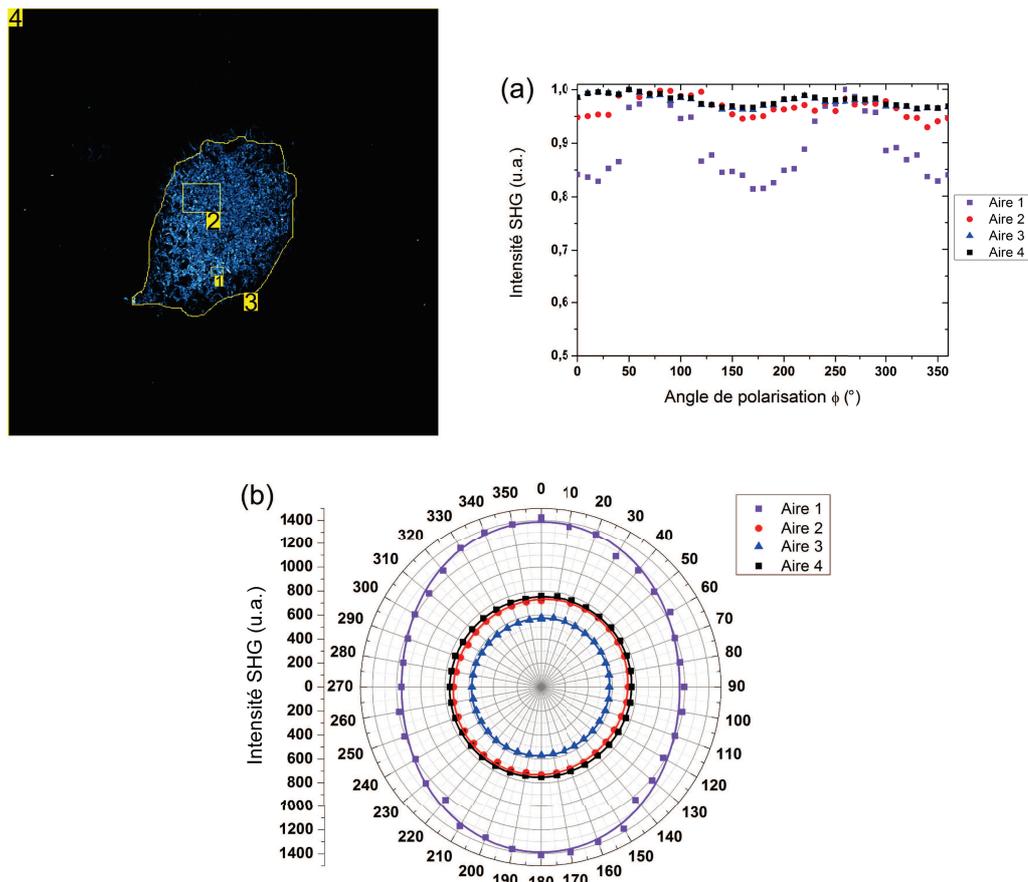


FIGURE IV.11 – Image SHG d’une portion de paraffine présente sur la même coupe histologique de foie fibrosé que celle de la figure IV.10. L’intensité de cette image suivant l’angle de polarisation ϕ pour les quatre zones encadrées en jaune est représentée en cartésien (a) ou en polaire ((b) et (c)). Les points indiquent les mesures, les lignes représentent les régressions sur les données. Pour plus de clarté, les intensités mesurées à la zone 4 ont été multipliées par 10 sur le diagramme (b).

Le lissage est meilleur lorsque l’aire de sélection est petite, impliquant d’une part que la modélisation donnée par l’équation IV.9 est valide localement, et d’autre part que l’augmentation de la surface de mesure affecte bien les résultats en incluant un grand nombre d’orientations de molécules en même temps, ce qui occasionne une perte de contraste.

Recouvrement de la coupe histologique par la paraffine

Lorsque la paraffine recouvre la biopsie, le signal de SHG émis est une superposition des signaux émanants des fibres de collagène et de la paraffine. La dépendance du signal de SHG avec l’angle de polarisation ϕ ne peut pas être déduite des dépendances séparées du collagène et de la paraffine puisque les émissions SHG de ces

deux macromolécules peuvent dépendre de la même manière de la polarisation de l'onde incidente. Par ailleurs, le contraste des fonctions décrivant ces dépendances est lié à la taille de la zone de mesure. De plus, on s'attend à ce que les résultats fluctuent énormément suivant la quantité relative de paraffine et de fibres de collagène. La figure IV.12 montre un exemple de ce recouvrement pour la même coupe histologique que précédemment.

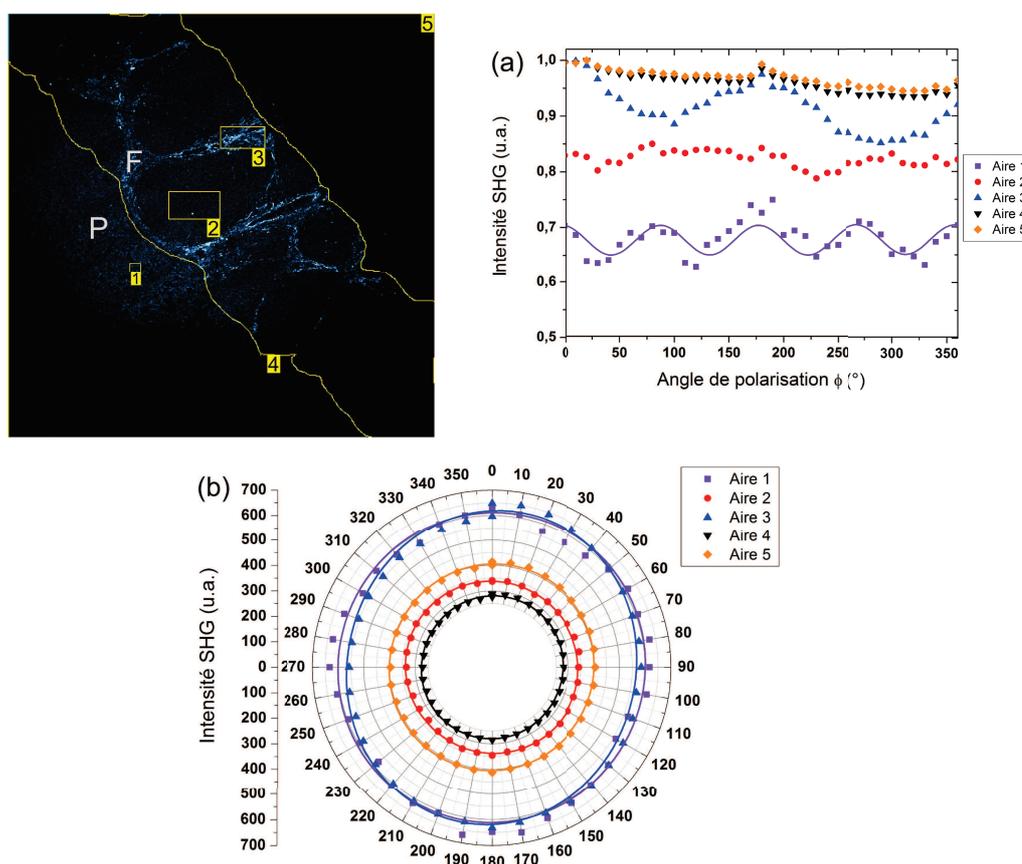


FIGURE IV.12 – Image SHG d'une portion de la coupe histologique présentant un recouvrement des zones fibrosées (F) par la paraffine (P). L'intensité de cette image suivant l'angle de polarisation ϕ pour les cinq zones encadrées en jaune est représentée en cartésien (a) ou en polaire ((b) et (c)). Les points indiquent les mesures, les lignes pleines représentent les régressions sur les données. La ligne pointillée du graphe (a) associée aux données de la zone 1 correspond à une autre forme de régression discutée dans le texte. Pour plus de clarté, les intensités mesurées aux zones 1 et 2 ont été multipliées par 0,75 et 0,85 respectivement dans le graphique (a). Les intensités des zones 1,2 et 4 ont été multipliées par 2 et celle de la zone 5 par 5 dans le diagramme polaire.

Les courbes de lissage du diagramme (b) de la figure IV.12 suivent l'équation IV.11 en changeant ρ par ρ'' . Ce paramètre ainsi que le coefficient de régression R^2 sont donnés dans le tableau IV.3.

Aire	Taille (pixels ²)	ρ''	R^2
1	14 × 12	1,01	-0,02
2	62 × 34	1,01	0,16
3	54 × 27	1,05	0,57
4	111990	0,99	0,21
5	512 × 512	0,99	0,21

TABLE IV.3 – Paramètres de régression des représentations graphiques de la figure IV.12.

Les très basses valeurs de R^2 pour toutes les zones sauf la 3, impliquent que la fonction de lissage n'est ici adaptée qu'à la zone 3, relative aux fibres de collagène fibrotique. Ce résultat n'est donc pas surprenant. Le manque de contraste sur cette zone explique que R^2 reste tout de même très inférieur à 1, comme déjà observé lors de la mesure de l'intensité SHG pour les portions de coupe présentant soit du collagène, soit de la paraffine.

Lorsque l'on observe le graphique (a) de la figure IV.12, les zones de grande surface comme les zones 4 et 5 ne présentent quasiment pas de dépendance avec l'angle de polarisation ϕ . Ce manque de contraste peut une nouvelle fois être expliqué par l'effet de moyenne orientationnelle. De même, l'intensité mesurée à l'aire 2 ne fluctue que légèrement avec ϕ , sûrement pour la même raison qu'évoquée précédemment, à savoir un échantillonnage spatial non adapté à l'étude précise des effets polarimétriques. Les faibles valeurs de R^2 soulignent ces évolutions.

Si l'on observe plus précisément la zone 1, contenant uniquement de la paraffine, l'évolution de son intensité SHG avec la polarisation n'est ni associée à de la paraffine dans l'état cristallin de groupe C_{2v} , ni à des fibres de collagène. En lissant la courbe représentée en coordonnées cartésiennes par une fonction représentative de l'intensité SHG émise par un cristal de groupe D_2 (cf. IV.10) :

$$I = y_0 + A \sin(2(\phi + B))^2 \quad , \quad (\text{IV.12})$$

on obtient un coefficient de régression R^2 de 0,68, bien supérieur au précédent, et $|A| = (d''_{25})^2 = 0,054$. Cette allure du signal SHG implique que la paraffine sur cette portion de coupe présente une structure plus proche du groupe D_2 que celle présente sur la portion précédente. Le manque de données à propos de la valeur de d''_{25} empêche cependant d'aller plus loin dans notre analyse. L'origine de cette différence de cristallisation reste dans tous les cas inconnue.

En conclusion, la séparation du signal SHG de la paraffine et celui des fibres de collagène, nécessaire pour évaluer correctement le score SHG de fibrose sur les échantillons présentant un recouvrement de la biopsie par la paraffine n'est pas possible sur la base de critères polarimétriques. Les raisons sont les suivantes :

- **La cristallisation** : seule la paraffine de groupe cristallin D_2 émet un signal de SHG dont la dépendance avec la polarisation de la pompe est différente de celle du signal SHG émis par les fibres de collagène. Dans la conformation C_{2v} , les deux macromolécules ne peuvent être distinguées.
- **L'échantillonnage spatial** : l'aire de mesure de l'intensité a des conséquences importantes sur l'allure des signaux SHG en fonction de l'angle de polarisation ϕ . Le contraste polarimétrique de SHG est plus faible pour les aires de mesure importantes puisque celles-ci intègrent davantage de macromolécules possédant des orientations différentes. La discrimination entre les deux types de molécules doit donc se faire sur des zones extrêmement réduites, dans l'idéal sur un pixel. Le problème est que le rapport signal à bruit sur un pixel est dans l'état actuel de notre expérience insuffisant pour quantifier le contraste polarimétrique SHG (S/B limité par le bruit de photo-électrons de type poissonien). Nous pourrions sans doute améliorer le rapport S/B en remplaçant nos PMTs classiques (photocathodes bialcalines) par une nouvelle génération de PMTs d'efficacité quantique environ trois fois supérieure (45% au pic environ), et aussi ralentir la vitesse de balayage afin d'augmenter le temps de résidence par pixel.
- **La concentration relative des macromolécules** : nous supposons que l'allure du signal SHG résultant de la superposition de la paraffine et des fibres de collagène dépend de la quantité relative de ces macromolécules dans la zone d'intérêt.

Notons cependant que les valeurs de ρ sont, pour les zones les plus représentatives de la fibrose (tableau IV.1), supérieures aux valeurs de ρ' associée à la paraffine (tableau IV.2) dans la conformation C_{2v} . Dans le cas de la superposition des signaux, la valeur de ρ'' de la zone 3 est comprise entre ces deux valeurs ($\rho'' = 1,05$)(tableau IV.3). On pourrait envisager de poursuivre cette piste en évaluant la variation du rapport ρ''/ρ' sur différents échantillons pour mesurer la proportion relative d'une molécule par rapport à l'autre.

Face à la complexité de ces phénomènes, il semble en l'état difficile d'utiliser la polarisation comme outil de discrimination des macromolécules de paraffine et de collagène. Cette étude serait cependant intéressante puisque l'émission de second harmonique de la paraffine utilisée pour fixer des préparations pour microscope n'est pas traitée dans la littérature alors qu'il s'agit d'un protocole de préparation des lames de microscope standard.

Ainsi, l'absence d'une méthode rapide pour séparer les contributions de la paraffine et des fibres de collagène en cas de superposition de leurs signaux SHG nous contraint à rejeter les lames présentant de trop grandes surfaces de biopsie recouvertes de paraffine, ce qui représente 34 lames sur les 152 analysées, soit un peu plus de 20% des échantillons.

Traitement post-acquisition

Afin d'éviter le cas présenté à la figure IV.7, c'est-à-dire une intensité 2PEF de la paraffine qui ne peut pas être filtrée par l'intensité de seuil, et en l'absence de méthode optique permettant d'éliminer toute contribution du signal SHG de la paraffine en cours d'acquisition, nous avons cherché à éliminer informatiquement le signal SHG de la paraffine.

Très souvent, nous avons remarqué que le signal 2PEF de la paraffine est suffisamment intense pour saturer localement les images. La figure IV.13 présente un zoom sur la zone riche en signal de fluorescence parasite provenant de la paraffine (correspond à la zone à droite de l'image 2PEF de la figure IV.7) ainsi que l'histogramme des valeurs d'intensité 2PEF dans la zone cerclée de blanc.

Pour cette image, les pixels dont l'intensité est inférieure à 255 (près de la moitié du nombre total de pixels) sont naturellement éliminés par le procédé de seuillage en 2PEF. Pour rappel, cette valeur de seuil est déterminée empiriquement et de manière automatisée à partir de la moyenne de l'intensité 2PEF de l'image. Par ailleurs, près de 20% des pixels sont saturés. Si nous transformons ces pixels saturés en pixels nuls, l'opération de seuillage 2PEF va les éliminer et les blocs de paraffine vont se fractionner au cours des opérations binaires utilisées pour obtenir le maque 2PEF, ce qui devrait nous permettre de sélectionner correctement les portions de biopsies grâce à leur taille, même pour les plus petits fragments. Notons que les pixels 2PEF des zones propres à la biopsie sont rarement saturés, ce qui justifie cette opération.

