



HAL
open science

Microscopie de second harmonique résolue en polarisations linéaire et circulaire pour caractériser l'organisation 3D du collagène

Margaux Schmeltz

► **To cite this version:**

Margaux Schmeltz. Microscopie de second harmonique résolue en polarisations linéaire et circulaire pour caractériser l'organisation 3D du collagène. Optique [physics.optics]. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLX074 . tel-02955517

HAL Id: tel-02955517

<https://theses.hal.science/tel-02955517>

Submitted on 2 Oct 2020

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.

Microscopie de second harmonique résolue en polarisations linéaire et circulaire pour caractériser l'organisation 3D du collagène

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'École polytechnique (LOB)

École doctorale n°573 Interfaces : approches interdisciplinaires,
fondements, applications et innovation
Spécialité de doctorat : Physique

Thèse présentée et soutenue à Palaiseau, le 17 octobre 2019, par

Margaux SCHMELTZ

Composition du Jury :

Mme Sophie BRASSELET DR CNRS, Univ. Aix-Marseille	Présidente du jury
M. Pierre-François BREVET Prof., Univ. Lyon	Rapporteur
Mme Sandrine LÉVÊQUE-FORT DR CNRS, Univ. Paris-Saclay	Rapporteuse
M. Mehdi ALOUINI Prof., Univ. Rennes 1	Examineur
M. Gaël LATOUR MdC, Univ. Paris-Saclay	Co-directeur de thèse
Mme Marie-Claire SCHANNE-KLEIN DR CNRS, IPParis	Directrice de thèse

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier tous les membres de mon jury d'avoir accepté d'en faire partie. Merci à Sandrine Lévêque-Fort et Pierre-François Brevet pour leurs rapports détaillés et enthousiastes sur mon manuscrit, et également à Sandrine de m'avoir suivie dès la fin de ma 2^e année de thèse. Merci à Sophie Brasselet et Mehdi Alouini d'avoir pris le temps d'examiner mon travail et pour leur présence à ma soutenance. Merci pour les discussions intéressantes échangées à cette occasion ou entre quelques coupes de champagne.

Avant de soutenir ma thèse, il fallait déjà pouvoir la réaliser dans de bonnes conditions. Pour cela, je remercie François Hache qui m'a accueillie au Laboratoire d'Optique et Biosciences en 2016, portant avec une grande humanité la triple casquette de directeur du laboratoire, directeur de l'École Doctorale Interfaces et fournisseur de café. Je lui suis également reconnaissante pour sa lecture attentive de mon dernier chapitre de thèse.

Un immense merci à mes directeur et directrice de thèse, Gaël et Marie-Claire. Gaël, tu as su m'appâter en thèse en brandissant violons et œuvres d'art, puis me guider dans l'univers fabuleux de la microscopie pour le patrimoine. Merci pour ta créativité et ta grande pédagogie que tu prends plaisir à partager, ainsi que pour l'équilibre subtil atteint dans ton encadrement, entre autonomie formatrice et rassurante disponibilité. Je suis honorée d'être ta première doctorante! Marie-Claire, avant toute chose, toutes mes excuses pour avoir quasi-systématiquement convergé vers l'inverse des résultats prévus! Merci de m'avoir fait confiance, d'avoir vu le positif dans ces résultats surprenants, et de m'avoir montré comment les exploiter, tantôt en maman poule et tantôt en commandante de navire gardant le cap à toute épreuve, toujours avec bienveillance et rigueur. Et quel honneur d'avoir travaillé avec une médaillée d'argent (ou de fromage) du CNRS!

Je remercie également toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de travailler lors des différents projets exposés dans ce manuscrit.

Pour les travaux sur les parchemins, merci à Laurianne Robinet, dont la curiosité et la bienveillance ont été sources de motivation, à Sylvie Thao-Heu, qui a osé pousser les mesures DSC dans leurs retranchements, à Catherine Merlin et Michèle Neveu, qui m'ont dévoilé les trésors des archives de la médiathèque de Chartres, à Delphine Gallot et Marie-Christine Thooris, qui ont précieusement conservé quelques uns de ces trésors à la bibliothèque de l'X.

Pour les échantillons de cornées, merci à Vincent Borderie et Djida Ghoubay de l'Hôpital des 15-20 et de l'Institut de la Vision ainsi qu'à Uwe Hansen de Münster University, qui m'a fourni des coupes de cornées humaines d'une qualité remarquable.

Merci à Carole Aimé pour les membranes de collagène, qui ont joué un rôle majeur dans le projet CD-SHG. Les nuits blanches au synchrotron n'auront pas suffi à comprendre tous leurs mystères, mais m'auront donné une bonne dose d'enthousiasme et de positivisme en ta compagnie.

Merci à François Légaré de m'avoir accueillie deux mois à l'INRS Varennes, et à Maxime Pinsard pour la formation accélérée en I-SHG, ainsi que pour les tours de Montréal à vélo et les soirées jive.

Toute ma gratitude va plus généralement à l'ensemble des permanent-e-s du LOB, qui font de ce laboratoire un nid douillet et chaleureux pour les doctorant-e-s. Je pense en particulier à celles et ceux de la team *Microscopies Avancées*, toujours prêt-e-s à donner de précieux conseils et qui ne rechignent jamais à sourire aux blagues douteuses tentées lors des *lab meetings* : Emmanuel, Pierre, Anatole, Karsten, Nicolas D., Nicolas O., Deborah, Willy, Chiara,... Mais également aux autres permanents : Xavier pour tous les coups de main et les débogages électroniques, Jean-Marc pour la fabrication de mon porte-échantillon à mini-cornées et le sauvetage des lames d'onde qui ne tournaient plus rond,

Laure et Christelle pour la gestion et l'aide administrative et les bonnes odeurs de camphre dans leur bureau, Pascale pour les discussions sur le dichroïsme circulaire, Antigoni et Laura pour leur superbe et inspirant investissement pour l'égalité F-H, Roxane et Hubert toujours partants pour des échanges de volants entre midi et 2, Isabelle et Caroline pour les réponses à mes questions de biologie, Stéphane, Adeline, Cédric pour leur bonne humeur et leur humour, et j'en oublie forcément... Un merci spécial à Ernan et Jean-Christophe, qui ont respectivement initié et repris en main l'association du turf Potag'X, ainsi qu'à Michel pour la forêt de bébé-arbres plantée sur le campus !