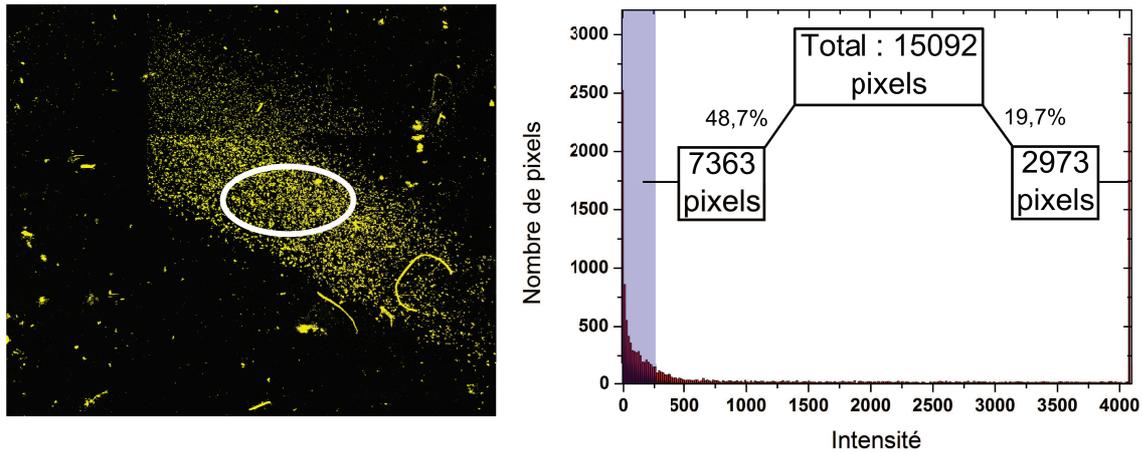


FIGURE IV.13 – Fragment de l'image 2PEF présentée à la figure IV.7. L'histogramme des valeurs d'intensité est associé aux pixels contenus dans la zone cerclée de blanc. Le nombre total de pixels est donné. La zone en bleu encadre les valeurs d'intensité comprises entre 0 et 255.

Nous appliquons ainsi le protocole de correction suivant : l'image 2PEF reconstruite est dupliquée, et tous les pixels dont l'intensité est supérieure à 4090 sont sélectionnés afin de rendre leur valeur nulle. Cette valeur est choisie arbitrairement. Une opération booléenne de type "ET" est réalisée entre le duplicata ainsi modifié et l'image de base. Tous les pixels saturés de cette image vont ainsi s'annuler, comme le montre la figure IV.14 suivante.

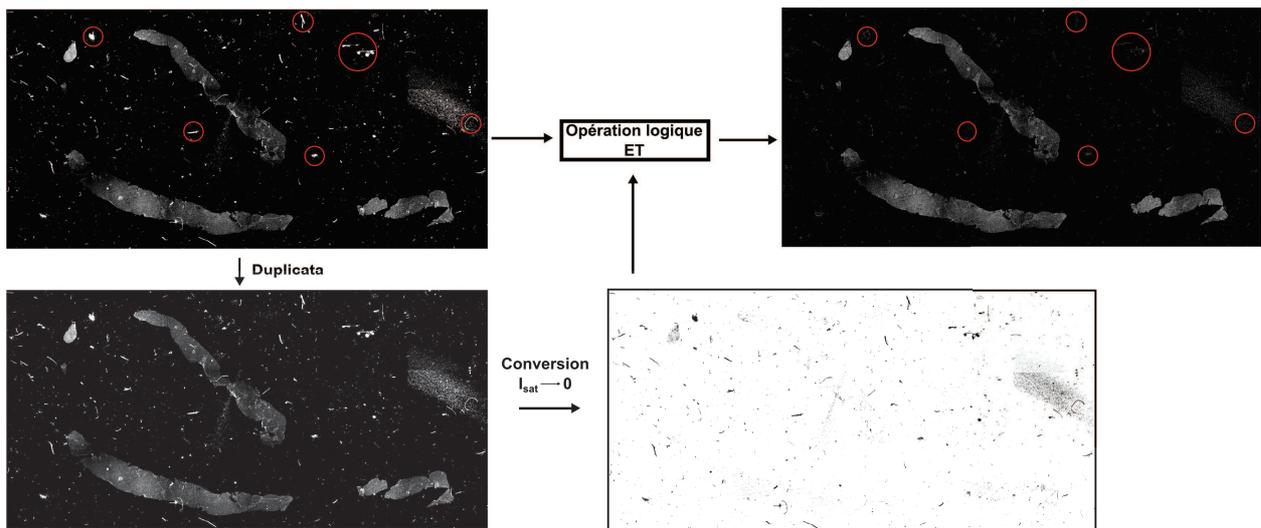


FIGURE IV.14 – Résultat de l'opération logique "ET" entre le duplicata modifié et l'image de base. Cette opération est nécessaire pour éliminer les éléments parasites de l'image 2PEF (cercles rouges).

L'image ainsi corrigée présente une densité de pixels non nuls plus faible dans la zone paraffinée. En appliquant les opérations déjà décrites à la figure IV.7 à partir de cette image traitée, nous pouvons grâce à cette méthode sélectionner correctement les éléments de la biopsie et obtenir le score SHG, comme l'illustre la figure IV.15.

Contrairement au cas présenté à la figure IV.7, nous avons cette fois pu sélectionner l'ensemble de la coupe histologique et évaluer le nombre de pixels SHG associés à la fibrose. Les scores obtenus sans et avec le traitement post-acquisition sont respectivement de $S_{sans} = 6,46$ et $S_{avec} = 5,20$, ce qui représente un écart de près de 20%. Ce traitement apporte donc une correction non négligeable au score, qui risquerait d'être surévalué autrement.

IV.5 Résultats

La pertinence du score SHG comme outil de discrimination entre les stades de la fibrose du foie est à présent évaluée en représentant la dispersion des scores en fonction des différents stades des échelles Ishak et METAVIR. Sur les 152 coupes histologiques que nous avons imagées, 42 (28%) ont dû être rejetées soit parce qu'elles présentaient un recouvrement de la paraffine trop important (34 coupes), soit parce que les anatomopathologistes n'avaient pas pu évaluer le stade (8 coupes). Les 110 autres coupes (72%) ont été considérées comme exploitables.

IV.5.1 Statistiques comparées

Pour évaluer cette dispersion, nous utilisons la représentation en "boîte à moustaches" (ou diagramme en boîte) des scores SHG de l'ensemble des coupes associés en fonction des stades Ishak ou METAVIR (figure IV.16).

Le faible nombre de coupes présentant un stade inférieur à F2 ou I3 nous empêche de conclure sur la capacité du scoring SHG d'évaluer correctement les états de fibrose les moins avancés. La corrélation entre le score SHG et le stade METAVIR, même aux stades les plus bas, a été démontrée dans [Guilbert, 2010] sur une cohorte de 119 coupes dont 51 de stades F0 et F1.

L'évolution non linéaire de la valeur médiane avec le score SHG est prouvée par le coefficient de corrélation de Spearman, qui évalue la relation de non linéarité monotone de l'évolution d'un paramètre par rapport à un autre. Dans notre cas,

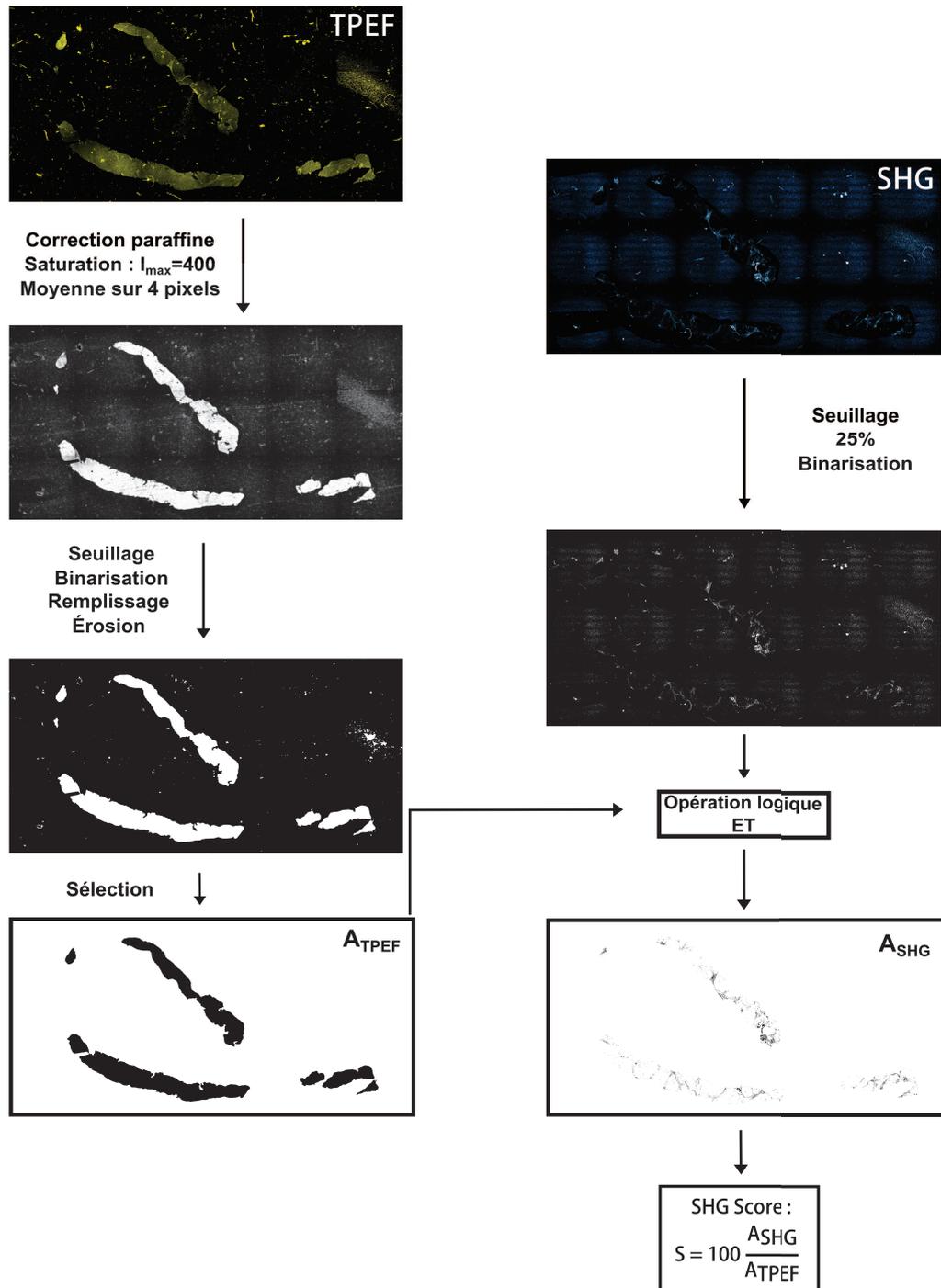


FIGURE IV.15 – Schéma explicatif des différentes étapes de traitement post-acquisition permettant d'obtenir de manière quasi-automatique le score SHG après traitement de l'image 2PEF pour éliminer les pixels d'intensité importante.

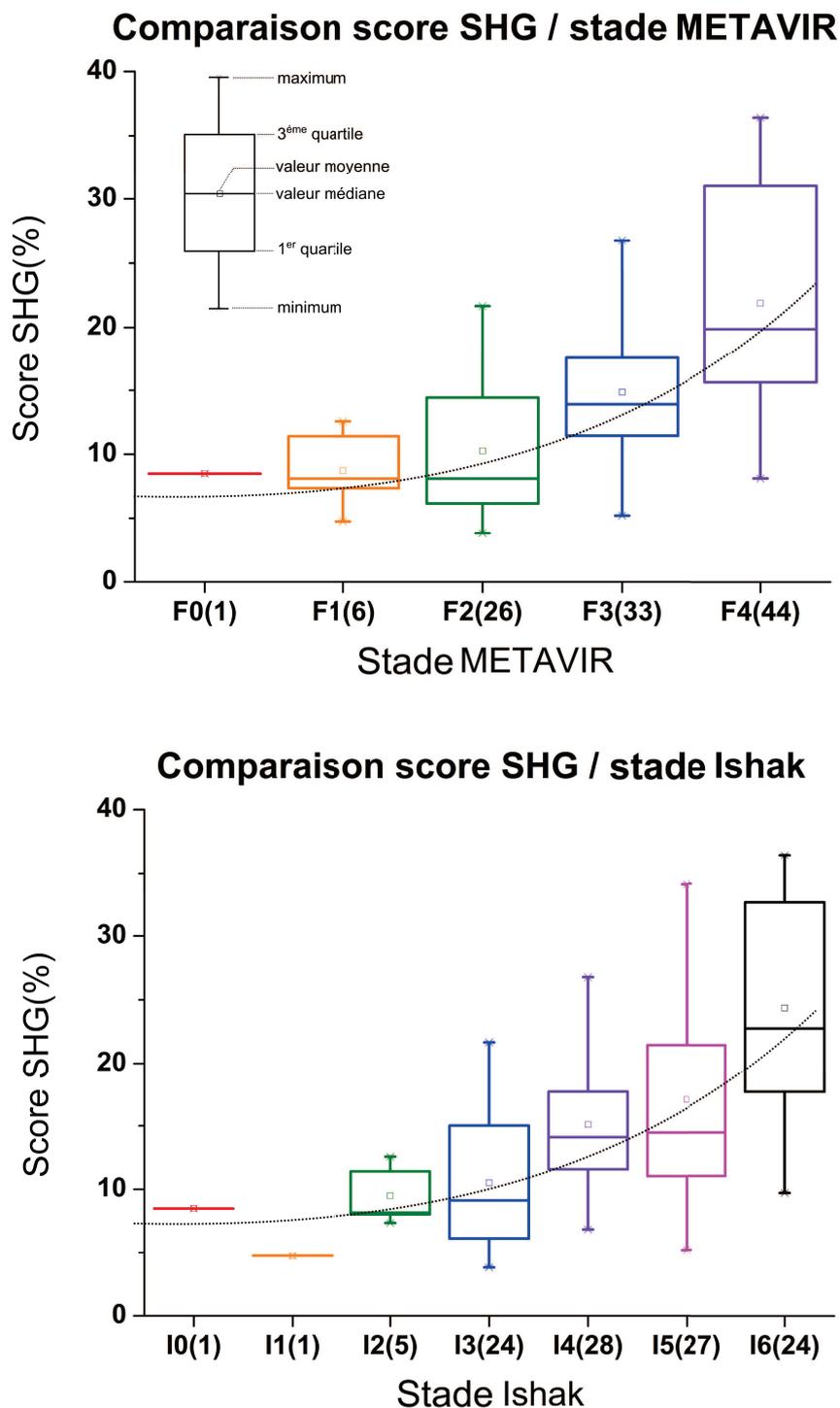


FIGURE IV.16 – Diagrammes en boîtes à moustache regroupant par stades METAVIR (en haut) et Ishak (en bas) les scores SHG des 110 coupes histologiques. Chaque quartile comprend un quart des valeurs de chaque population. La courbe pointillée souligne l'évolution non linéaire de la médiane du score suivant le stade.

ce coefficient est proche de 1 (valeur $p < 0,05$) en échelle METAVIR et de 0,96 ($p < 0,05$) en échelle Ishak, ce qui confirme l'évolution non linéaire du score SHG avec le stade de la fibrose. Notons que la valeur p est un outil de test statistique qui fixe une valeur de seuil au-delà de laquelle l'on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle. Si $p > 0,1$, cette hypothèse ne peut pas être écartée. À l'inverse, si $p < 0,05$ on peut écarter l'hypothèse nulle. Dans notre cas, l'hypothèse nulle peut être formulée ainsi : "il n'y a pas d'évolution significative entre la médiane des scores SHG et les stades de fibrose". Le fait que p soit inférieure à 0,05 indique que cette hypothèse peut être rejetée.

Par ailleurs, le test statistique de Wilcoxon indique que les stades I3 et I4 sont statistiquement différents ($p = 0,027$), de même que les stades I5 et I6 ($p = 0,0022$). Il existe également une différence significative entre les distributions F2 et F3 ($p = 0,0009$) et F3 et F4 ($p = 0,0001$). Ceci signifie que la méthode de score SHG est bien adaptée pour séparer les populations de coupes histologiques suivant leurs stades de fibrose.

Nous avons de plus demandé à C. ODIN, de l'Institut de Physique de Rennes, s'il pouvait, indépendamment de nos conclusions, calculer un score SHG à partir de sons propre programme MatLab en suivant un algorithme de traitement d'image proche du nôtre. L'excellente corrélation entre nos résultats et les siens ($\rho = 0,95$) prouve que la variabilité inter-opérateur est largement diminuée dans le cas du scoring SHG automatisé par rapport à l'évaluation de la fibrose par l'anatomopathologiste selon les critères essentiellement qualitatifs propres aux tests METAVIR et Ishak.

Le deuxième critère d'évaluation de la pertinence d'un score de fibrose est sa capacité à discriminer les stades les plus avancés, soit F3-4 ou I4-6, des stades les moins avancés F0-2 ou I0-3. Nous utilisons pour cela l'outil statistique appelé courbe ROC (acronyme de *Receiver Operating Characteristics*) et l'aire sous la courbe ROC nommée AUROC. Une description de cet outil ainsi que nos résultats sont donnés dans la section suivante.