La thèse entraîne parfois une marée de doutes et de questionnements, que seul·e·s de braves camarades de galère peuvent aider à surmonter. Pour cela, mention spéciale à tou·te·s les occupant·e·s du bureau 84.20.15 : les grandes sages Mouna, Floriane, Marianne et Chao qui m'ont initiée aux joies du LOB, Minh Son et sa patience légendaire, les nouvelles recrues Clothilde (force et honneur pour la suite !), Anastasia (косуля) et Sung Bin, et enfin Yoann, acolyte fidèle depuis le début de la thèse qui a migré avec moi vers le fond du bureau et a contribué à la décoration... personnelle de notre environnement. Merci également à tou·te·s les autres doctorant·e·s et post-doctorant·e·s rencontré·e·s au LOB. À mes soutiens indéfectibles lors de mes débuts dans l'équipe SHG, Claire et Guillaume D. Aux anciennes : Hélène, Lamiae, Alice H. et Lipsa. Au mégalécolo, Guillaume P. À la fournée 2016 de thésard·e·s : José, ses peluches pleines de réconfort et nos discussions métaphysiques jusque tard dans la nuit, Romain, qui s'est échappé autant qu'il a pu de son bureau et qui maîtrise Latex comme personne (merci pour le template !), Nicolas P. (maître de la raclette), et Mayla (merci pour tous ces délices libanais !). Aux musicien·n·e·s : Júlia Ferrer Ortas Canals Pau Escalas Blanco Pujol Pérez, co-fondatrice des Gallinas Locas, qui aura supporté les cris de poule et autres désagréments hautboïstiques lors de nos envolées Schumanniennes, Arthur, co-joueur de pipo et prof de R, et Maëlle. À tou·te·s les autres, Thuy super maman, Xiujun (prof personnalisée de prononciation chinoise), l'américain Oscar, mais aussi Hugo, Paul et Kévin. Aux post-docs Dam-Bé, Gérald et ses références Little Big, Fanny, Lien, Pascal, Vincent (merci pour ta motivation à relire mon chapitre 5 !), sans oublier Sophie (meuhhh), petite pépite de générosité et d'humour, dont les gâteaux épithélium m'ont accompagnée jusqu'aux petits jours pendant la rédaction. Merci enfin aux camarades co-thésard·e·s, qui n'ont pas eu la chance d'être LOBsters mais qui sont géniaux quand même : Olga, Giuliano et Alexandra.

Si le plus clair de mon temps a été passé au laboratoire, les visages familiers qui ont partagé mon quotidien et qui m'ont offert de régulières bouffées d'oxygène ont également été indispensables à ce travail.

Bien évidemment, pour cette joyeuse vie commune durant toutes ces années, avec ses hauts et ses bas, avec ses raclettes, ses AG, son ménage ou pas, merci à mes colocs et à toutes celles et ceux qui ont un jour vécu entre les 4 murs de la belle Col'OPS : Mathias la carapace, Sébastien mon Fils, FX et Cyprien pour les fondateurs, puis Delphine ma Fille, Alexandre, Camille J., Constantin, Karolien, Louloupisson on dirait que c'était comme notre petit fien, Thomas et ses cannes à pêche, et Godelive de temps en temps ;-). Je remercie les nombreux légumes de mon jardin qui ont bien voulu pousser pour nourrir cette tribu dévorante, et bien sûr merci à mes poules, Marie-Jacqueline, Aude-Émeline et Marie-Fiona, qui m'ont fait prendre du recul sur le sens de la vie.

Merci à mes comparses de prépa rémoise, désormais éparpillé·e·s aux 4 coins du monde : Thomas et Margaux, Julien, Maxime, Philippe, Louis le québécois insoumis et Stéphane.

Merci aux camarades ENSTA : Faustinosaurus et PA, Marine L. puis B., Samar, Mansour et Jack pour la team AMS, Omar Alaoui Hassani Atlas du désert, Chouaïb, Danilo, Séguiédocus, et enfin pour les riches discussions et pour la révolution, Lucas B., Gaël G., Julien, Pauline B. et Grégoire.

Merci à tous les copains musiciens, progéniture délirante de l'Orchestre du Plateau de Saclay, avec en guest-star Fagousse d'ail, Papynou, Xémouche ou encore Franfois Fanfon.

Merci au Handball Club de Cachan, qui m'a empêchée de ramollir pendant toutes ces années à faire davantage fonctionner les méninges que les abdos : les copines Gwe, Alice, Jo, Pauline, Vicky, Claire, Malou, Marie & Marie, Chloé, Sonia, Mémé, Fela, Chouchou, Fati, Hajar et toute l'équipe, ainsi que Tonton, DPo, Younès, Lionel, Aurélien, et les coachs Guillaume, Ludo et Lucas.

Merci à la team de Troyens, Garin et son beignet qui a failli me dépasser, Camille P., Antoine T.,

Camille chenille, Coco, Chloé ma burniasse. Amour et loyauté éternelle à la secte Antisid, Élodie et Clémence, ainsi qu'aux pièces rapportées, Benjamin et Lionceau. Coquelicot, comme ces quelques lignes de remerciements semblent dérisoires pour exprimer ma reconnaissance, pour ton soutien inébranlable, ta conchitaide en toutes circonstances, ton amitié sans faille malgré les kilomètres de distance et tes crozifettes dans des marmites.

Enfin, je veux remercier toute ma famille, tontons, tatas, cousin·e·s, dont les encouragements m'ont fait chaud au cœur.

Merci à Xueyun, Minggang et Valentine, pour les joyeux moments passés ensemble, à Batz ou à Sceaux, et pour l'accueil généreux au plus dur de ma rédaction.

Merci à mes parents, qui m'ont tout donné depuis toujours : leur temps, leur disponibilité et leur écoute, leur amour, leur tendresse et leurs reproches justifiés quand je ne les appelle pas assez souvent. Merci de m'avoir menée jusqu'ici et de me donner l'envie d'avancer par votre confiance et votre fierté. Merci également d'avoir chassé typos et fautes d'orthographe de ce manuscrit.

Merci à Zozizon, ma seule et unique sœur, dont je me désole d'être une imparfaite copie. Tu es l'étoile la plus éblouissante de mon univers, qui éclaire mon chemin sans relâche, par ton talent, ta générosité et ton courage. Merci à Emeric d'avoir construit avec elle un cocon douillet pour une petite mogette.

Pour finir, un dessin maladroit pour remercier Christophe, en forme de hérisson piquant et doux à la fois. Petite fée cuisinier et radiateur, merci pour le soutien surhumain que tu m'as apporté alors que tu menais de front des carrières brillantes de mathématicien, pianiste, chef d'orchestre et cueilleur de prunes. Merci d'avoir embarqué sur le même bateau que moi, j'espère que la mer sera belle pour qu'on puisse y danser.



À mes mamies, à Papy Julot.

Table des matières

Introduction	1
I Contexte général	5
1 Le collagène	7
1.1 Le collagène I : structure hiérarchique et organisation dans les tissus	7
1.2 Dégradation du collagène	11
1.3 Techniques conventionnelles d'imagerie	13
2 Microscopie optique non-linéaire	18
2.1 Formalisme d'optique non-linéaire	18
2.2 Utilisation en microscopie	21
3 Réponses non-linéaires du collagène	25
3.1 Fluorescence Excitée à 2 Photons (2-PEF)	25
3.2 Génération de Second Harmonique (SHG)	25
Conclusion	28
II Microscopie de second harmonique résolue en polarisations linéaire et circulaire	31
1 Aspects théoriques	33
1.1 Formalisme	33
1.2 Calcul analytique de l'intensité SHG	34
1.3 Informations extraites par P-SHG	38
2 Perfectionnement du système expérimental	41
2.1 Dispositif général	41
2.2 Optimisation des résolutions et du champ de vue	43
2.3 Réglages des polarisations	46
3 Acquisition et traitement des données	48
3.1 Principe des mesures	48
3.2 Extraction des paramètres P-SHG en <i>post-processing</i>	49
Conclusion	55
III Applications de la microscopie SHG résolue en polarisation linéaire (P-SHG)	57
1 Évaluation quantitative de la dégradation du collagène dans les parchemins	59
1.1 Contexte bibliographique	59
1.2 Matériels et méthodes	61
1.3 Résultats	66
1.4 Discussions des résultats et perspectives de l'étude	74
2 Caractérisation de pathologies structurelles de la cornée	79
2.1 Les pathologies structurelles de la cornée	79
2.2 Caractérisations sur cornée humaine	81

2.3	Modèle murin de pathologie structurale cornéenne	85
2.4	Discussions sur l'outil et sur les modèles	96
	Conclusions et perspectives	98
IV Dichroïsme circulaire en microscopie SHG : état de l'art et implémentation expérimentale		101
1	Le phénomène de dichroïsme circulaire (CD)	103
1.1	La chiralité du collagène	103
1.2	Le CD en optique conventionnelle	104
1.3	Le CD en optique non-linéaire	105
2	Identification et correction des artefacts expérimentaux	107
2.1	Résumé en français	107
2.2	Article publié dans Optics Express (2019)	108
3	Procédures expérimentales et numériques adoptées	124
3.1	Paramètres d'acquisition optimaux	124
3.2	Mise en place du <i>time-lapse</i> et contrôle de la dérive	124
	Conclusion	126
V Dichroïsme circulaire en microscopie SHG : résultats théoriques et expérimentaux		129
1	Approche théorique dans l'approximation dipolaire électrique (ADE)	131
1.1	Calcul analytique du CD-SHG	131
1.2	Simulations numériques dans l'ADE	132
1.3	Implications expérimentales	133
2	Mesures expérimentales de CD-SHG	133
2.1	Validation sur cristal	134
2.2	Mesures sur tissus biologiques	135
2.3	Discussions	141
3	Nouvelle approche théorique pour le CD-SHG	142
3.1	Origine microscopique du CD-SHG dans le collagène	142
3.2	Calcul analytique du CD-SHG avec les contributions dipolaires magnétiques	144
3.3	Simulations numériques dans l'approche magnétique	148
4	Analyse expérimentale de la dépendance à l'angle hors-plan	156
4.1	Variabilité des tenseurs de susceptibilité non-linéaire dans un même tissu	156
4.2	Étude des contraintes locales	160
4.3	Expériences sur échantillons inclinés	161
5	Discussion et conclusion sur le CD-SHG	167
5.1	Récapitulation et analyse des étapes de travail	168
5.2	Discussion : variabilité spatiale de la réponse SHG	169
5.3	Discussion : origine du CD-SHG et pertinence en imagerie	171
Conclusion générale		173
A Détail de l'expression analytique de l'intensité SHG $I^{2\omega}(\theta)$ excitée en polarisation linéaire		175

B	Microscopie SHG interférométrique (I-SHG)	177
C	Influence de la structuration locale sur le signal de CD-SHG	179
	Bibliographie	181

Introduction

Explorer l'univers du *tout petit*, par l'observation de ce qui est invisible à l'oeil nu : voilà le défi que relève la microscopie depuis l'invention du premier microscope optique par Hans et Zacharias Janssen en 1595. La microscopie a révolutionné la biologie en rendant accessibles les petites échelles de la vie, les mondes cellulaires et intra-cellulaires. Des développements technologiques au cours des siècles ont transformé les premiers microscopes optiques composés d'une unique lentille, qui ont permis à Antoine Von Leeuwenhoek de découvrir les bactéries, vers une multitude de techniques d'imagerie performantes utilisant des contrastes variés (phase, fluorescence, etc).

L'apparition des premiers lasers en 1960 puis le développement de lasers impulsionnels dans les années 1980 a entraîné la microscopie optique dans une nouvelle ère : désormais, des interactions non-linéaires entre la lumière et la matière peuvent être volontairement créées dans les objets à étudier, et cette réponse non-linéaire est un nouveau mode de contraste exploitable pour former des images. Depuis une vingtaine d'année, la microscopie optique non-linéaire s'est imposée comme une méthode de choix pour l'imagerie tridimensionnelle dans les tissus épais avec des résolutions subcellulaires. Les domaines d'applications de cette technique sont nombreux et comptent par exemple les neurosciences, l'embryologie, la cancérologie ou les domaines biomédicaux en général.

Le Laboratoire d'Optique et Biosciences (LOB), qui m'a accueillie durant ces trois dernières années, possède une grande expertise sur la microscopie non-linéaire. Des travaux variés comme l'imagerie multi-couleurs (la technologie *Brainbow*), l'imagerie en nappe de lumière, l'imagerie par génération d'harmoniques ou encore l'imagerie en temps de vie de fluorescence y sont menés. Ma thèse a été effectuée au LOB sous la co-direction de Marie-Claire Schanne-Klein et de Gaël Latour, qui s'intéressent particulièrement à l'imagerie du collagène par génération de second harmonique.

Le collagène est une protéine omniprésente dans les tissus biologiques, puisque c'est elle qui définit l'architecture des tissus, et est de ce fait impliquée dans de nombreuses pathologies. Le développement de techniques pour la visualiser *in situ*, sans marquage, et pour obtenir des informations multi-échelles sur sa structure est aujourd'hui attendu pour plusieurs raisons. Le but est d'une part d'atteindre une compréhension complète des structures tissulaires 3D, en vue de l'ingénierie de tissus de substitution (comme des cornées artificielles), et d'autre part de diagnostiquer des pathologies ou de caractériser les effets d'approches thérapeutiques. Le type de collagène majoritaire chez les mammifères, le collagène fibrillaire, est caractérisé par une structuration hiérarchique particulière qui le rend particulièrement performant pour générer des signaux de second harmonique détectables à l'échelle du tissu.

Ainsi, la microscopie par génération de second harmonique permet une visualisation tridimensionnelle spécifique du collagène fibrillaire dans les tissus, avec une résolution latérale de quelques centaines de nanomètres et une résolution axiale de l'ordre du micromètre. Toutefois, le signal de SHG est un signal non-linéaire cohérent, ce qui le rend complexe à interpréter. Les études précédentes dans l'équipe ont permis de valider l'observation du collagène fibrillaire par microscopie SHG dans des tissus pour quantifier la gravité de certaines pathologies (fibroses), de caractériser finement le signal SHG sur des échantillons modèles, et enfin d'implémenter des modalités de mesures résolues en polarisation. Ces dernières reposent sur le contrôle et la modulation de l'état de polarisation du faisceau incident (faisceau exciteur). En particulier, deux modalités étaient mises en place à mon arrivée au LOB, utilisant des états de polarisations différents :

- La polarisation incidente est linéaire et les mesures sont prises pour différentes orientations de la polarisation : c'est la modalité de P-SHG (*Polarization-resolved SHG*).
- La polarisation incidente est circulaire et l'on compare les mesures prises avec des polarisations circulaires droite et gauche : c'est la modalité de CD-SHG (*Circular Dichroism SHG*).

La P-SHG complète les informations délivrées par la microscopie SHG car elle renseigne sur l'organisation dans les tissus des molécules et des fibrilles de collagène, qui ne sont pas visibles avec la résolution optique. Deux anciens doctorants au sein de l'équipe, Ivan Gusachenko et Claire Teulon, ont réalisé une étude complète sur la P-SHG, permettant d'une part de comprendre les effets linéaires ainsi que les paramètres géométriques propres à la microscopie cohérente qui influent sur le signal mesuré, et d'autre part d'estimer la précision des mesures et d'extraire des paramètres fiables et quantitatifs reliés à la structure du collagène dans les tissus. La P-SHG est donc une modalité bien maîtrisée au LOB.