IV.5.2 Courbes ROC

Analyse ROC

L'analyse ROC est utilisée pour déterminer si un paramètre pr donné permet de séparer efficacement deux groupes de données (par la suite nommés *populations*).

Prenons par exemple une population de patients malades M et une population de patients non malades NM ; à chaque élément i de ces populations correspond une valeur de pr notée pr_i . Soit les événements de probabilité suivant : M pour l'événement "le patient est malade", NM pour l'événement "le patient n'est pas malade", $S+$ lorsque la valeur de pr pour l'élément i est supérieure à une valeur de seuil s (cas positif), $S-$ lorsqu'elle lui est inférieure (cas négatif). L'analyse ROC permet de classer chaque élément de ces populations en quatre catégories :

- les Vrais Positifs **VP** : $VP = P(S+ / M)$. C'est la probabilité P de classer un cas positif sachant qu'il est malade.
- les Faux Négatifs **FN** : $FN = P(S- / M)$. C'est la probabilité de classer un cas négatif sachant qu'il est malade.
- les Faux Positifs **FP** : $FP = P(S+ / NM)$. C'est la probabilité de classer un cas positif sachant qu'il n'est pas malade.
- les Vrais Négatifs **VN** : $VN = P(S- / NM)$. C'est la probabilité de classer un cas négatif sachant qu'il n'est pas malade.

Notons que les relations $VP + FN = 1$ et $FP + VN = 1$ doivent toujours être respectées.

Le critère de diagnostic idéal doit présenter 0 **FN** et 0 **FP**. Comme cela est rarement le cas, nous définissons deux variables qui permettent d'apprécier cet écart entre cas idéal et cas réel :

- la **sensibilité** Se est la probabilité de prédire un cas positif lorsque le patient est malade. Dans le cas idéal, $Se = 1$ pour tous les patients non malades et 0 pour tous les patients malades. De manière générale, $Se = VP$.
- la **spécificité** Sp est la probabilité de prédire un cas négatif en l'absence de maladie. Dans le cas idéal, $Sp = 0$ pour tous les patients non malades et 1 pour tous les patients malades. De manière générale, $Sp = VN$.

La courbe ROC est une représentation de la sensibilité Se en fonction de l'anti-spécificité $1 - Sp$, autrement dit elle représente la probabilité de prédire un Vrai Positif par rapport à la probabilité de prédire un Faux Positif. La courbe ROC est

une courbe paramétrique, qui dépend de la valeur de seuil s appliquée. Elle est tracée de manière récursive suivant la valeur de s et en déterminant le nombre de **VP** et de **FP** à chaque valeur de s fixée. Dans le cas idéal, c'est-à-dire un nombre de **FP** nul, la courbe décrit le triangle supérieur gauche. L'aire sous la courbe (AUROC) vaut alors 1. Le cas le plus défavorable se rencontre lorsqu'une indétermination existe entre **VP** et **FP** : à chaque valeur de seuil, il y a autant de chances que le patient soit malade ou non malade. Dans ce cas, la courbe suit la bissectrice et l'AUROC vaut 0,5.

La figure IV.17 présente les courbes ROC tracées pour vérifier la capacité de la méthode de scoring SHG à discriminer les stades de fibrose avancés et peu avancés, et les diagrammes en boîte à moustaches associés. Le critère de séparation de ces deux populations est le score SHG. Les AUROCs obtenus sont comparables avec les tests non invasifs (cf. figure IV.4), ce qui permet de dire que la méthode de scoring SHG propose ainsi un critère tout aussi discriminant en comparaison avec les autres techniques.

IV.5.3 Conclusion

La bonne corrélation entre les valeurs de score SHG et les stades METAVIR, démontrée également et pour la première fois avec les stades Ishak, ainsi que la capacité à discriminer les états les plus avancés de la fibrose des états les moins avancés font de cette technique un potentiel outil de diagnostic. Cette méthode est robuste, quasi-automatique, rapide (obtention des résultats en moins d'une minute en incluant l'acquisition et le traitement des images), et la variabilité inter-opérateur est considérablement réduite. Par ailleurs, le scoring SHG serait apte à découper plus finement les stades les plus avancés de la fibrose grâce à son évolution fortement non linéaire en fonction de l'évolution de la maladie.

Cependant, la technique de scoring SHG nécessite de réaliser une PBH, opération traumatisante pour le patient. Par ailleurs, il n'est actuellement pas possible de discriminer les stades de fibrose I4 et I5. En effet, il n'y a pas de différences statistiques notables entre les stades I4 et I5 selon le test de Wilcoxon ($p = 0,39$). En outre, si nous représentons la courbe ROC de discrimination de ces stades par le score SHG, nous constatons que cette courbe évolue autour de la bissectrice, avec un AUROC très faible (0,57), ce qui démontre que notre méthode ne peut actuellement pas séparer ces deux stades de la fibrose (cf. figure IV.18).

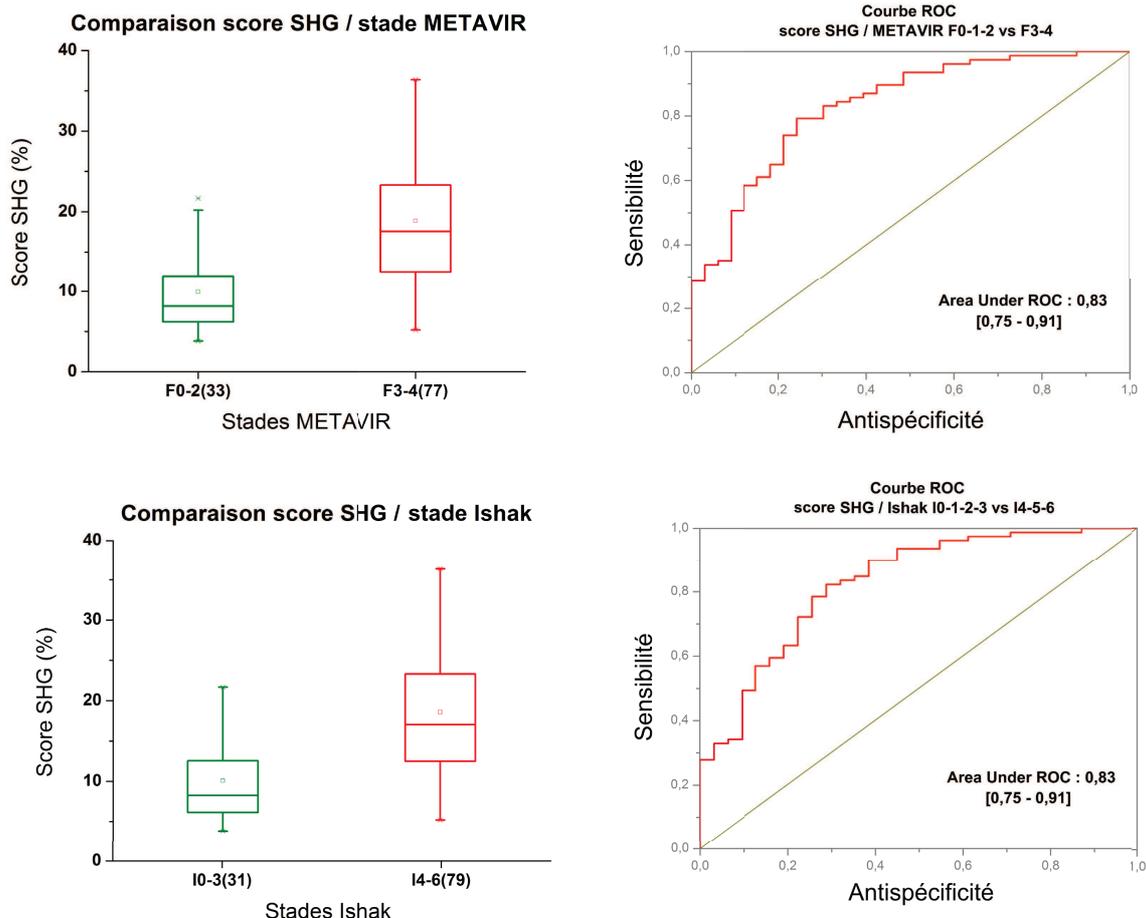


FIGURE IV.17 – Scores SHG des 110 coupes histologiques. À gauche, les diagrammes en boîtes à moustache des scores SHG associés de haut en bas aux populations F0-2; F3-4 et I0-3; I4-6. À droite, les courbes ROC correspondantes. L'AUROC est indiquée avec un intervalle de confiance de 95%.

La figure IV.3 apporte une explication à ce problème. Tous les stades METAVIR de la fibrose peuvent se distinguer par une coloration de la MEC plus ou moins prononcée, sans faire intervenir de critères morphologiques quand à la répartition du collagène fibrotique. Ceci est également valable pour l'échelle Ishak, sauf entre les stades I4 et I5 où seule la présence de nodules dicte le diagnostic. La fibrose prend alors une **forme** caractéristique (fibrose en expansion arciforme) qui implique immédiatement un stade I5 voire I6, ou F4 en METAVIR. La seule prise en compte de la quantité de collagène fibrillaire, sans critères morphologiques, rend difficile la distinction entre les deux stades, comme le prouve l'AUROC très faible de la figure IV.18.

Nous proposons, dans la dernière section de ce chapitre, quelques outils nou-

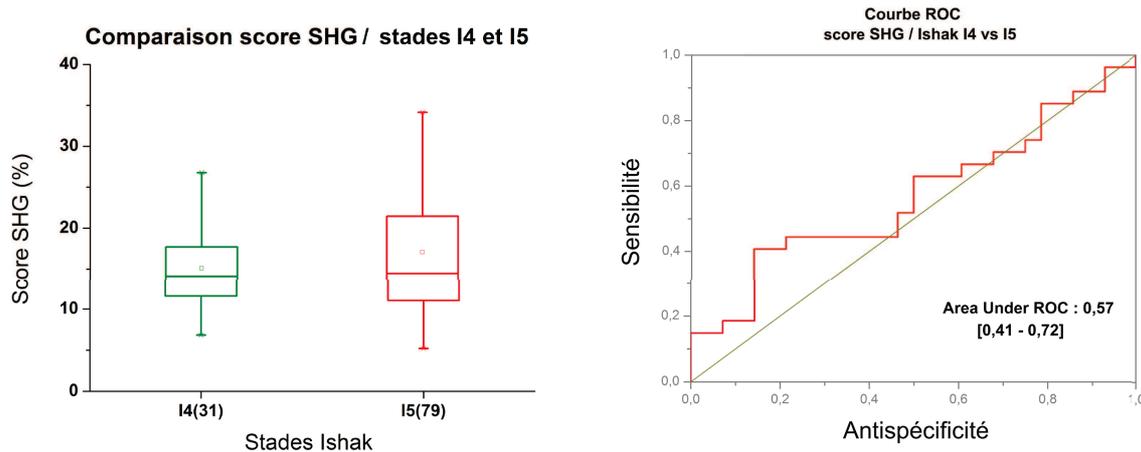


FIGURE IV.18 – Diagramme en boîtes des scores SHG associés aux populations I4 et I5. À droite, les courbes ROC correspondantes. L'AUROC est indiquée avec un intervalle de confiance à 95%.

veaux et/ou complémentaires pour l'étude de la fibrose du foie. La discussion sur la possibilité de distinguer les stades I4 et I5 par d'autres critères que le comptage de pixels SHG de fibrose est amorcée, et une nouvelle technique de mesure développée au laboratoire, basée sur l'imagerie en polarimétrie de Mueller instantanée, est décrite. Enfin, nous appliquons la méthode de mesure des paramètres de diffusion développée au chapitre II de ce manuscrit à l'étude de la fibrose du foie, dans l'espoir de trouver des différences significatives entre les paramètres μ_s et g aux différents stades de la fibrose.

IV.6 Perspectives de développement du score SHG

IV.6.1 Développement d'un critère morphologique

La méthode de score SHG décrite précédemment consiste à compter le nombre de pixels SHG "allumés" dont on espère qu'ils sont associés à la fibrose **quelque soit la répartition de ces pixels**. Les anatomopathologistes utilisent cependant des critères autres que la quantité de fibres pour poser un diagnostic. La présence de fibres en formation arciforme, par exemple, exprime la présence de nodules propres à un état cirrhotique, et conduit à diagnostiquer un stade METAVIR F4 bien que la quantité de collagène ne soit toujours pas très importante. À l'inverse, de nombreux dépôts de collagène peuvent être visibles sans qu'il n'existe pour autant de ponts d'un espace porte à l'autre, ce qui implique un état de fibrose peu avancé.

Il apparaît donc intéressant d'essayer d'introduire un ou plusieurs critères morphologique(s) dans l'algorithme d'évaluation du score SHG. L'idée est de pouvoir proposer un ou plusieurs paramètres supplémentaires qui viendraient compléter l'information en se basant sur les mêmes images que celles déjà utilisées pour obtenir le score SHG. Ces paramètres devraient pouvoir discriminer des stades de fibrose différents pour lesquels les scores SHG sont pourtant proches, comme dans le cas des stades I4 et I5.

Nous proposons deux paramètres liés uniquement à la répartition des pixels dans l'image SHG de la coupe histologique : le nombre d'amas de pixels N_a et leur taille moyenne T_a rapportée à la taille de la coupe. Ces paramètres ont été choisis en accord avec [Sun et al., 2010], après avoir remarqué que, sur les images SHG des 110 coupes histologiques, les plus bas stades présentent des pixels SHG dispersés alors que les stades les plus avancés montrent des paquets de pixels de tailles variables, comme l'illustre la figure IV.19.

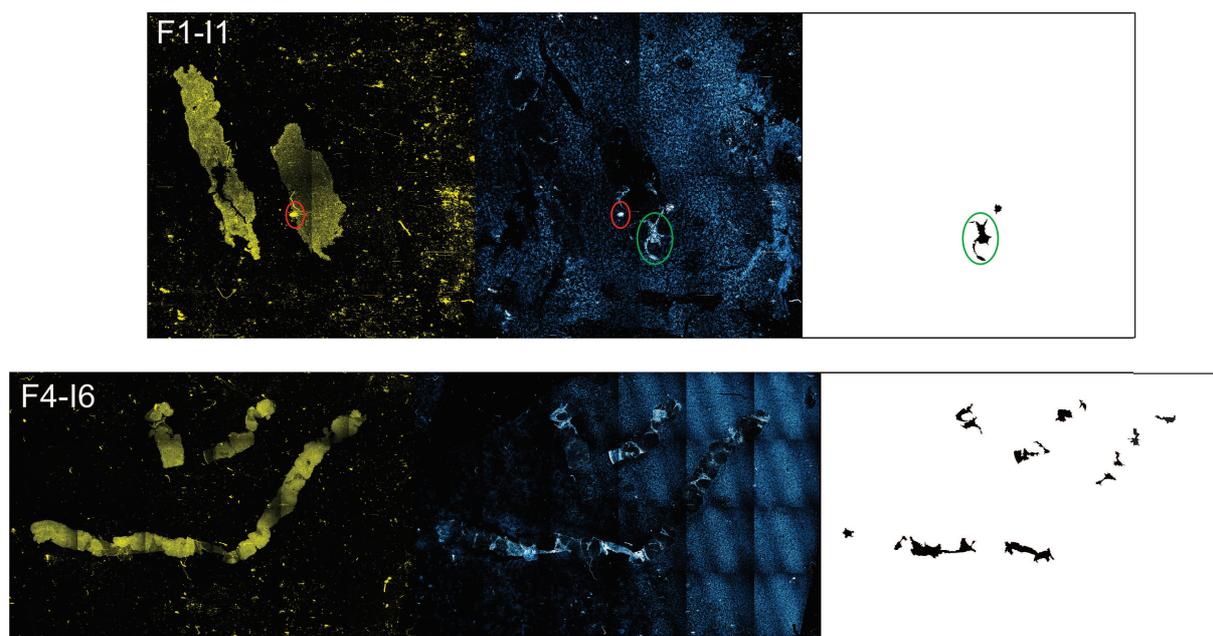


FIGURE IV.19 – Images 2PEF (en jaune), SHG (en bleu) et image binaire résultant de la sélection des amas de pixels de fibres de collagène associées à la fibrose pour deux coupes histologiques évaluées F1-I1 (en haut) et F4-I6 (en bas). Le cercle rouge indique un groupe de pixels parasites, éliminé dans le traitement de l'image. Le cercle vert encadre un des groupes de pixels traité comme un amas.