Le CD-SHG, quant à lui, a fait l'objet d'études préliminaires au LOB par Claire Teulon. Au démarrage de ma thèse, les informations délivrées par cette modalité ne sont pas encore exactement comprises. Il est connu que le CD-SHG sonde des molécules chirales, comme le collagène, et un lien semble exister entre le signal mesuré et l'orientation hors plan des structures étudiées, promettant un avantage certain pour l'imagerie tridimensionnelle.

Se situant dans ce contexte, l'objectif de mon travail de doctorat est double.

Dans un premier temps, nous avons souhaité tirer parti de l'expertise du laboratoire en P-SHG, en appliquant cette modalité pour répondre à des problématiques précises issues de deux domaines différents : l'évaluation quantitative de l'état du collagène dans les parchemins historiques, et la caractérisation de la structure du collagène impliqué dans une pathologie structurale de la cornée, telle que le kératocône. Ces deux applications sont nées du besoin d'outils de diagnostic non-invasifs et quantitatifs sur les objets du patrimoine d'une part, et en ophtalmologie d'autre part. Elles feront l'objet du **chapitre III**.

Dans un second temps, enthousiasmé-e-s par les résultats préliminaires du CD-SHG sur le collagène, nous avons voulu optimiser la mise en place de cette modalité et l'appliquer pour sonder l'architecture de tissus complexes comme la cornée. En pratique, quelques éléments sont venus perturber notre enthousiasme en révélant des artéfacts expérimentaux (**chapitre IV**), et une première série d'expériences a démontré l'incompatibilité des résultats expérimentaux avec les hypothèses couramment utilisées dans la communauté pour l'interprétation des signaux. C'est donc principalement une approche théorique de cette modalité qui a été mise en œuvre (**chapitre V**).

Ce manuscrit concentre l'essentiel du travail réalisé sur ces trois dernières années, en faisant toutefois grâce au lecteur ou à la lectrice des (nombreuses) tentatives expérimentales infructueuses. Il s'organise de la façon suivante :

Chapitre I Un aperçu du contexte scientifique général dans lequel s'inscrit ce travail est donné au chapitre I. Nous présentons la structure du collagène et les techniques courantes pour l'observer. Puis nous introduisons brièvement quelques concepts d'optique non-linéaire, et l'application à la microscopie. Enfin, les réponses non-linéaires du collagène sont décrites, dans le cas de la fluorescence excitée à 2 photons (2-PEF) et de la génération de second harmonique (SHG).

Chapitre II Le deuxième chapitre précise tout d'abord le formalisme utilisé pour l'interprétation des signaux de SHG résolues en polarisations linéaire et circulaire. Le dispositif expérimental est ensuite décrit, ainsi que les protocoles d'acquisition et de traitement de données. Des aspects expérimentaux et théoriques supplémentaires sur le CD-SHG seront exposés dans les chapitres IV et V, c'est pourquoi l'accent de ce chapitre est volontairement mis sur la modalité de P-SHG.

Chapitre III Le chapitre III expose les résultats de nos études en P-SHG, et est composé de deux parties. La première concerne exclusivement l'application de la microscopie non-linéaire aux parchemins, en combinant différents contrastes : 2-PEF, SHG et P-SHG. La seconde partie présente nos travaux en P-SHG sur des cornées humaines kératoconiques et sur un modèle murin de cette pathologie cornéenne structurale.

Chapitre IV Ce chapitre, comme le suivant, est entièrement dédié à la modalité de CD-SHG. Le chapitre IV est centré sur les aspects expérimentaux du CD-SHG, et expose les principaux artéfacts de mesures que l'on peut rencontrer. Des protocoles expérimentaux adaptés pour s'affranchir des signaux artéfactuels sont alors proposés.

Chapitre V Ce dernier chapitre commence par dériver l'expression analytique du CD-SHG dans l'approche usuelle. Nous présentons ensuite la série d'expériences qui nous a conduit à remettre en cause cette théorie et nous proposons alors une nouvelle approche théorique. Celle-ci est finalement confrontée aux résultats expérimentaux et nous conduit à discuter l'apport du CD-SHG pour l'imagerie du collagène.

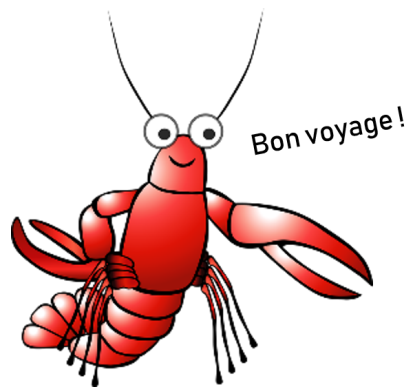


Figure 0 – Vœux du LOBster.

Chapitre I

Contexte général



Sommaire

1	Le collagène	7
1.1	Le collagène I : structure hiérarchique et organisation dans les tissus	7
1.2	Dégradation du collagène	11
1.3	Techniques conventionnelles d'imagerie	13
2	Microscopie optique non-linéaire	18
2.1	Formalisme d'optique non-linéaire	18
2.2	Utilisation en microscopie	21
3	Réponses non-linéaires du collagène	25
3.1	Fluorescence Excitée à 2 Photons (2-PEF)	25
3.2	Génération de Second Harmonique (SHG)	25
	Conclusion	28

Le collagène est une protéine structurale majeure, omniprésente dans le règne animal, et couvrant le quart de la masse protéique chez les mammifères. En tant que constituant principal de la matrice extracellulaire (ECM), il confère des propriétés biophysiques et biomécaniques aux tissus qu'il compose, allant des tissus souples et élastiques comme le tendon ou la peau à des tissus rigides et transparents comme la cornée. Ces propriétés dépendent de l'organisation tridimensionnelle du collagène, qui se structure différemment d'un tissu à l'autre. Il est également impliqué dans de nombreuses pathologies, comme le syndrome d'Ehlers-Danlos (anomalie du tissu conjonctif), le scorbut, toutes sortes de fibroses ou encore certains types de cancers.

La visualisation du collagène par des techniques d'imagerie 3D, si possible *in situ*, est un enjeu majeur à différents points de vue. Sur le plan biomédical, il s'agit de comprendre les altérations structurales des tissus pathologiques par rapport aux cas sains pour développer des techniques de diagnostic ou des approches thérapeutiques adéquates. Sur le plan de la bioingénierie, la caractérisation

de l'architecture propre à chaque tissu permet de guider l'ingénierie de substituts tissulaires pleinement fonctionnels, comme la réalisation de cornées artificielles.

Depuis une trentaine d'années, la microscopie non-linéaire se présente comme la technique par excellence pour imager des tissus en profondeur de manière non-invasive. Plus particulièrement, la microscopie par génération de second harmonique (SHG) permet d'imager spécifiquement le collagène fibrillaire sans ajout de marqueurs fluorescents, sans nécessité de prélever ou de couper le tissu. Au delà des enjeux biomédicaux, la microscopie SHG peut donc se révéler pertinente dans d'autres domaines qui requièrent des techniques de caractérisation non invasives : c'est le cas du domaine des sciences du patrimoine.

Ce chapitre se veut une mise en bouche très générale et assez courte des concepts nécessaires à l'élaboration du travail présenté. Pour un panorama plus complet, on pourra se référer aux thèses de mes illustres prédécesseurs, en particulier celles de Stéphane Bancelin et Claire Teulon [1, 2].

Dans une première partie, nous détaillerons la structure du collagène, son organisation dans différents tissus et sa dégradation, ainsi que les techniques conventionnelles pour le visualiser. Ensuite, nous introduirons la microscopie non-linéaire en deux temps, décrivant tout d'abord le formalisme de l'optique non-linéaire, puis son application en microscopie, avec un accent particulier sur deux phénomènes non-linéaires du second ordre : la fluorescence excitée à deux photons (2-PEF) et la génération de second harmonique (SHG). Ces deux effets seront finalement étudiés dans le cas précis du collagène : comment se construisent les signaux optiques dans cette protéine et qu'apportent-ils en termes d'imagerie ?

1 Le collagène

Ce qu'on appelle *collagène* est en fait un ensemble de 28 types de protéines, classés en 7 familles. Ces collagènes ont en commun une organisation hiérarchique de l'échelle moléculaire à l'échelle tissulaire. La structure moléculaire est semblable pour tous les collagènes, mais l'agencement supramoléculaire change d'une famille à l'autre. Plus précisément, tous les collagènes se caractérisent par une unité fondamentale en triple hélice (avec quelques variations dans la séquence d'acides aminés) : le tropocolagène. Cette molécule résulte de l'association de trois chaînes α d'acides aminés enroulées en hélice gauche pour former une triple hélice droite. Mais ces domaines hélicoïdaux ont des tailles variables et s'assemblent différemment selon le type de collagène : on trouve des collagènes fibrillaires où les triples hélices vont s'assembler en fibrilles, des collagènes formant des réseaux 2D similaires à des réseaux de neurones, des collagènes présentant des domaines en triples hélices interrompus, etc. (Fig. I.1). De ce fait, la fonction et la distribution dans les tissus des différents collagènes peuvent varier considérablement. Le tableau I.1 présente les 7 familles et les types de collagènes associés, ainsi que leur distribution dans les différents tissus.

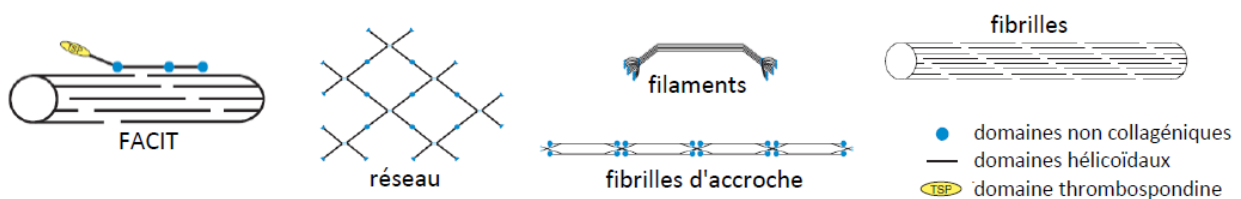


Figure I.1 – Illustration de l'assemblage supramoléculaire des collagènes de 5 familles différentes. Tiré de [2] et de [3].

Dans cette première section, nous précisons la structure du collagène sur lequel nous avons travaillé : le collagène de type I. Ce type de collagène représente à lui seul 90 % des collagènes chez les vertébrés. Il fait partie de la famille des collagènes fibrillaires, caractérisés, comme leur nom l'indique, par une organisation en fibrilles à l'échelle sub-tissulaire.

1.1 Le collagène I : structure hiérarchique et organisation dans les tissus

La structure du collagène de type I a pu être observée principalement par diffraction de rayons X à l'échelle moléculaire, et par microscopie électronique de l'échelle de la fibrille à celle du tissu. Nous en détaillons ici les principaux éléments. Davantage d'informations relatives à l'organisation du collagène peuvent être trouvées dans l'ouvrage de Fratzl et coll. [6].

1.1.1 De la chaîne α à la triple hélice

In vivo, le collagène est produit dans l'ECM¹ par une famille de cellules appelées fibroblastes.

Chaîne α Le brin élémentaire de collagène, la chaîne α , est synthétisé à l'intérieur de la cellule. C'est un enchaînement polypeptidique de 1055 acides aminés, dont un acide aminé sur trois est une glycine. Sa séquence est donc un enchaînement de triplets [Gly-X-Y], où X et Y correspondent souvent à une proline et une hydroxyproline. Il existe plusieurs types de chaîne α (qui diffèrent par la séquence des acides aminés), mais toutes adoptent une structure en hélice gauche (similaire à l'hélice de polyproline PPII), de diamètre 1.5 Å, de pas 9.4 Å et d'environ 300 nm de long [7]. Il est à noter que les liaisons peptidiques qui relient les acides aminés entre eux pointent toutes dans la même direction et confèrent ainsi une polarité à la molécule de collagène (de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale).

1. Matrice extra-cellulaire : réseau complexe de macromolécules entourant les cellules des tissus. Elle est principalement constituée de collagène, de glycosaminoglycanes et de protéoglycanes.

Famille de collagène	Type	Distribution dans les tissus
A. Fibrillaire	I	Tissu conjonctif non cartilagineux (tendon, ligament, cornée, derme, os, dentine, etc.)
	II	Cartilage, corps vitré de l'œil
	III	Associé au type I, notamment dans le derme, paroi des vaisseaux, organes internes
	V	Associé au type I, notamment dans la cornée
	XI	Cartilage, corps vitré, associé au type II
	XXIV	Cornée, os
	XXVII	Cartilage, peau, associé au type I
B. Réticulaire : formation d'un réseau 2D	IV	Membrane basale
	VIII	Endothélium, membrane de Descemet
	X	Cartilage hypertrophique
C. FACIT : triples hélices interrompues associées à du collagène fibrillaire	IX	Cartilage, corps vitré, associé au type II
	XII	Ligament, tendon, associé au type I
	XIV	Derme, tendon, poumon, foie, paroi des vaisseaux, associé au type I
	XVI	associé au type I
	XIX	Rhabdomyosarcome (tumeur rare)
	XX	Tendon, épithélium cornéen, peau embryonnaire
	XXI	Paroi des vaisseaux
	XXII	Cartilage, follicules pileux
D. Microfibrillaire : formation de filaments perlés	VI	Muscle, poumon, cartilage, derme, paroi des vaisseaux
	XXVI	
	XXVIII	Membrane basale
E. Associé aux fibrilles d'ancrage	VII	Jonction dermo-épidermique, muqueuse
F. Transmembranaire	XIII	Follicules pileux, épiderme, jonction neuromusculaire
	XVII	Jonction dermo-épidermique
	XXIII	Jonction des tissus
	XXV	Plaque amyloïde, associé au type I
G. Endostatinogène	XV	Muscle, pancréas, rein, œil, microvaisseaux
	XVIII	Poumon, foie, rate, associé au type IV

Tableau I.1 – Classification des collagènes en 7 familles et 28 types. La 3^e colonne indique des exemples de tissus contenant le type de collagène considéré. Adapté de [1, 4, 5].