Le nombre d'amas au stade F1-I1 n'est que de deux, et de taille modeste, tandis qu'au stade F4-I6, 13 amas sont présents, dont certains ont une taille importante. Il semblerait donc possible de discriminer les stades de fibrose selon le nombre d'amas

de pixels relatifs à la fibrose et leur taille.

Protocole

Le traitement nécessaire pour obtenir les images seuillées et binarisées de la figure IV.19 est basé sur le masque 2PEF et l'image issue de l'opération logique "ET" (image de corrélation), nécessaires pour obtenir le score SHG. Après avoir obtenu A_{2PEF} à partir du masque 2PEF et A_{SHG} à partir de l'image de corrélation, nous appliquons à cette dernière différents traitements (remplissage de trous, dilatation, érosion) afin d'extraire les amas de pixels les plus importants. Ces opérations ont été définies après observation de plusieurs lames dans le but d'obtenir une image binarisée qui présente des structures visuellement proches des amas que l'on peut deviner sur les images SHG.

Une fois l'image obtenue, le programme doit compter le nombre d'amas et leur taille respective. Le critère de taille minimal d'un bloc SHG pour être considéré comme un amas dépend de la taille de la biopsie. Il a été arbitrairement fixé à 0,25% de la valeur de l'aire 2PEF. Puisque certains échantillons présentent des coupes divisées en plusieurs fragments, nous divisons le nombre d'amas de fibres de collagène par le nombre de fragments 2PEF, établissant ainsi un nombre d'amas par unité de coupes histologiques. Par ailleurs, les plus grosses biopsies ont plus de chances de présenter des gros amas que les petites biopsies de même stade. Nous avons donc divisé la taille des amas par la taille totale occupée par la biopsie A_{2PEF} .

Les résultats présentés à la figure IV.20 sont les diagrammes en boîtes à moustache reliant le nombre moyen d'amas ainsi que la taille moyenne de ces amas et les stades Ishak des coupes histologiques.

Selon le test de Wilcoxon, il existe une différence statistique significative entre les populations I3 et I4 ($p = 0,0223$) et les populations I5 et I6 ($p = 0,0068$) si l'on considère leur taille moyenne. La valeur p associée aux populations I4 et I5 est de 0,0939, ce qui ne les rend pas statistiquement différenciables mais ce résultat est meilleur que celui obtenu par le score SHG. En revanche, il n'est pas possible de séparer statistiquement les populations I3, I4, I5 et I6 à l'aide du nombre d'amas présents à ces stades.

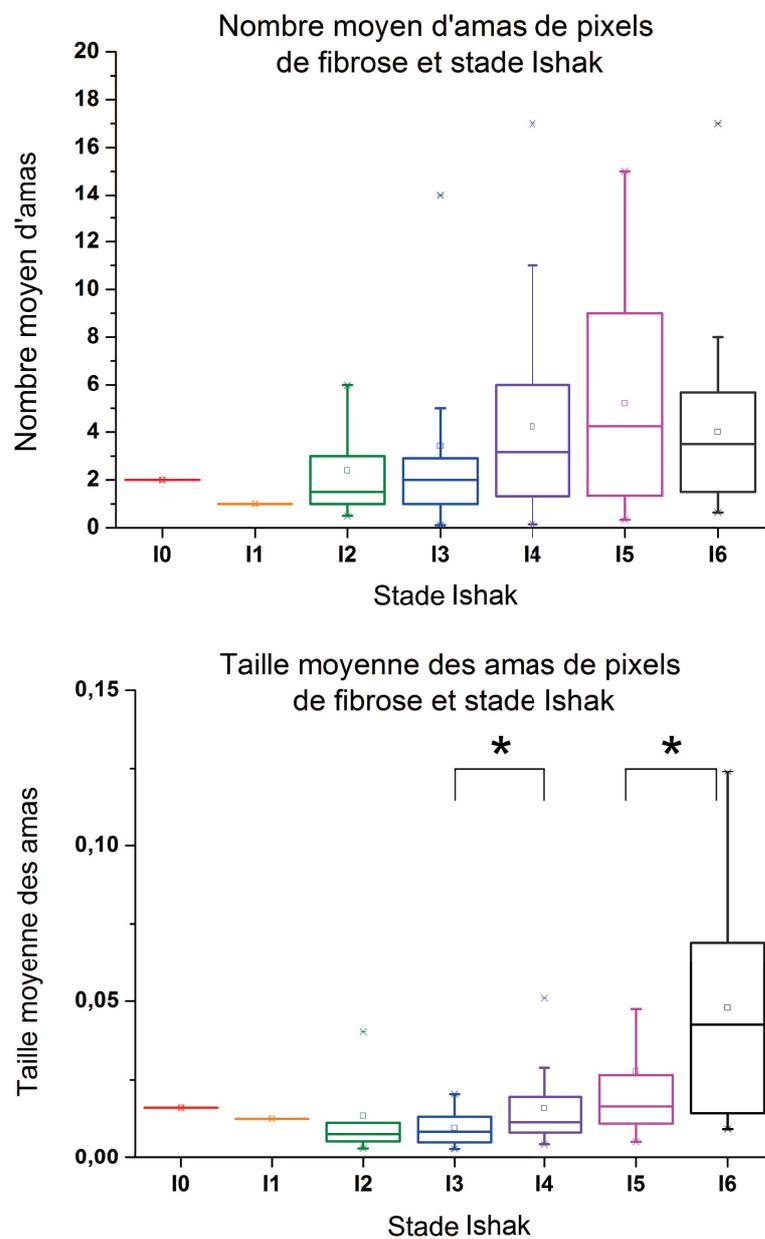


FIGURE IV.20 – Diagrammes en boîtes représentant le nombre moyen d'amas de pixels associés à la fibrose (en haut) et leur taille moyenne (en bas) suivant le stade Ishak pour les 110 coupes histologiques retenues pour la mesure du score SHG. Les astérisques indiquent que les populations sont statistiquement différentes ($p < 0,05$).

L'analyse ROC nécessaire pour observer la capacité de ces deux paramètres à discriminer les stades I4 et I5 est présentée à la figure IV.21 avec les AUROCs associées.

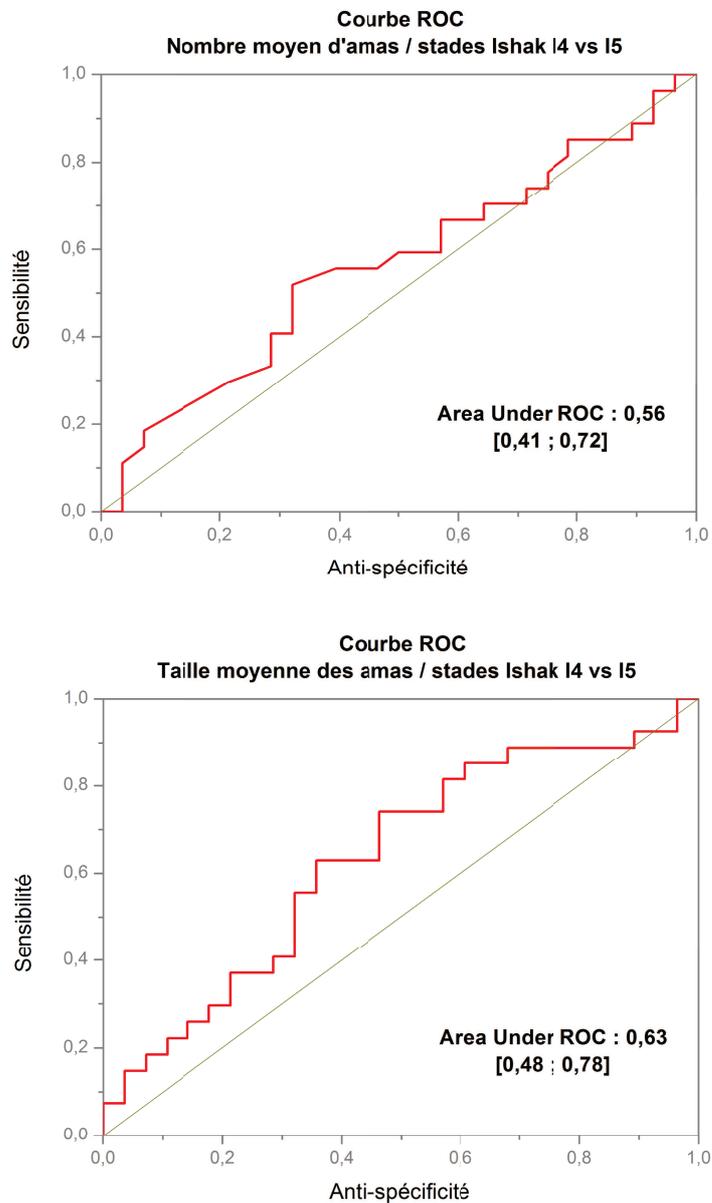


FIGURE IV.21 – Courbes ROC du nombre moyen d'amas ainsi que de leur taille moyenne entre les stades I4 et I5. Les AUROCs sont données sur les courbes avec leur intervalle de confiance à 95%.

Les faibles valeurs des AUROCs pour les deux critères nous amènent à conclure qu'aucun des deux ne peut discriminer les stades I4 et I5. Notons cependant que le critère de taille moyenne améliore légèrement l'AUROC par rapport à la mesure des scores SHG. Un critère morphologique moins basique que ceux que nous pré-

sentons ici devrait parvenir à séparer les deux populations. Il pourrait par exemple s'agir d'une reconnaissance automatique de la fibrose arciforme, et/ou de l'élimination de la capsule de collagène que nous observons en bord de coupes sur un certain nombre de biopsies. De plus, le collagène présent naturellement autour des vaisseaux sanguins ne participe pas à l'évaluation du stade de la fibrose par les anatomopathologistes. Il faudrait pouvoir soustraire cette contribution de nos scores SHG.

La technique de scoring SHG est donc prometteuse et, à l'aide de nouveaux critères, pourrait devenir encore plus sélective et discriminante. De nouvelles stratégies ont été étudiées durant ce travail afin de proposer de nouveaux paramètres de discrimination des stades de la fibrose : la polarimétrie de Mueller instantanée et la mesure des paramètres de diffusion.

IV.6.2 Analyse en polarisation : polarimètre de Mueller instantané

La matrice de Mueller est une matrice 4×4 qui permet de décrire l'impact d'un milieu sur la polarisation de la lumière incidente. Cette matrice, contrairement à celles rencontrées dans le formalisme de Jones, prend en compte les effets de dépolarisation du milieu en opérant non pas sur les composantes du champ électrique de l'onde électromagnétique, mais sur son intensité. Les 16 entrées de cette matrice sont habituellement mesurées par un jeu de codage et de décodage séquentiel de la polarisation de la lumière incidente, chaque configuration de polarisation donnant de l'information sur une entrée de la matrice. Cette méthode est cependant très coûteuse en temps. Il est possible de dépasser ce problème en codant de manière parallèle non pas sur une longueur d'onde, mais sur un ensemble de longueurs d'onde.

C'est sur ce principe que le polarimètre de Mueller instantané développé au laboratoire se base [Dubreuil et al., 2007]. Il permet d'obtenir l'intégralité de la matrice de Mueller d'un milieu quelconque à partir d'une seule mesure spectrale. Son principe repose sur l'utilisation d'une source large bande et de lames biréfringentes dont le déphasage dépend naturellement de la longueur d'onde. Il est donc possible d'attribuer un état de polarisation à chaque longueur d'onde.

Le montage expérimental utilisé dans l'étude qui suit est détaillé à la figure IV.22 : une source laser continue et spectralement étendue ($\Delta\lambda = 15\text{nm}$) émettant autour de la longueur d'onde $\lambda_0 = 830\text{ nm}$, un ensemble {polariseur + deux lames de calcite d'épaisseur e } pour réaliser l'opération de codage en polarisation, un ensemble

{polariseur + deux lames de calcite d'épaisseur $5e$ } pour le décodage, puis un réseau diffractant et une caméra CCD pour récupérer le spectre $I(\lambda)$ en une seule mesure. Les coefficients de la matrice de Mueller sont retrouvés à partir de l'analyse de la transformée de Fourier de $I(\lambda)$ puisqu'ils sont simplement reliés aux amplitudes des pics de Fourier.

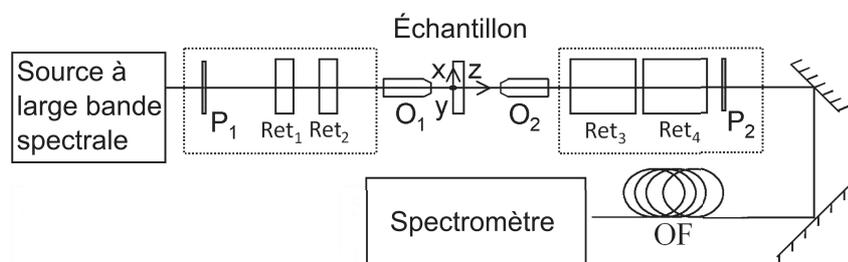


FIGURE IV.22 – Schéma du montage du polarimètre instantané de Mueller dans la configuration $(e, e, 5e, 5e)$. O_1 et O_2 : objectifs $10X$ ($NA = 0,25$).

Les propriétés polarimétriques du milieu sont extraites grâce à la décomposition de Lu et Chipman de la matrice de Mueller [Lu et Chipman, 1996]. Ces propriétés sont au nombre de trois :

- le **dichroïsme** : il s'agit de la capacité d'un milieu à absorber différemment la lumière incidente suivant son état de polarisation.
- la **biréfringence** : elle ajoute un déphasage entre deux composantes du champ électrique. Cet effet sera quantifié par la valeur de la retardance R .
- la **dépolarisation** : elle caractérise la capacité d'un milieu à rendre aléatoire la polarisation de la lumière le traversant. Cet effet sera quantifié par la valeur de l'indice de dépolarisation P_D tel que $P_D = 1$ pour un milieu non dépolarisant et $P_D = 0$ pour un milieu totalement dépolarisant. Cet indice est associé à une moyenne spatiale et/ou temporelle d'effets polarimétriques.

Nous appliquons cette technique à l'analyse de lames de foie fibrosé de $16 \mu\text{m}$ d'épaisseur tirées cette fois de pièces opératoires et non de biopsies à l'aiguille, fixées dans le formaldéhyde puis à la paraffine et marquées au rouge Sirius [Dubreuil et al., 2012]. Le marquage au rouge Sirius est avantageux dans ce cas puisqu'il exacerbe la biréfringence naturelle des fibres de collagène [Junqueira et al., 1979; Laude-Boulesteix et al., 2004]. Le dichroïsme associé au rouge Sirius est négligeable à 830 nm , ce qui nous amène à ne considérer que les effets de retardance et de dépolarisation.

larisation. Les échantillons sont montés sur une platine motorisée qui autorise les déplacements en X et Y, ce qui permet d'analyser différentes zones et ainsi de reconstruire une image, à faible résolution spatiale, de la retardance et de l'indice de dépolarisation de l'échantillon.

En appliquant cette méthode sur une zone très fibrosée (échantillon F4), nous constatons que l'image de retardance est similaire à l'image SHG de la même zone, ce qui prouve que le collagène fibrillaire est bien responsable de l'effet de biréfringence (cf. figure IV.23). Par ailleurs, l'image de dépolarisation montre peu de structures remarquables, ce qui indique que l'indice de dépolarisation P_D ne peut pas être utilisé comme paramètre pour évaluer l'avancée de la fibrose.