Triple hélice Dans le cas du collagène de type I, deux chaînes $\alpha_1(I)$ et une chaîne $\alpha_2(I)$ s'assemblent (toujours à l'intérieur de la cellule) pour former une triple hélice hétérotrimère droite, le procollagène. Comme le montre la figure I.2, les glycines occupent les positions centrales dans la triple hélice, et

leurs chaînes latérales (ne contenant qu'un atome d'hydrogène) pointent vers l'intérieur. Des liaisons hydrogènes se forment entre les résidus de glycine d'une chaîne α et les groupements carboxyles d'une autre, assurant ainsi la stabilité de la triple hélice. Cette stabilité est en outre renforcée par des liaisons covalentes.

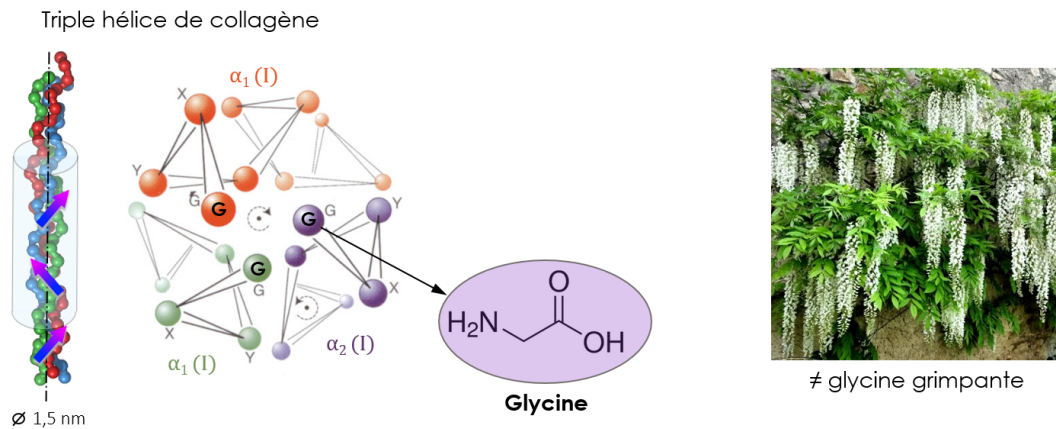


Figure I.2 – Assemblage de 3 chaînes α pour former une triple hélice (vue du dessus tirée de [7]). Les glycines, principaux acides aminés du collagène, sont situées au centre de la triple hélice. À ne pas confondre avec la glycine grimpante qui a envahi mon jardin depuis le début de la rédaction de ma thèse.

Le procollagène est excrété hors de la cellule dans des vésicules, et les propeptides situés à ses extrémités sont clivés par des enzymes spécifiques. La molécule résultante est le tropocollagène, unité fondamentale du collagène dans les tissus, constituée d'un domaine central en triple hélice droite et de deux courts domaines non hélicoïdaux à ses extrémités. Ces courts domaines sont les télépeptides, constitués en particulier de lysines. Au final, le tropocollagène a une longueur d'environ 300 nm et un diamètre de 1.5 nm. C'est ce tropocollagène que nous appellerons par la suite *triple hélice du collagène*.

1.1.2 Formation de fibrilles

In vivo, les triples hélices des collagènes fibrillaires s'alignent les unes avec les autres pour former des fibrilles. Ce mécanisme de fibrillogenèse n'est pas encore totalement compris, mais semble être un processus extra-cellulaire d'auto-assemblage de triples hélices gouverné par des forces électrostatiques classiques. En particulier, les triples hélices du collagène I sont stables en solution à pH acide (≤ 5), basses températures ($\leq 25^\circ\text{C}$) et faibles forces ioniques (≤ 600 mM), alors qu'elles forment spontanément des fibrilles dans les conditions physiologiques [8]. Ainsi, il est possible de reproduire une fibrillogenèse *in vitro*, à partir de solutions de collagène I purifié, maintenu sous forme de tropocollagène à pH acide : en augmentant le pH, des fibrilles sont re-synthétisées. Nous étudierons un échantillon de ce type au dernier chapitre (brève description du protocole d'obtention en section 2.2.1, chapitre V).

La structure en fibrille est stabilisée par divers processus biochimiques : interactions polaires, hydrophobes et non-covalentes ou encore des réticulations covalentes appelées des *cross-links*. Ces liaisons covalentes entre triples hélice au sein d'une fibrille se forment principalement entre les lysines des télépeptides des chaînes α (aux extrémités des triples hélices, cf. Fig. I.3 (a)). Ces pontages stabilisent les molécules et confèrent à la fibrille une grande rigidité.

Des modèles d'organisation axiale et transverse des triples hélices dans les fibrilles ont été proposés à partir d'observations par diffraction de rayons X et par microscopie électronique [9–11]. Ils sont représentés en figure I.3. Du fait de la formation de liaisons covalentes aux extrémités des triples hélices, ces dernières s'organisent en quinconce (la tête de l'une s'accrochant avec la queue de l'autre), avec un espace vide résiduel entre deux triples hélices consécutives, résultant en un décalage axial périodique de période $D = 67$ nm entre deux rangées de triples hélices (Fig. I.3 (b)). De ce fait, des régions plus ou moins denses sont présentes dans la fibrilles, dénommées respectivement les *overlaps* (zone de

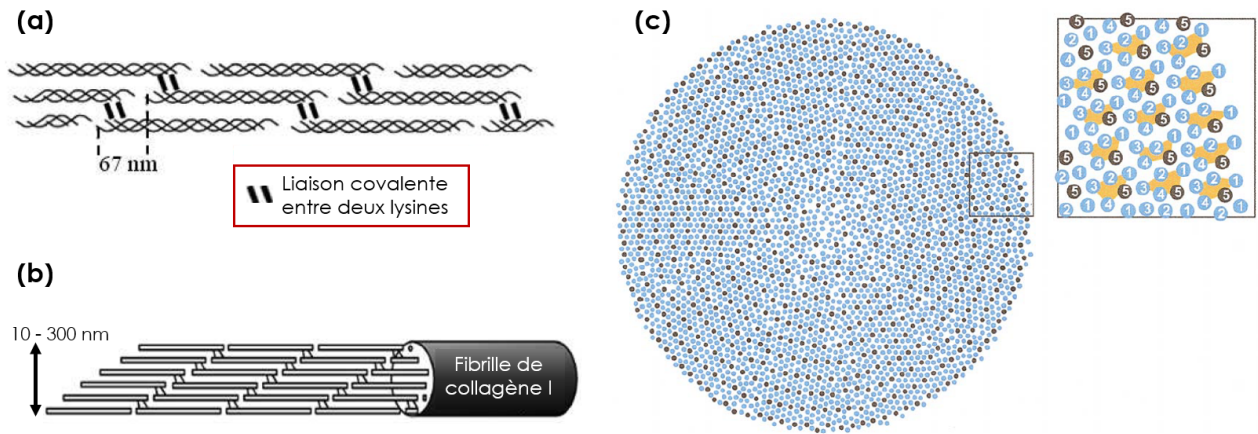


Figure I.3 – Organisation des triples hélices au sein d'une fibrille de collagène I. (a) Liaisons peptidiques entre lysine aux extrémités des triples hélice et (b) décalage axial périodique au sein d'une fibrille. Tiré de [1]. (c) Coupe transverse d'une fibrille et structuration hexagonale à courte échelle. Zoom : les zones en jaune (12 nm^2) sont occupées par 5 triples hélices. Tiré de [9].

recouvrement de 20 nm de long) et les *gaps* (zone vide de 47 nm de long). Ce décalage périodique est visible en microscopie électronique à transmission (TEM) par l'alternance caractéristique de bandes claires et sombres (voir l'imagerie du collagène par microscopie électronique en section 1.3.4). La connaissance de l'organisation transverse des triples hélices dans une fibrille est moins précise, et repose sur des modèles énergétiques. Hulmes et coll. rapportent une organisation en structure cristalline hexagonale à courte distance, dont l'ordre se perd à grande distance [9, 11], visible sur la figure I.3 (c). D'autres groupes proposent une organisation des triples hélice en spirale [12, 13], ou encore, dans le cas de la cornée, en nano-fibrilles de 4 nm de diamètre assemblées en fibrille [14].