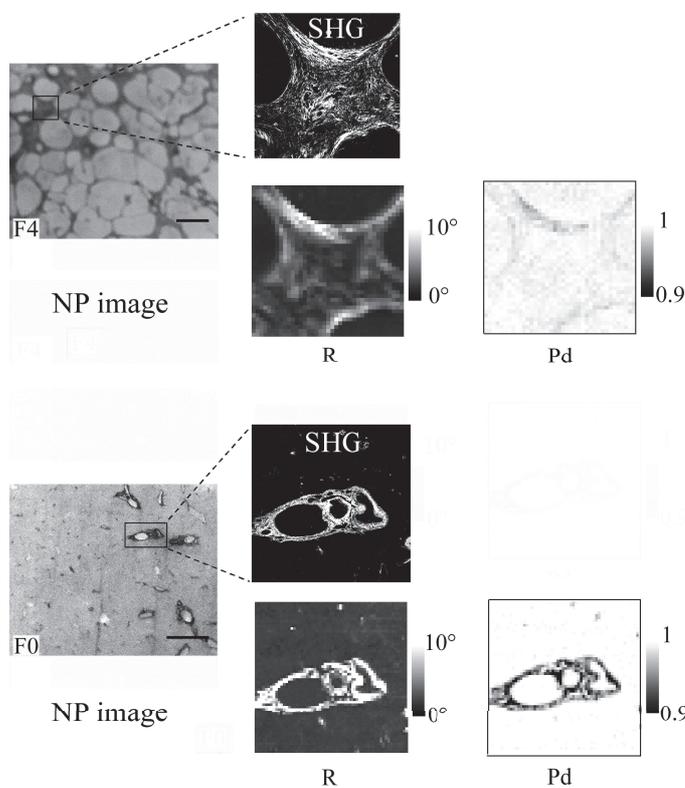


FIGURE IV.23 – Images de retardance (R), de dépolarisation (P_D) et SHG de deux échantillons de foie fibrosé de stades F0 et F4, marqués au rouge Sirius. Les images de $2,5 \times 2,5 \text{ mm}^2$ ont été obtenues avec une largeur de faisceau laser estimée à $50 \mu\text{m}$ et avec un pas latéral de $40 \mu\text{m}$.

Lorsqu'un vaisseau sanguin d'un échantillon de stade F0 est imagé, nous retrouvons une forte retardance associée aux fibres de collagène entourant naturellement le vaisseau. Cette image est de nouveau fortement similaire à l'image de SHG. Ce-

pendant, contrairement au dépôt de collagène caractéristique de la fibrose, lorsque le faisceau laser est focalisé sur les parois du vaisseau nous pouvons observer une très forte dépolarisation. Ceci est vraisemblablement lié au fait que le faisceau laser sonde des zones de biréfringence très différentes (lumière du vaisseau, endothélium, hépatocytes...), ce qui entraîne, par un effet de moyennage sur l'intensité (et non sur le champ, ce qui produirait un état polarisé), une diminution de l'indice P_D . Il est ainsi possible de séparer les contributions du collagène associé à la fibrose de celui entourant les vaisseaux sanguins grâce à cet indice.

En partant de ces données, une méthode statistique a été développée pour quantifier le niveau de fibrose sans passer par l'imagerie de retardance et d'indice de dépolarisation. Les mesures ont été effectuées sur 3500 points pour cinq échantillons présentant des stades de fibrose variant de F0 à F4. Ces échantillons ayant été évalués par deux anatomopathologistes différents, certains présentent un double score. Chaque mesure est effectuée tous les $170 \mu\text{m}$ avec une résolution de $50 \mu\text{m}$ sur une surface de $1 \times 1 \text{ cm}^2$. Seules les mesures de retardance associées à une dépolarisation supérieure à 0,98 sont associées à la fibrose, les autres mesures étant automatiquement rejetées car elles indiquent la présence de collagène appartenant aux vaisseaux.

La retardance présente une allure gaussienne de moyenne R_0 dans le cas de l'échantillon sain F0. L'écart de l'allure de la retardance par rapport à l'allure gaussienne dans le cas d'un échantillon présentant de la fibrose est caractérisé par la valeur R_{lim} pour laquelle la courbe gaussienne théorique présente une valeur égale à 1% de la retardance maximale. Deux grandeurs sont alors calculées pour estimer l'avancée de la fibrose, le rapport \bar{R}/R_0 et la valeur N , définis par les expressions suivantes :

$$\frac{\bar{R}}{R_0} = \frac{1}{R_0} \frac{\sum_{R > R_{lim}} R}{N_{sup}} \quad (\text{IV.13})$$

$$N = \frac{N_{sup}}{N_{tot}} \quad (\text{IV.14})$$

où N_{sup} est le nombre de mesures pour lesquelles la retardance est supérieure à R_{lim} et N_{tot} le nombre de mesures totale pour chaque échantillon. Le graphique présentant les valeurs de N suivant \bar{R}/R_0 est présenté à la figure IV.24.

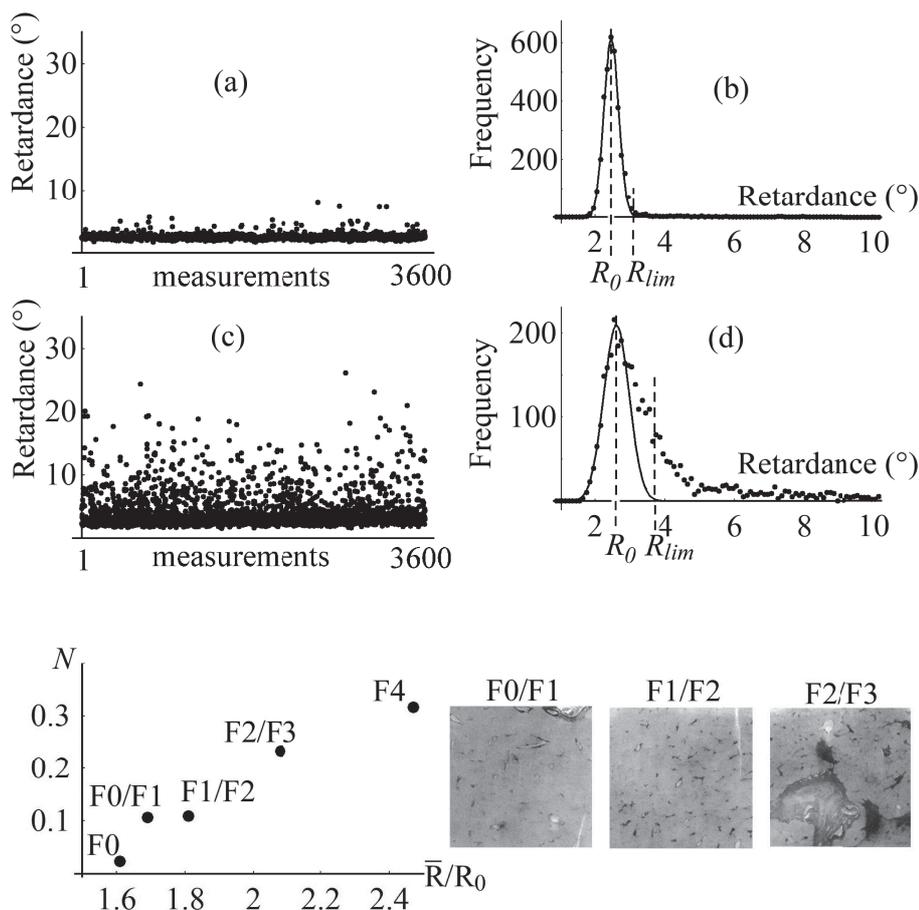


FIGURE IV.24 – Valeurs de retardance obtenues après filtrage par la dépolarisation P_D pour (a) un échantillon au stade F0 et (c) un échantillon au stade F4. Le balayage des échantillons s'effectue sur une surface de $1 \times 1 \text{ cm}^2$, avec un pas de $170 \mu\text{m}$. Les distributions des valeurs de retardance pour chaque échantillon sont données par les graphiques (b) et (d) (disques). Les faibles valeurs de R sont lissées par une courbe d'allure gaussienne (trait plein). En-dessous : représentation graphique du paramètre N en fonction du paramètre \bar{R}/R_0 .

Cette figure indique sans ambiguïté que le rapport \bar{R}/R_0 est corrélé à la quantité de fibres de collagène associées à la fibrose et se révèle être un très bon critère de discrimination. En effet, chaque stade présente un rapport différent des autres. Par ailleurs, le paramètre N est également intéressant puisqu'il représente l'extension de la fibrose dans le foie. Cependant, les stades F0/F1 et F1/F2 présentent un résultat similaire et ne sont ainsi pas séparables l'un de l'autre, contrairement aux stades plus élevés pour lesquels l'augmentation de l'aire de fibrose s'accompagne d'une augmentation de la valeur de N .

Il a ainsi été démontré que le polarimètre de Mueller instantané développée au laboratoire, permet de discriminer les stades de la fibrose hépatique avec l'avantage supplémentaire de pouvoir éliminer la contribution des fibres de collagène entourant les vaisseaux sanguins, inutile au diagnostic. Ce nouvel outil pourrait donc être utilisé en complément de l'observation classique par les anatomopathologistes, les mêmes coupes histologiques pouvant être utilisées.

IV.6.3 Mesure des paramètres de diffusion du foie fibrosé

Nous présentons ici l'application de notre méthode de mesure des paramètres optiques de diffusion développée dans le chapitre II à l'étude de la fibrose. Contrairement à la technique d'analyse morphologique ou de polarimétrie de Mueller instantanée, cette application n'a pas pour but de proposer un véritable outil de diagnostic à la fibrose hépatique.

Nous avons pour ce faire choisi d'imager deux coupes histologiques de foie fibrosé de stades F2 et F4, épaisses d'environ $150\ \mu\text{m}$, à l'aide d'un objectif 60X à immersion d'eau ($NA = 0,9$). Cette épaisseur, incompatible avec une analyse histologique, est cependant nécessaire pour remonter aux paramètres de diffusion par la méthode décrite au chapitre II. Une zone pauvre en collagène a été imagée dans le cas F2, tandis qu'une zone riche en collagène a été imagée au stade F4. Les figures IV.25 et IV.26 présentent des images typiques de ces deux échantillons à deux endroits différents.

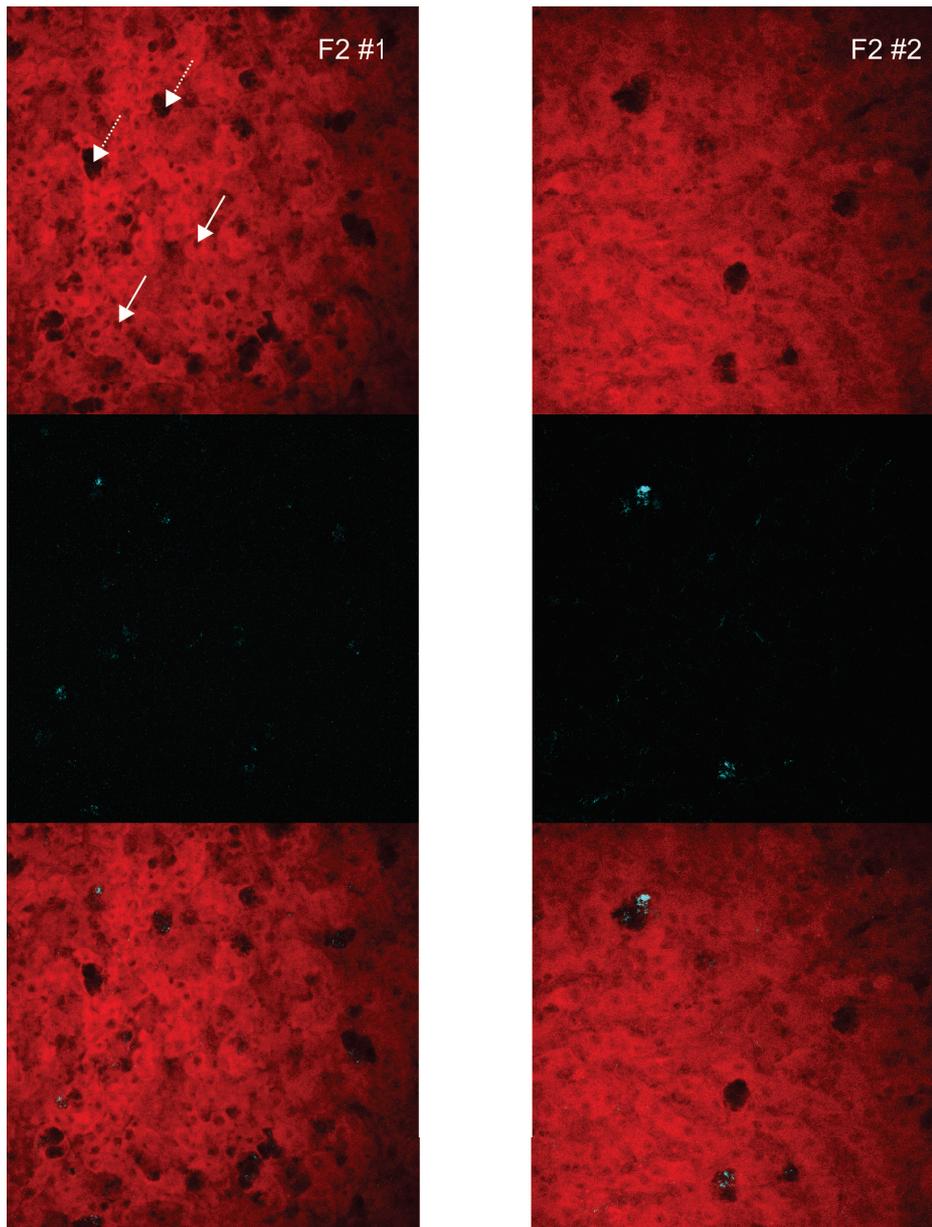


FIGURE IV.25 – Triptyques de foie fibrosé au stade F2. Chaque groupe d'images présente, de haut en bas et en fausses couleurs : l'image d'auto fluorescence à deux photons des hépatocytes (rouge), l'image SHG des fibres de collagène (cyan) et la superposition des deux signaux. Chaque image a été prise à une définition de $512 \times 512 \text{ pixels}^2$ ($\simeq 235 \times 235 \mu\text{m}^2$). L'image 2PEF est obtenue par la voie descannée (ouverture #5). Les flèches en trait plein indiquent des noyaux cellulaires, celles en pointillés des déchirures du tissu.

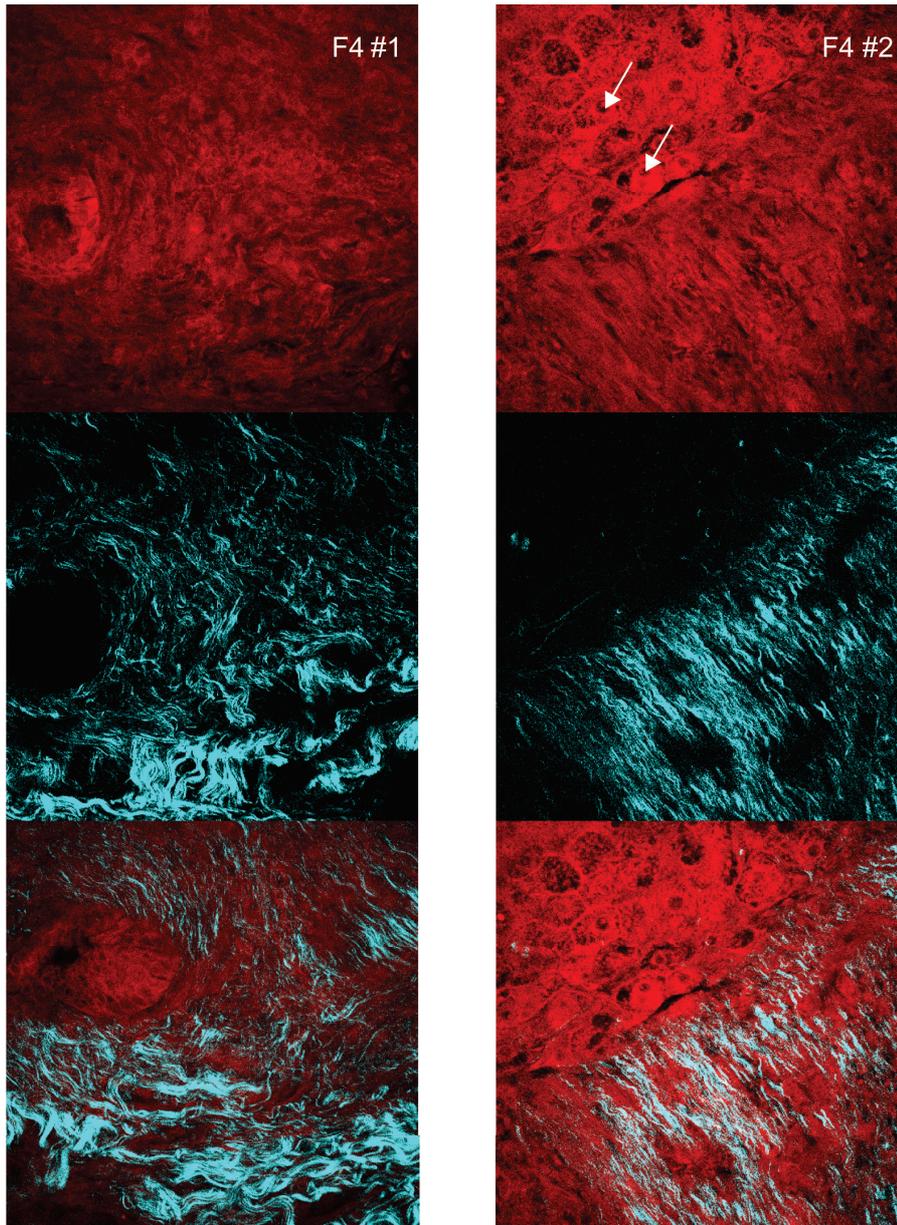


FIGURE IV.26 – Triptyques de foie fibrosé au stade F4. Chaque groupe d'images présente, de haut en bas et en fausses couleurs : l'image d'auto fluorescence à deux photons des hépatocytes (rouge), l'image SHG des fibres de collagène (cyan) et la superposition des deux signaux. Chaque image a été prise à une définition de $512 \times 512 \text{ pixels}^2$. L'image 2PEF est acquise par la voie descannée (ouverture #5). Les flèches indiquent des noyaux cellulaires.

Deux zones ont été choisies afin de mettre en évidence la variabilité des propriétés optiques des tissus biologiques. Les petits points noirs observables sur les images 2PEF sont les noyaux des hépatocytes. Les trous noirs observables sur la coupe histologique de stade F2 sont des déchirures du tissu. Notez qu'elles sont plus nombreuses dans le tissu #1 que dans le #2. Les fibres de collagène sont très peu

présentes au stade F2 dans les images sélectionnées, contrairement au stade F4.

Chaque image fait partie d'un stack allant de 0 à 70 μm pour les stades F2 (pas de l'acquisition : 5 μm) et de 0 à 150 μm pour le stade F4. La collection du signal d'autofluorescence a été réalisée par la voie NDS, par la voie descannée (ouverture #5) et par la voie confocale (trou #3 ou #4 selon l'échantillon). La figure IV.27 présente les rapports des intensités de fluorescence collectées par ces voies pour les deux zones de chacun de ces échantillons. Les coefficients de diffusion apparents et corrigés issus des pentes des logarithmes des rapports d'intensité présentés figure IV.27 sont données dans le tableau IV.4.

Échantillon	$\mu_s^{app}(\text{cm}^{-1})$	$\mu_s^{corr}(\text{cm}^{-1})$	pente p(#5)	r_0	g
F2#1	$134,1 \pm 19,7$	$117,4 \pm 18,3$	$38,6 \pm 19,6$	$0,29 \pm 0,15$	$0,991 \pm 0,007$
F2#2	$79,3 \pm 22,1$	$69,0 \pm 19,9$	$22,5 \pm 13,7$	$0,28 \pm 0,19$	$0,991 \pm 0,008$
F4#1	$165,4 \pm 30,9$	$145,4 \pm 29,1$	$27,8 \pm 8,4$	$0,17 \pm 0,06$	$0,993 \pm 0,002$
F4#2	$201,6 \pm 20,4$	$178,0 \pm 19,5$	$49,3 \pm 3,3$	$0,24 \pm 0,03$	$0,993 \pm 0,001$

TABLE IV.4 – Coefficients de diffusion apparent et corrigé et pente p(#5) issus des pentes des rapports représentés à la figure IV.27. r correspond au rapport entre p(#5) et μ_s^{app} et le facteur d'anisotropie g est issu de ce rapport selon le protocole établi au chapitre II.

Les valeurs du coefficient de diffusion restent du même ordre de grandeur malgré les structures très différentes observées. La valeur de μ_s a cependant tendance à augmenter quand le stade de fibrose augmente. Les variabilités spatiales ont déjà fait l'objet d'une discussion (cf. section II.6.2).

Par ailleurs, les valeurs des coefficients d'anisotropie sont très similaires d'un échantillon à l'autre, ce qui indique que les fibres de collagène ne semblent pas, à cette échelle, contribuer à ce phénomène. Nous ne pouvons donc pas a priori utiliser la grandeur g comme moyen de discrimination des stades de la fibrose.

Notons que l'échantillon F2 imagé au niveau de la deuxième zone présente la variabilité la plus importante si l'on se réfère à son coefficient de diffusion. Rappelons que l'évaluation de cette variabilité spatiale passe par une opération statistique sur des aires de 64×64 pixels², révélant ainsi que les coupes histologiques de foie

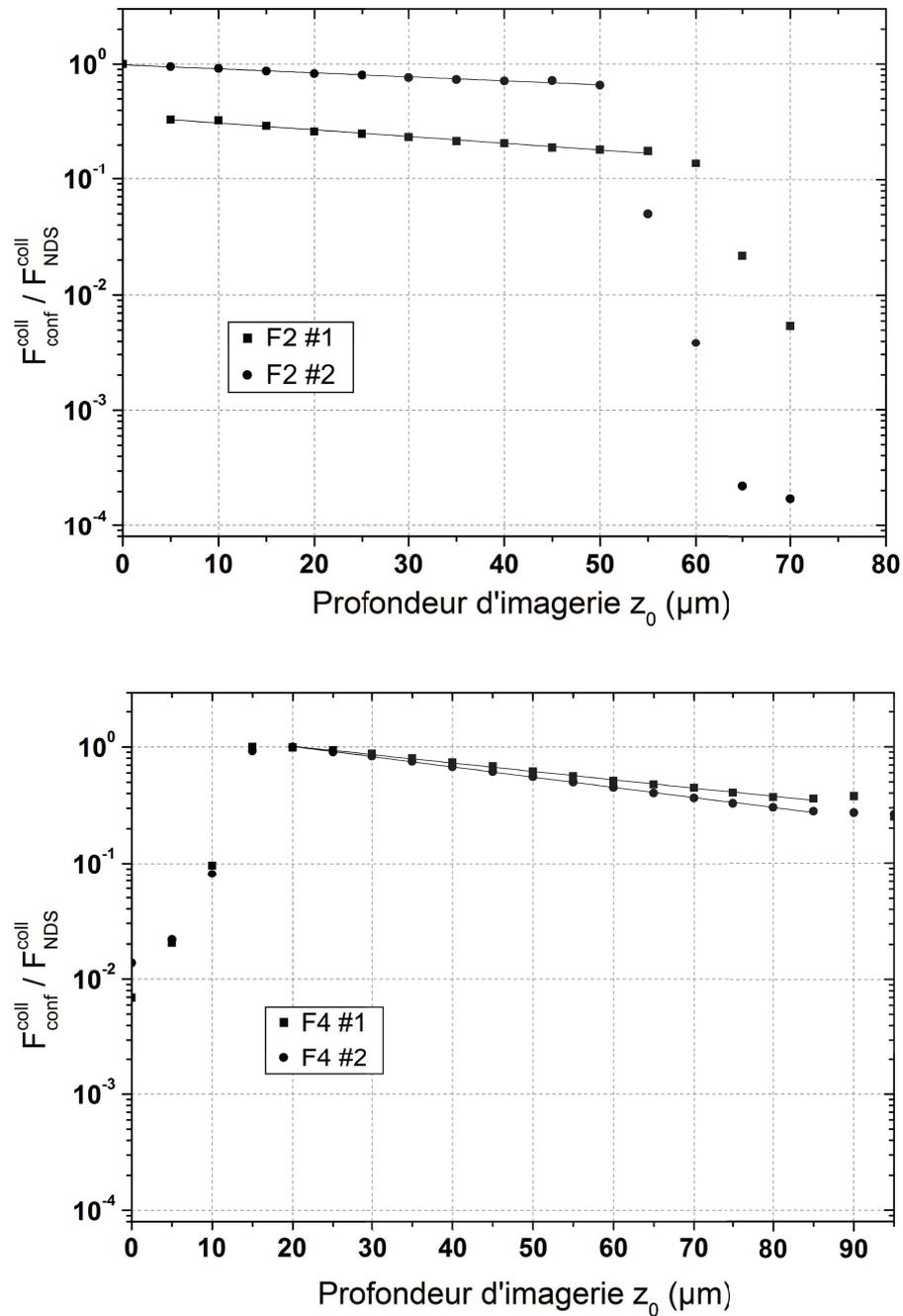


FIGURE IV.27 – Représentation en échelle semi-logarithmique des rapports des intensités de fluorescence épicolectées par les voies confocale et NDS sur deux zones de chaque échantillon de foie fibrosé (points expérimentaux). En haut : stade F2. En bas : stade F4. La collection est effectuée au trou #4 pour le foie F2 et #3 pour le foie F4. Les traits pleins sont issus des régressions linéaires des données expérimentales (lissage sur 50 μm pour le stade F2 et sur 65 μm pour le stade F4).

sont très hétérogènes du fait notamment de la présence de trous et de déchirures locales dans le tissu, probablement issus de dommages causés par la découpe et/ou la fixation entre lame et lamelle. Il s'agit ici d'une limite à notre technique, qui peut conduire à une mauvaise évaluation des paramètres optiques de diffusion. Le choix de la zone à imager est donc crucial.

La présence de collagène dans les coupes histologiques de foie ne semble donc pas influencer, à cette échelle, les paramètres de diffusion. Si en moyenne on observe une augmentation de μ_s^{corr} entre les stades F2 et F4, allant de 69 cm^{-1} à 178 cm^{-1} , la dispersion des mesures font qu'elles peuvent se recouper, comme c'est le cas des échantillons F2#1 et F4#1. Par ailleurs, les valeurs de g des quatre échantillons sont très similaires. Le foie F2 étant très pauvre en collagène, on peut supposer que la structure des fibres et leur densité ne contribuent que faiblement à la diffusion de la lumière de fluorescence par rapport à la diffusion produite par la composante cellulaire du foie.

IV.7 Conclusion

Nous avons montré dans ce chapitre que la microscopie non linéaire permet de quantifier d'une manière automatisée le collagène fibrillaire dans des biopsies de foie fibrosé. Cette approche permet en outre d'obtenir des scores reproductibles (à condition bien sûr d'étalonner le microscope et d'utiliser un algorithme commun d'analyse d'image), et élimine les problèmes liés à la coloration préalable des échantillons. Le programme informatique de scoring SHG développé au cours d'une précédente thèse a par ailleurs été complété afin de tenir compte autant que faire se peut de l'effet de la paraffine qui génère elle-même des signaux SHG.

Nous avons également présenté quelques pistes pour améliorer l'analyse et le diagnostic de la fibrose hépatique, en se basant notamment sur des aspects morphologiques que notre méthode de scoring ne prend pas en compte. L'amélioration proposée est pour l'instant limitée, mais la prise en compte de critères morphologiques à certains stades de la fibrose (fibrose arciforme) ou de structures aisément rejetées lors de l'examen visuel des lames (collagène des parois des vaisseaux sanguins, capsule du foie...) est une piste sérieuse pour améliorer notre approche. Les études par polarimétrie de Mueller instantanée ont montré qu'il était possible de séparer la contribution des fibres de collagène associé à la fibrose, de celui présent en grande quantité dans les parois des vaisseaux. Par ailleurs, la retardance provoquée

par les fibres de collagène marquées au rouge Sirius semble augmenter avec le stade de la fibrose.

La combinaison de ces différents scores pourrait permettre d'améliorer le diagnostic de la fibrose du foie. Par ailleurs, l'échelle temporelle balayée par cette étude (1986 à 2008) permettrait d'évaluer l'évolution de la maladie chez un même patient, et l'effet des traitements médicamenteux sur la réversibilité ou non de la fibrose, en relation avec la structure tridimensionnelle du collagène qui peut être imagée par microscopie SHG.

Bibliographie

A

- L. A. Adams, M. Bulsara, E. Rossi, B. DeBoer, D. Speers, J. George, J. Kench, G. Farrell, G. W. McCaughan, et G. P. Jeffrey. Hepascore : An accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis c infection. *Clinical Chemistry*, 51 (10) :1867–1873, January 2005.
- C. Aubé, P. Racineux, J. Lebigot, F. Oberti, V. Croquet, C. Argaud, P. Cales, et C. Caron. [diagnosis and quantification of hepatic fibrosis with diffusion weighted mr imaging : preliminary results]. *Journal de radiologie*, 85(3) :301–306, 2004.
- C. Aubé, F. Oberti, N. Korali, M.-A. Namour, D. Loisel, J.-Y. Tanguy, E. Valsesia, C. Pilette, M. C. Rousselet, P. Bedossa, et al. Ultrasonographic diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *Journal of hepatology*, 30(3) :472–478, 1999.

B

- P. Bedossa, D. Dargère, et V. Paradis. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis c. *Hepatology*, 38(6) :1449–1457, 2003.
- B. Braden, D. Faust, U. Sarrazin, S. Zeuzem, C. F. Dietrich, W. F. Caspary, et C. Sarrazin. ¹³C-methacetin breath test as liver function test in patients with chronic hepatitis c virus infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 21 (2) :179–185, 2005.
- S. Brewer, A. Kahn, V. Dumont, et S. Tamitegama. Le corps humain guide d'anatomie. 2010.

C

- A. Cadier-Lagnès, J.-B. Nousbaum, et d. B. o. Université. Diagnostic non invasif des varices oesophagiennes par élastométrie (fibroscan®) chez les malades atteints de cirrhose. 2009.

- J.-F. Cadranel, P. Rufat, et F. Degos. Practices of liver biopsy in france : Results of a prospective nationwide survey. *Hepatology*, 32(3) :477–481, 2000.
- P. Calès, F. Oberti, S. Michalak, I. Hubert-Fouchard, M.-C. Rousselet, A. Konaté, Y. Gallois, C. Ternisien, A. Chevailler, et F. Lunel. A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology*, 42(6) :1373–1381, 2005.
- P. Campagnola. Second harmonic generation imaging microscopy : Applications to diseases diagnostics. *Analytical Chemistry*, 83(9) :3224–3231, May 2011.
- C. Couinaud. Le foie : études anatomiques et chirurgicales. 1957.

D

- I. Denicolo, A. F. Craievich, et J. Doucet. Xray diffraction and calorimetric phase study of a binary paraffin : C₂₃H₄₈–C₂₄H₅₀. *The Journal of Chemical Physics*, 80 (12), 1984.
- S. Deuffic, L. Buffat, T. Poynard, et A.-J. Valleron. Modeling the hepatitis c virus epidemic in france. *Hepatology*, 29(5) :1596–1601, 1999.
- D. L. Dorset. The crystal structure of waxes. *Acta crystallographica. Section B, Structural science*, 51 (Pt 6) :1021–1028, December 1995.
- M. Dubreuil, S. Rivet, B. Le Jeune, et J. Cariou. Snapshot mueller matrix polarimeter by wavelength polarization coding. *Optics Express*, 15(21) :13660–13668, October 2007.
- M. Dubreuil, P. Babilotte, L. Martin, D. Sevrain, S. Rivet, Y. Le Grand, G. Le Brun, B. Turlin, et B. Le Jeune. Mueller matrix polarimetry for improved liver fibrosis diagnosis. *Optics Letters*, 37(6) :1061–1063, March 2012.

E

- A. C. El Khoury, C. Wallace, W. K. Klimack, et H. Razavi. Economic burden of hepatitis c-associated diseases : Europe, asia pacific, and the americas. *Journal of Medical Economics*, 15(5) :887–896, August 2012.

F

- C. Fierbinteanu, R. Papacocea, L. Tribus, et A. Badarau. Can we replace liver biopsy with non-invasive procedures? September 2011.
- I. Freund, M. Deutsch, et A. Sprecher. Connective tissue polarity. optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon. *Biophysical Journal*, 50(4) :693–712, October 1986.
- M. Friedrich-Rust, K. Wunder, S. Kriener, F. Sotoudeh, S. Richter, J. Bojunga, E. Herrmann, T. Poynard, C. F. Dietrich, J. Vermehren, S. Zeuzem, et C. Sarrazin. Liver fibrosis in viral hepatitis : Noninvasive assessment with acoustic radiation force impulse imaging versus transient elastography1. *Radiology*, 252(2) :595–604, January 2009.