1.1.3 Organisation dans différents tissus

Le collagène I est présent dans la plupart des tissus conjonctifs (cf. tableau I.1) : on le trouve par exemple dans le tendon, la peau, l'os ou encore dans la cornée. Selon les tissus, les fibrilles prennent des tailles différentes, leur diamètre pouvant varier de 10 à 300 nm. Ce dernier est notamment contrôlé par des protéoglycanes, des molécules distribuées avec le collagène dans l'ECM. D'autres types de collagène (notamment le type V) peuvent être co-distribués avec le type I dans les fibrilles (ce sont alors des fibrilles hétérotypiques, fréquemment rencontrées *in vivo*), et contribuent également à la régulation du diamètre des fibrilles.

De plus, d'un tissu à l'autre, l'organisation tridimensionnelle des fibrilles est différente, conférant des propriétés physiques et mécaniques particulières propres à chaque tissu. Dans ce travail, nous nous sommes principalement intéressé-e-s à l'organisation du collagène dans deux tissus : d'une part la cornée et d'autre part la peau (plus particulièrement sous la forme de parchemins historiques). La figure I.4 résume la structure hiérarchique du collagène I et détaille l'organisation tissulaire dans ces deux cas.

La cornée humaine

La cornée est un tissu transparent formant la partie antérieure du globe oculaire. Elle représente les 2/3 du pouvoir réfractif de l'œil et possède des propriétés biomécaniques spectaculaires lui permettant de maintenir une courbure constante en toutes circonstances, malgré les variations de pression intraoculaire quotidiennes [15]. La cornée est formée de 5 couches principales, du côté antérieur vers le côté postérieur : l'épithélium, la membrane de Bowman, le stroma, la membrane de Descemet puis l'endothélium (Fig. I.4 (a)). Le stroma représente 90 % de la cornée et est constitué principalement de collagène de type I et de protéoglycanes.

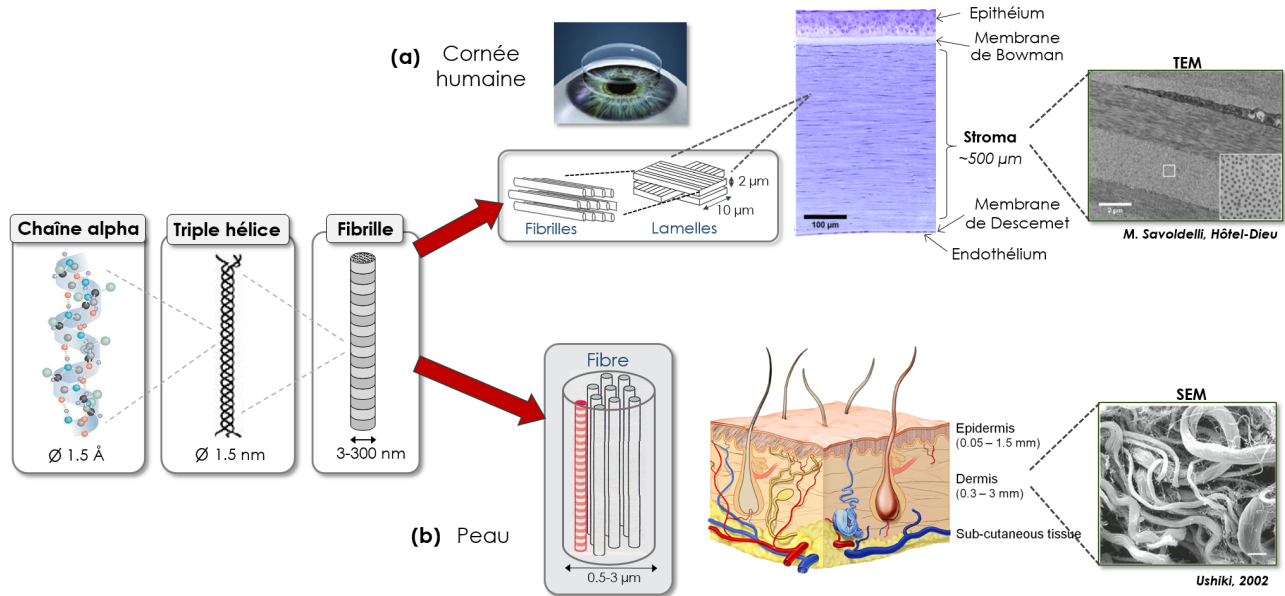


Figure I.4 – Structure hiérarchique du collagène I, de la chaîne α à la fibrille puis au tissu : détail de l'organisation tissulaire dans la cornée (haut) et dans la peau (bas). Les images sont issues de microscopie électronique.

Les fibrilles du collagène stromal ont un diamètre de valeur constante (environ 30 nm), et s'organisent en lamelles de 1 à 3 μm d'épaisseur et de largeur variable de 10 à 100 μm [14]. Quelques centaines de lamelles s'empilent en contreplaqué sur toute l'épaisseur du stroma, avec un changement brusque de direction des fibrilles, d'environ 90° , entre deux lamelles adjacentes. Au sein d'une lamelle, les fibrilles s'organisent suivant un réseau hexagonal. C'est cette grande régularité ainsi que le faible diamètre bien contrôlé de chaque fibrille qui assure la transparence de la cornée [16].

La partie centrale postérieure de la cornée est la plus ordonnée, avec des lamelles parallèles entre elles et parallèles à l'endothélium, alors que l'organisation du stroma antérieur est plus complexe, avec des lamelles entrelacées [14], ce que l'on retrouve également en périphérie de la cornée [17].