G

- 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. January 2009.
- L. Gailhouste, Y. L. Grand, C. Odin, D. Guyader, B. Turlin, F. Ezan, Y. Désille, T. Guilbert, A. Bessard, C. Frémin, N. Theret, et G. Baffet. Fibrillar collagen scoring by second harmonic microscopy : A new tool in the assessment of liver fibrosis. *Journal of Hepatology*, 52(3) :398–406, March 2010.
- M. Gheyle, C. Puttevils, et J. P. Logghe. Le rouge sirius comme coloration de routine pour les fibres collagènes. *Revue française d'histotechnologie*, 4(1) :7–10.
- Z. D. Goodman. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *Journal of Hepatology*, 47(4) :598–607, October 2007.
- T. Guilbert. Microscopie multiphotonique de protéines fibrillaires : application à l'étude de la fibrose hépatique. January 2010.
- T. Guilbert, C. Odin, Y. L. Grand, L. Gailhouste, B. Turlin, F. Ezan, Y. Désille, G. Baffet, et D. Guyader. A robust collagen scoring method for human liver fibrosis by second harmonic microscopy. *Optics Express*, 18(25) :25794–25807, 2010.

H

M. Harada, K.-i. Muramatsu, et S. Kurimura. Quasi-phase-matched second harmonic generation in crystal quartz. *5633* :40–54, 2005.

Haute Autorité de Santé. Méthodes d'évaluation de la fibrose hépatique au cours des hépatopathies chroniques. 2006.

L. Huwart, C. Sempoux, E. Vicaud, N. Salameh, L. Annet, E. Danse, F. Peeters, L. C. ter Beek, J. Rahier, R. Sinkus, Y. Horsmans, et B. E. Van Beers. Magnetic resonance elastography for the noninvasive staging of liver fibrosis. *Gastroenterology*, 135(1) :32–40, July 2008.

J

L. C. U. Junqueira, G. Bignolas, et R. R. Brentani. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical Journal*, 11(4) :447–455, July 1979.

K

Kamal Ishak. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of Hepatology*, 22(6) :696–699, 1995.

A. Kuszlik, G. Meyer, P. Heezen, et M. Stepanski. Solvent-free slack wax de-oiling—Physical limits. *Chemical Engineering Research and Design*, 88(9) :1279–1283, September 2010.

L

T. Lamireau, A. Desmoulière, P. Bioulac-Sage, et J. Rosenbaum. Mécanismes de la fibrogénèse hépatique. *Archives de Pédiatrie*, 9(4) :392–405, April 2002.

B. Laude-Boulestéix, A. De Martino, B. Drévilon, et L. Schwartz. Mueller polarimetric imaging system with liquid crystals. *Applied Optics*, 43(14) :2824–2832, May 2004.

V. Leroy, M.-N. Hilleret, N. Sturm, C. Trocme, J.-C. Renversez, P. Faure, F. Morel, et J.-P. Zarski. Prospective comparison of six non-invasive scores for the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis c. *Journal of Hepatology*, 46(5) :775 – 782, 2007.

S.-Y. Lu et R. A. Chipman. Interpretation of mueller matrices based on polar decomposition. *Journal of the Optical Society of America A*, 13(5) :1106–1113, May 1996.

M

G. S. Montes. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell biology international*, 20(1) :15–27, January 1996.

O

C. Odin, Y. Le Grand, A. Renault, L. Gailhouste, et G. Baffet. Orientation fields of nonlinear biological fibrils by second harmonic generation microscopy. *Journal of Microscopy*, 229(1) :32–38, 2008a.

C. Odin, T. Guilbert, A. Alkilani, O. P. Boryskina, V. Fleury, et Y. Le Grand. Collagen and myosin characterization by orientation field second harmonic microscopy. *Optics express*, 16(20) :16151–16165, September 2008b.

C. Odin, T. Guilbert, A. Alkilani, O. P. Boryskina, V. Fleury, Y. Le Grand, et al. Collagen and myosin characterization by orientation field second harmonic microscopy. *Opt. Express*, 16(20) :16151–16165, 2008c.

Organisation Mondiale de la Santé. Prévention et lutte contre l'hépatite virale : cadre pour l'action mondiale. 2010.

P

A.-M. Pena, A. Fabre, D. Débarre, J. Marchal-Somme, B. Crestani, J.-L. Martin, E. Beaurepaire, et M.-C. Schanne-Klein. Three-dimensional investigation and scoring of extracellular matrix remodeling during lung fibrosis using multiphoton microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 70(2) :162–170, 2007.

J. F. Perz, G. L. Armstrong, L. A. Farrington, Y. J. Hutin, et B. P. Bell. The contributions of hepatitis b virus and hepatitis c virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *Journal of Hepatology*, 45(4) :529–538, October 2006.

T. Poynard, J. McHutchison, M. Manns, R. P. Myers, et J. Albrecht. Biochemical surrogate markers of liver fibrosis and activity in a randomized trial of peginterferon alfa-2b and ribavirin. *Hepatology*, 38(2) :481–492, 2003.

R

A. Regev, M. Berho, L. J. Jeffers, C. Milikowski, E. G. Molina, N. T. Pylsopoulos, Z.-Z. Feng, K. R. Reddy, et E. R. Schiff. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *The American Journal of Gastroenterology*, 97(10) :2614–2618, October 2002.

S

L. Sandrin, B. Fourquet, J.-M. Hasquenoph, S. Yon, C. Fournier, F. Mal, C. Christidis, M. Ziol, B. Poulet, F. Kazemi, M. Beaugrand, et R. Palau. Transient elastography : a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 29(12) :1705–1713, December 2003.

D. Sevrain. Mise en place d'une expérience de microscopie multiphotonique. 2010.

G. Shiha et K. Zalata. Ishak versus metavir : Terminology, convertibility and correlation with laboratory changes in chronic hepatitis c. *Liver Biopsy. Ed by Hirokazu Takahashi, INTECHWEB. ORG*, pages 155–170, 2011.

M. Strupler, A.-M. Pena, M. Hernest, P.-L. Tharaux, J.-L. Martin, E. Beaurepaire, et M.-C. Schanne-Klein. Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues. *Optics Express*, 15(7) :4054–4065, April 2007.

M. Strupler. Imagerie du collagène par microscopie multiphotonique : application aux fibres rénales (thèse). 2008.

J. Su, R. A. Brook, N. L. Kleinman, et P. Corey-Lisle. The impact of hepatitis c virus infection on work absence, productivity, and healthcare benefit costs. *Hepatology*, 52(2) :436–442, 2010.

T.-L. Sun, H.-C. Chen, C.-H. Yang, W.-C. Lin, W.-L. Chen, L.-L. Chiou, K.-H. Kim, Y.-F. Chen, H.-S. Lee, C.-Y. Dong, P. T. C. So, G.-T. Huang, Y.-M. Jeng, V. Hovhannisyan, Y. Liu, et M.-C. Sung. Ex vivo imaging and quantification of liver fibrosis using second-harmonic generation microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 15(3) :036002–036002–6, 2010.

T

The METAVIR cooperative group. Proposition d'une grille de recueil des liaisons histopathologiques dans l'hépatite chronique virale c. *Annales de Pathologie*, 13 : 260–265, 1993.

V

V. K. Valev, A. V. Silhanek, N. Smisdom, B. De Clercq, W. Gillijns, O. A. Akt-sipetrov, M. Ameloot, V. V. Moshchalkov, et T. Verbiest. Linearly polarized second harmonic generation microscopy reveals chirality. *Optics Express*, 18(8) : 8286–8293, 2010.

T. Verbiest, K. Clays, et V. Rodriguez. Second-order nonlinear optical characteri-zation techniques : An introduction. February 2009.

W

R. M. Williams, W. R. Zipfel, et W. W. Webb. Interpreting second-harmonic gene-ration images of collagen i fibrils. *Biophysical Journal*, 88(2) :1377–1386, February 2005.

Y

C. Yang et J. Mertz. Transmission confocal laser scanning microscopy with a virtual pinhole based on nonlinear detection. *Optics letters*, 28(4) :224–226, February 2003.

Conclusion générale

Ce travail de thèse a été l'occasion d'aborder différents aspects de la microscopie non linéaire cohérente et incohérente, par le biais instrumental et des applications biomédicales.

En premier lieu, nous avons développé une nouvelle méthode de mesure des paramètres de diffusion de milieux d'intérêt biologique basée sur la microscopie de fluorescence excitée à deux photons. Notre approche par simulation Monte-Carlo de la propagation de la lumière en milieu diffusant et de la collection de la fluorescence selon les différentes modalités de notre microscope nous a permis d'une part de valider les hypothèses de base nécessaires à la mesure du coefficient de diffusion μ_s , d'autre part de remonter au facteur d'anisotropie g via une courbe d'étalonnage simulée. Nous avons en outre montré à partir de milieux modèles, que notre méthode était discriminante spatialement. Elle doit à présent être valorisée dans le cadre d'applications biomédicales.

En second lieu, dans le cadre d'une collaboration avec des biologistes et des médecins du Laboratoire de Neurosciences de l'université de Brest, nous avons proposé un protocole d'imagerie en profondeur des neurones sensoriels au sein d'explants de peau humaine. La mise au point de ce protocole est passée par le choix initial d'une sonde fluorescente adaptée. Ce choix a été réalisé après quantification in situ et par microscopie à deux photons, des sections efficaces d'absorption à deux photons de plusieurs candidats fluorescents spécifiques des neurones, selon une méthode de calibration, à notre connaissance originale, utilisant la microscopie confocale.

En dernier lieu, et à l'occasion d'une collaboration avec des hépatologues anglais spécialistes de la fibrose du foie, nous avons mis en œuvre une méthode de quantification du collagène fibrillaire basée sur la microscopie SHG et développée dans le cadre de deux précédentes thèses. Les biopsies de foie fibrosé issus d'une cohorte de plus de 100 patients porteurs du virus de l'hépatite C ont été quantifiées

et les résultats comparés, pour la première fois à notre connaissance, à une double classification anatomopathologique (tests METAVIR et Ishak). La capacité de la méthode SHG à discriminer entre les stades peu évolués et évolués de la maladie a été démontrée sur la base de tests statistiques. Un certain nombre de problèmes sont néanmoins apparus au cours de notre étude, en particulier celui de la contribution de la paraffine au signal SHG. Nous avons alors proposé des solutions optiques et de traitement d'image qui pourraient permettre à terme de s'affranchir de cette contribution. Enfin nous avons discuté d'un critère de discrimination supplémentaire, du type morphologique, qui pourrait permettre de réduire le nombre de faux positifs et de faux négatifs.

Ce travail de thèse est une illustration du potentiel de la microscopie non linéaire en sciences du vivant. D'autres études sont en cours au laboratoire, comme l'utilisation de la microscopie bimodale 2PEF/SHG pour l'imagerie structurelle et fonctionnelle du muscle squelettique immobilisé et septique, ou l'imagerie de glandes salivaires dans le cas de patients atteints de maladies auto-immunes, en collaboration avec le CHU de Brest, ou encore la caractérisation de nouveaux marqueurs membranaires non linéaires synthétisés au Laboratoire de Chimie CEMCA de l'Université de Brest.

Annexe A

Développement mathématique de la correction du coefficient de diffusion apparent

Afin d'obtenir l'équation II.44 permettant de déterminer le coefficient de diffusion réel d'un milieu turbide à partir du coefficient de diffusion apparent, nous passons par la méthode des moindres carrés. Cette méthode vise à obtenir la meilleure fonction décrivant un jeu de données expérimentales en minimisant l'écart entre ces données et celles obtenues à l'aide d'une fonction de modélisation. Nous rappelons dans la section suivante les résultats de cette méthode pour des fonctions de type affine et du second degré.

A.1 Méthode des moindres carrés

A.1.1 Fonction affine

Soit un ensemble de N couples de données $\{z_j; y_j\}$ ($j \in [1; N]$), et α et β deux nombres réels non nuls. Nous cherchons une relation entre la variable z prenant ses valeurs parmi les z_j et la variable y prenant ses valeurs parmi les y_j .

Supposons dans un premier temps que cette relation suit une loi affine telle que $y = \alpha z + \beta$. La méthode des moindres carrés revient à déterminer la valeur de α telle que la somme $\sum_{j=1}^N (\alpha z_j + \beta - y_j)^2$ soit minimisée. L'annulation de la dérivée de cette somme par rapport à α implique que :

$$\frac{d}{d\alpha} \sum_{j=1}^N (\alpha z_j + \beta - y_j)^2 = 0 \quad (\text{A.1})$$

$$\Leftrightarrow 2 \sum_{j=1}^N z_j (\alpha z_j + \beta - y_j) = 0 \quad (\text{A.2})$$

soit

$$\alpha \sum_{j=1}^N z_j^2 + \beta \sum_{j=1}^N z_j - \sum_{j=1}^N y_j z_j = 0 \quad (\text{A.3})$$

On définit la valeur moyenne d'une grandeur A possédant N valeurs a_j par :

$$\langle A \rangle = \frac{\sum_{j=1}^N a_j}{N} \quad (\text{A.4})$$

Si l'on divise les deux membres de l'équation A.3 par N , on obtient :

$$\alpha \langle z \rangle^2 + \beta \langle z \rangle - \langle zy \rangle = 0 \quad (\text{A.5})$$

Or

$$\langle y \rangle = \alpha \langle z \rangle + \beta \quad (\text{A.6})$$

$$\Leftrightarrow \beta = \langle y \rangle - \alpha \langle z \rangle \quad (\text{A.7})$$

En substituant β par sa valeur dans A.5, le paramètre α qui minimise la somme $\sum_{j=1}^N (\alpha z_j + \beta - y_j)^2$ est donné par :

$$\alpha = \frac{\langle zy \rangle - \langle z \rangle \langle y \rangle}{\langle z^2 \rangle - \langle z \rangle^2} \quad (\text{A.8})$$

A.1.2 Fonction polynomiale d'ordre 2

Supposons cette fois que les données ne suivent pas une loi linéaire mais possèdent une dépendance quadratique avec la grandeur z . La fonction liant y et z s'écrit cette fois :

$$y = az + c + bz^2 \quad , \quad (\text{A.9})$$

où a , b et c sont nombres réels. La pente apparente α dépend alors de b . En appliquant la même méthode que précédemment, nous obtenons :

$$\alpha = a + b \times \frac{\langle z^3 \rangle - \langle z \rangle \langle z^2 \rangle}{\langle z^2 \rangle - \langle z \rangle^2}$$

$$\alpha = a + bz_{corr} \quad , \quad (\text{A.10})$$

en utilisant l'expression de α donnée par l'équation A.8. z_{corr} est définie par :

$$z_{corr} = \frac{\langle z^3 \rangle - \langle z \rangle \langle z^2 \rangle}{\langle z^2 \rangle - \langle z \rangle^2} \quad (\text{A.11})$$

Notons que lorsque $b = 0$, nous retrouvons bien les résultats propres à la fonction affine. a correspond donc à la pente réelle de y en fonction de z , et α la pente apparente.

A.2 Correction du coefficient de diffusion apparent

Nous avons vu à la section II.5.3 que la collection des photons balistiques décroît de manière exponentielle avec la profondeur d'imagerie z (cf. équation II.42). Nous rappelons que cette dépendance s'écrit :

$$\eta_{bal}(z, \mu_s) \sim \frac{1}{2} \int_1^{CA^{-1}} \frac{e^{-\mu_s z u}}{u^2} du \quad , \quad (\text{A.12})$$

où $\eta_{bal}(z, \mu_s)$ est l'efficacité de collection du système de microscopie, μ_s est le coefficient de diffusion du milieu fluorescent imagé, $ca = \cos(\theta_{NA})$ avec θ_{NA} le demi-angle d'ouverture du cône d'acceptance de l'objectif de microscope et $u = \frac{1}{\cos(\theta)}$. L'efficacité de collection des photons balistiques émis à la surface de l'échantillon ($z = 0$) ou par un milieu non diffusant ($\mu_s = 0$) est donnée par $\eta_0 = \frac{1}{2} (1 - \cos\theta_{NA})$. En normalisant η_{bal} par η_0 , on peut écrire :

$$\eta_{bal,n} = \frac{\eta_{bal}}{\eta_0} = \int_1^{CA^{-1}} e^{-\mu_s z u} \frac{1}{1 - CA} \frac{1}{u^2} du$$

$$\Leftrightarrow \eta_{bal,n} = \int_1^{CA^{-1}} e^{-\mu_s z u} w(u) du \quad , \quad (\text{A.13})$$

où $w(u)$ est la densité de probabilité définie sur $[1; CA^{-1}]$ par :

$$w(u) = \int_1^{CA^{-1}} \frac{1}{1 - CA} \frac{1}{u^2} du \quad , \quad (A.14)$$

et les moyennes $\langle u^n \rangle_w$ sont données par :

$$\langle u^n \rangle_w = \int_1^{CA^{-1}} w(u) u^n du \quad (A.15)$$

Nous obtenons après intégration :

$$\langle u \rangle_w = \frac{-\ln CA}{1 - CA} \quad (A.16)$$

$$\langle u^2 \rangle_w - \langle u \rangle_w^2 = \frac{1}{CA} - \left(\frac{\ln CA}{1 - CA} \right)^2 \quad (A.17)$$

et $\int_1^{CA^{-1}} w(u) du = 1.$

Si l'on développe la fonction $e^{-\mu_s z u}$ suivant les puissances de $\mu_s z$, on obtient :

$$e^{-\mu_s z u} \simeq 1 - \mu_s z u + \frac{(\mu_s z)^2}{2} u^2 + o(\mu_s z)^3 \quad (A.18)$$

En injectant ce résultat dans A.13, il vient :

$$\begin{aligned} \eta_{bal,n} &= \int_1^{CA^{-1}} \left(1 - \mu_s z u + \frac{(\mu_s z)^2}{2} u^2 \right) w(u) du \\ \Leftrightarrow \eta_{bal,n} &= \int_1^{CA^{-1}} w(u) du - \mu_s z \int_1^{CA^{-1}} w(u) u du + \frac{(\mu_s z)^2}{2} \int_1^{CA^{-1}} w(u) u^2 du \\ \Leftrightarrow \eta_{bal,n} &= 1 - \mu_s z \langle u \rangle_w + \frac{(\mu_s z)^2}{2} \langle u^2 \rangle_w \end{aligned} \quad (A.19)$$

En prenant la fonction $\ln(x)$ de part et d'autre de l'équation A.19

$$\ln(\eta_{bal,n}) = \ln \left(1 - \mu_s z \langle u \rangle_w + \frac{(\mu_s z)^2}{2} \langle u^2 \rangle_w \right) \quad (A.20)$$

$$\Leftrightarrow \ln(\eta_{bal,n}) = \ln(1 + X) \quad , \quad (A.21)$$

avec $X = -\mu_s z \langle u \rangle_w + \frac{(\mu_s z)^2}{2} \langle u^2 \rangle_w$. Or, le développement de Taylor en 0 de la fonc-

tion $\ln(1+X)$ est donné par : $\ln(1+X) = \sum_{k=1}^{\infty} \frac{(-1)^{k-1}}{k!} X^k$. Ainsi, le développement de Taylor à l'ordre 2 de la fonction $\ln(\eta_{bal,n})$ permet d'aboutir à l'expression :

$$\begin{aligned} \ln(\eta_{bal,n}) &\simeq -\mu_s z \langle u \rangle_w + \frac{(\mu_s z)^2}{2} \langle u^2 \rangle_w - \frac{(\mu_s z)^2}{2} \langle u \rangle_w^2 + o((\mu_s z)^3) \\ \Leftrightarrow \ln(\eta_{bal,n}) &\simeq -\mu_s z \langle u \rangle_w + \frac{(\mu_s z)^2}{2} (\langle u^2 \rangle_w - \langle u \rangle_w^2) + o((\mu_s z)^3) \quad , \quad (\text{A.22}) \end{aligned}$$

qui peut être réécrite sous la forme de l'équation A.9 : $y = az + bz^2 + c$, avec $a = -\mu_s \langle u \rangle_w$, $b = \frac{(\mu_s)^2}{2} (\langle u^2 \rangle_w - \langle u \rangle_w^2)$ et $c = o((\mu_s z)^3)$.

Nous avons montré à l'aide de simulations Monte-Carlo (cf. section II.5.2) que les logarithmes des efficacités de collection dépendent de manière linéaire de la profondeur d'imagerie z_0 . Cette dépendance implique que $\ln(\eta_{bal,n})$ peut s'écrire sous la forme $\ln(\eta_{bal,n}) = -\mu_s^{app} z$, où μ_s^{app} est une pente apparente.

Posons $\langle u \rangle_w = -\frac{1}{A}$. On en déduit que $\langle u^2 \rangle_w - \langle u \rangle_w^2 = \frac{1}{CA} - \frac{1}{A^2}$ à partir de l'équation A.17. En remarquant par ailleurs que μ_s^{app} joue le même rôle que α dans l'équation A.10, nous pouvons écrire :

$$-\mu_s^{app} = \frac{\mu_s}{A} + \frac{\mu_s^2}{2} \left(\frac{1}{CA} - \frac{1}{A^2} \right) z_{corr} \quad , \quad (\text{A.23})$$

soit, en posant $\frac{1}{C} = \frac{z_{corr}}{2} \left(\frac{1}{CA} - \frac{1}{A^2} \right)$:

$$\begin{aligned} -\mu_s^{app} &= \frac{\mu_s}{A} + \frac{\mu_s^2}{C} \\ \Leftrightarrow \mu_s^2 + \frac{C\mu_s}{A} + C\mu_s^{app} &= 0 \quad (\text{A.24}) \end{aligned}$$

Cette équation du second degré en μ_s admet pour solutions :

$$\mu_s^{1,2} = \frac{C}{2A} \left[1 \pm \sqrt{1 - \frac{4A^2}{C} \mu_s^{app}} \right] = 0 \quad (\text{A.25})$$

En remarquant que $\frac{4A^2}{C} \mu_s^{app} > 1$, nous pouvons retenir le signe "-" pour éviter de donner à μ_s une valeur négative. En utilisant la loi de conjugaisons des racines, il vient :

$$\mu_s = A\mu_s^{app} \frac{2}{1 + \sqrt{1 - \frac{4A^2}{C} \mu_s^{app}}} \quad , \quad (\text{A.26})$$

soit, en notant que $\frac{4A^2}{C} = 2z_{corr} \left(\frac{A^2}{CA} - 1 \right)$ et en écrivant $\mu_s = \mu_s^{corr}$:

$$\mu_s^{corr} = A\mu_s^{app} \frac{2}{1 + \sqrt{1 - 2\mu_s^{app} z_{corr} B}} \quad , \quad (\text{A.27})$$

en posant $B = \left[\frac{A^2}{CA} - 1 \right]$.

Annexe B

Préparation des gels biomimétiques

Les gels présentés à la section II.6 sont tous préparés selon le protocole suivant.

Préparation du gel à 4%

On mélange dans un tricol de 100 mL 0,6 g d'agarose en poudre et 15 mL d'eau déminéralisée. Le mélange est chauffé dans avec un montage à reflux à environ 90°C (on veille à ne pas dépasser 100°C pour minimiser les pertes par évaporation). La solution obtenue après dissolution de l'agarose doit être totalement incolore et transparente.

En parallèle, des tubes à hémolyse sont placés au bain-marie à 70°C. Ces tubes thermostatés seront utilisés pour les mélanges, afin d'éviter la réticulation du gel qui s'effectue entre 30 et 50 °C suivant l'agarose. Pour la même raison, des pipettes Pasteur sont placées à l'étuve à 95°C. Elles serviront au prélèvement de la solution d'agarose.

Fabrication des mélanges

La concentration en billes étant précédemment déterminée par le programme MatLab, les volumes de solution d'agarose et de billes à prélever sont simples à calculer. Le tableau B.1 récapitule les volumes à prélever (en μL) pour les 6 types de gels :

Diamètre de billes (μm)	$\mu_s = 100 \text{ cm}^{-1}$		$\mu_s = 50 \text{ cm}^{-1}$	
	Agarose	Billes	Agarose	Billes
0,54	1225	275	1360	140
1,53	1325	175	1410	90
4,52	825	675	1160	340

TABLE B.1 – Volumes des solutions d'agarose et de billes à prélever pour obtenir des gels diffusants aux coefficients de diffusion désirés.

Les incertitudes sur les volumes ont été estimées de l'ordre de 10% pour les volumes supérieurs à 750 μL et de 2% pour les autres. Ceci est dû au changement de micropipettes entre petits et grands volumes, celle servant pour les grands volumes étant moins précises.

Deux gels supplémentaires n'incluant pas de microbilles sont fabriqués. Le premier contient le fluorophore et est utilisé comme référence pour l'expérience de transmission collimatée, le deuxième est un gel simple et sert à évaluer le coefficient d'absorption dans cette même expérience. Les mélanges sont homogénéisés par centrifugation à l'aide d'un vortex. On rajoute ensuite 4 gouttes de la solution fluorescente pour obtenir une concentration finale d'environ 20 μM et on homogénéise de nouveau. On prélève avec une pipette Pasteur chaude la moitié d'un premier mélange pour l'injecter dans un puits de plexiglas, préalablement couvert à l'opposé du trou d'injection d'une lamelle couvre-objet. Cette opération est répétée avec les autres solutions dans les puits restant. On finit par couvrir et sceller au vernis les ouvertures avec une lame de microscope.

Capillaires de gels

Les volumes restant de préparation servent à remplir les capillaires en verre. Pour ce faire, une coupelle en aluminium est maintenue dans un cristallisateur rempli d'eau chaude et le reste de solution (gel liquide marqué et microbilles) y est versé. Les six capillaires sont remplis par aspiration de la préparation encore chaude. L'opération est répétée pour chaque mélange. Chaque ouverture des capillaires est ensuite scellée avec de la paraffine afin d'éviter toute évaporation qui modifierait la concentration des microbilles dans le gel, et donc le coefficient de diffusion.

Publications et Communications

Publications

M. Dubreuil, P. Babilotte, L. Martin, D. Sevrain, S. Rivet, Y. Le Grand, G. Le Brun, B. Turlin, et B. Le Jeune. Mueller matrix polarimetry for improved liver fibrosis diagnosis. *Optics Letters*, 37(6) :1061–1063, 2012.

D. Sevrain, Y. Le Grand, V. Buhé, C. Jeanmaire, G. Pauly, J-L. Carré, L. Misery et N. Lebonvallet. Two-photon microscopy of dermal innervation in a human re-innervated model of skin. *Experimental dermatology*, 22 (4) :290–291, 2013.

D. Sevrain, M. Dubreuil, A. Leray, C. Odin et Y. Le Grand. Measuring the scattering coefficient of turbid media from two-photon microscopy. *Optics Express*, 21 (21) :25221-35, 2013.

Communications

Affiches

D. Sevrain, Y. Le Grand, N. Lebonvallet et L. Misery. Microscopie de fluorescence à deux photons de la peau innervée. *Journée de l'IFR ScInBios*, Brest, 2011.

D. Sevrain, Y. Le Grand, N. Lebonvallet et L. Misery. Microscopie biphotonique de la peau innervée. *Horizons de l'Optique*, Marseille, 2011.

D. Sevrain, Y. Le Grand, N. Lebonvallet et L. Misery. Microscopie de fluorescence à deux photons de la peau innervée. *Journée des doctorants de l'École Doctorale SICMA*, Brest, 2011.

D. Sevrain, A. Leray, C. Odin et Y. Le Grand. Mesure des paramètres de diffusion de milieux turbides par microscopie à deux photons. *OptDiag 2012*, Paris, 2012.

G.E. Dolman, D. Sevrain, C. Odin, Y. Le Grand, A.M. Zaitoun, W.L Irving et I.N. Guha. Second harmonic generation microscopy of collagen and evaluation of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Digestive Disorders Federation*, Liverpool (UK), 2012.

D. Sevrain, G. Dolman, A. M. Zaitoun, W. L. Irving, I. N. Guha, C. Odin et Y. Le Grand. Nonlinear microscopy for the evaluation of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Nouvelles méthodologies en imagerie du vivant*, Lyon, 2012.

Communications orales

D. Sevrain, G. Dolman, A. M. Zaitoun, W. L. Irving, I. N. Guha, C. Odin et Y. Le Grand. Quantification de la fibrose du foie par microscopie non linéaire chez des patients infectés par le virus de l'hépatite C. *OptDiag 2012*, Paris, 2012.

D. Sevrain, G. Dolman, A. M. Zaitoun, W. L. Irving, I. N. Guha, C. Odin et Y. Le Grand. Quantification de la fibrose hépatique par microscopie non linéaire. *Journée de la SFR ScInBios*, Rennes, 2012.

D. Sevrain, G. Dolman, A. M. Zaitoun, W. L. Irving, I. N. Guha, C. Odin et Y. Le Grand. Quantification de la fibrose du foie par microscopie non linéaire.

D. Sevrain, M. Dubreuil, A. Leray, C. Odin et Y. Le Grand. Mesure du coefficient de diffusion de milieux turbides par microscopie non linéaire. *Journée des doctorants de l'École Doctorale SICMA*, Plouzané, 2013.

Développements en microscopie non linéaire cohérente et incohérente et applications

Résumé : Les techniques de microscopie non linéaire connaissent un essor considérable en sciences du vivant, du fait de leur capacité à imager les tissus biologiques en profondeur et à exploiter différents contrastes dont les plus connus sont la fluorescence excitée à deux photons (2PEF) et la génération de second harmonique (SHG).

Ce travail de thèse s'articule autour de la métrologie de milieux diffusants et d'applications biomédicales de la microscopie non linéaire. Après une présentation générale de la technique, nous décrivons une méthode originale de mesure du coefficient de diffusion μ_s et du facteur d'anisotropie g de milieux turbides épais basée sur la comparaison des intensités de fluorescence épi-collectées selon trois modalités de notre microscope non linéaire. Notre méthode est alors appliquée à la caractérisation de gels biomimétiques et d'échantillons d'intérêt biologique. Le manuscrit aborde ensuite le problème de l'imagerie en profondeur d'explants de peau humaine ré-innervée par des neurones sensoriels de rats nouveau-nés. Le choix du marqueur neuronal fluorescent fait l'objet d'une mesure in situ de la section efficace d'absorption à deux photons de différents fluorophores. La faisabilité d'une imagerie bimodale exploitant la fluorescence de ce marqueur et la réponse SHG du collagène fibrillaire du derme est démontrée. Le manuscrit s'achève par une étude faisant suite à des travaux de thèse antérieurs relatifs à la quantification de la fibrose hépatique par microscopie SHG/2PEF couplée. Nous appliquons la méthode de scoring SHG développée précédemment à une cohorte de patients infectés par le virus de l'hépatite C et comparons nos résultats aux tests METAVIR et Ishak.

Mots-clés : microscopie non linéaire, milieux turbides, paramètres de diffusion, peau ré-innervée, fibrose hépatique.

Developments in coherent and incoherent nonlinear microscopy and applications

Abstract : Nonlinear microscopy techniques are experiencing a considerable growth in life science, thanks to their ability to image biological tissues at high depth with different contrasts such as two-photon excitation fluorescence (2PEF) and second harmonic generation (SHG).

This manuscript focuses on metrology of scattering media and on biomedical applications of nonlinear microscopy. After an overview of the technique, we describe a novel method for measuring the scattering coefficient μ_s and anisotropy factor g of thick turbid media based on the comparison of fluorescence intensities epi-collected through the three modalities of our nonlinear microscope. Our method is then applied to biomimetic gels and to biological samples. The manuscript then tackles the problem of imaging deeply human skin explants re-innervated by sensory neurons from neonatal rats. The choice of the fluorescence probe is the subject of an in situ measurement of the two-photon action cross-sections of various fluorophores. The feasibility of bimodal nonlinear imaging of re-innervated skin explants based on the 2PEF signal of the molecular probe and on the SHG response of fibrillar collagen of the dermis is demonstrated. The manuscript ends with a study subsequent to the work of previous thesis regarding the quantification of liver fibrosis by SHG/2PEF microscopy. We apply the method of fibrillar collagen scoring by SHG previously developed to a new cohort of patients infected with hepatitis C virus and we analyze our results in terms of METAVIR and Ishak tests.

Keywords : nonlinear microscopy, turbid media, diffusion parameters, re-innervated skin, liver fibrosis.