La peau La peau est composée de trois couches principales (Fig. I.4 (b)) : l'épiderme, le derme (riche en collagène, séparé de l'épiderme par la membrane basale) et l'hypoderme (tissu sous-cutané servant de réserve adipeuse). Dans le derme et l'hypoderme, les fibrilles de collagène (de 30 à 100 nm de diamètre) ne s'agencent pas en lamelles, mais en fibres. Ces dernières peuvent atteindre plusieurs millimètres de long pour un diamètre de quelques centaines de nanomètres à quelques microns, et forment un réseau 3D désordonné [18]. Deux couches se distinguent dans le derme : la couche papillaire liée à la membrane basale, présentant des fibres fines d'orientation aléatoire et contenant les follicules pileux, et la couche réticulaire contenant un réseau dense de grosses fibres (ou de faisceaux de fibres) de collagène et de fibres élastiques. Cette organisation du collagène donne à la peau sa souplesse (déformabilité du derme papillaire) tout en la rendant très résistante à la traction (résistance du derme réticulaire) [19]. Dans cette thèse, nous n'avons pas étudié le collagène de la peau à proprement parler, mais le collagène de *parchemins*, matériaux constitués du derme de peaux animales. Dans les parchemins, le collagène dermique a conservé sa structure en fibres, malgré les traitements utilisés lors de la fabrication de l'objet qui ont pu entraîner quelques transformations (cf. encadré I.1). On observe des structures différentes pour chacune des faces du parchemin, les faces fleur et chair, correspondant respectivement au derme papillaire et réticulaire.

1.2 Dégénération du collagène

Le collagène *ex vivo* peut être sujet à 3 principaux facteurs de dégradation : l'oxydation, l'hydrolyse et la dénaturation moléculaire [20]. Les deux premiers facteurs entraînent la rupture de liaisons covalentes.

Encadré I.1. - Du collagène dans les objets du patrimoine

Du fait des propriétés mécaniques exceptionnelles et de la grande stabilité que lui donne le collagène, la peau animale a été et est encore largement utilisée dans la fabrication d'objets, sous forme de cuir ou de parchemin (textiles, reliures, supports d'écriture, instruments de musique, maroquinerie). En particulier, les parchemins, support d'écriture principal au Moyen Âge, sont très présents dans les collections patrimoniales.



Leur fabrication suit un protocole précis en plusieurs étapes : [20]

1. Prélèvement de la peau sur l'animal : il s'agit le plus souvent de peaux de ruminants (veau, mouton, chèvre, etc.).
2. Séchage de la peau à l'air ou avec du sel, de façon à réduire de 40 % la teneur en eau de la peau et à empêcher la putréfaction. Cette étape de déshydratation du collagène peut entraîner une contraction axiale des triples hélices au sein des fibrilles (on constate notamment une diminution de la période D) [21].
3. Lavage de la peau à l'eau froide pour éliminer le sang et les impuretés. Cela peut également évacuer des protéoglycanes.
4. Traitement à la chaux : les matières telles que les poils, les lipides et les couches entre le derme et l'épiderme sont éliminées. Des études par calorimétrie différentielle à balayage ont montré que le collagène est à l'issue de cette étape moins stable que dans une peau intacte [22].
5. Découpage manuel (au couteau!) de l'épiderme et de l'hypoderme, et des résidus de poils, de graisse, de chaux.
6. Séchage sous tension : le réseau de fibres du collagène est rendu davantage parallèle à la surface de la peau.



Ce procédé de fabrication permet d'obtenir un support d'écriture fonctionnel mais impacte la structure du collagène, avec des effets sur la stabilité du matériau et sa conservation à long terme.

lentes entre acides aminés des chaînes α : le tropocollagène est cassé en plusieurs petits polypeptides, mais la structure en triple hélice est préservée.

La dénaturation du collagène entraîne quant à elle la perte de la structure en triple hélice (Fig. I.5). En présence d'eau et de chaleur, les liaisons hydrogènes à l'origine de la stabilité de la triple hélice sont rompues. Les chaînes α se séparent alors et adoptent une conformation en pelote statistique, centrosymétrique [23]. Ce collagène dénaturé est parfois appelé *gélatine* : c'est en effet par dénaturation du collagène que l'on obtient la gélatine commerciale, mais cette dernière, contrairement au collagène dénaturé, contient également les résidus des tissus dont elle est extraite (lipides, glucides, autre protéines, etc.). Le processus de dénaturation est irréversible : en refroidissant une solution de collagène dénaturée, des structurations en triple hélice peuvent réapparaître localement (d'où la gélification) mais les chaînes α ne parviennent pas à se réassocier sur toute leur longueur. Des dégradations préalables, telles que des hydrolyses, des oxydations ou l'exposition à la chaleur sont autant de facteurs

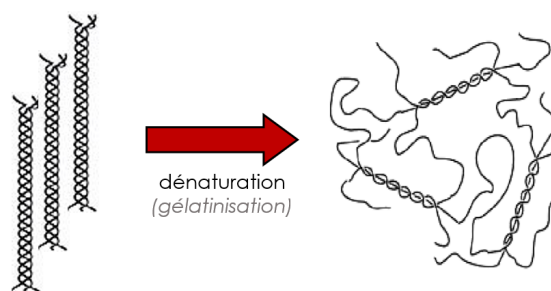


Figure I.5 – Perte de la structure en triple hélice lors de la dénaturation du collagène.

favorisant la dénaturation du collagène. En effet, dans le collagène intact, la structure hiérarchique en triples hélices, fibrilles puis édifices supra-fibrillaires agit comme une protection des liaisons hydrogènes (internes à la triple hélice), qui sont alors moins affectées par la présence d'eau et de chaleur par rapport au cas où les molécules ont été cassées en plusieurs petits polypeptides. Ainsi, les parchemins sont des objets d'autant plus fragiles qu'ils sont composés d'un collagène "altéré" lors des processus de fabrication, de conservation sur de longues durées (exposition à la lumière, à la chaleur, aux polluants) ou de restauration.

Point de vocabulaire : ce que les conservateurs, restaurateurs et scientifiques du patrimoine appellent un parchemin "gélatinisé" n'est pas forcément un parchemin dont le collagène a été dénaturé en gélatine, au sens employé en chimie. Il s'agit d'un parchemin d'aspect gélatinisé : translucide et plus rigide, comme la gélatine (Fig. I.6). Nous verrons au chapitre III que le collagène constituant un tel parchemin peut effectivement avoir subi une dénaturation (gélatinisation), tout comme il peut avoir subi un autre type de dégradation qui n'est pas une gélatinisation au sens chimique du terme.



Figure I.6 – Différents états d'altérations de parchemins. Le parchemin tout à droite est un parchemin d'aspect gélatinisé.

1.3 Techniques conventionnelles d'imagerie

Les techniques utilisées pour imager le collagène dépendent de l'échelle que l'on souhaite étudier. L'imagerie choisie est souvent un compromis entre la résolution et la profondeur de pénétration dans les tissus : aux antipodes se placent l'échographie utilisant des ultrasons, peu résolue mais pouvant visualiser le tissu entier, et la microscopie électronique, méthode de référence pour sonder la structure nanométrique des tissus, mais ne pouvant fournir qu'un petit champ de vue sur une coupe fine de tissu (Fig. I.7).

Le degré d'invasivité est également à prendre en compte : souhaite-t-on améliorer la compréhension de la structure d'un tissu à différentes échelles, ou le but est-il d'imager l'échantillon de manière non invasive, sans prélèvement (sans coupe), et sans marquage, pour des diagnostics par exemple ?

Nous présentons dans cette partie des techniques d'imagerie, applicables à l'imagerie du collagène, qui servent actuellement de référence en biologie et dans le domaine biomédical. Nous nous limiterons principalement à quelques techniques optiques, en mentionnant en plus la microscopie électronique qui a permis de comprendre l'organisation des fibrilles du collagène I.

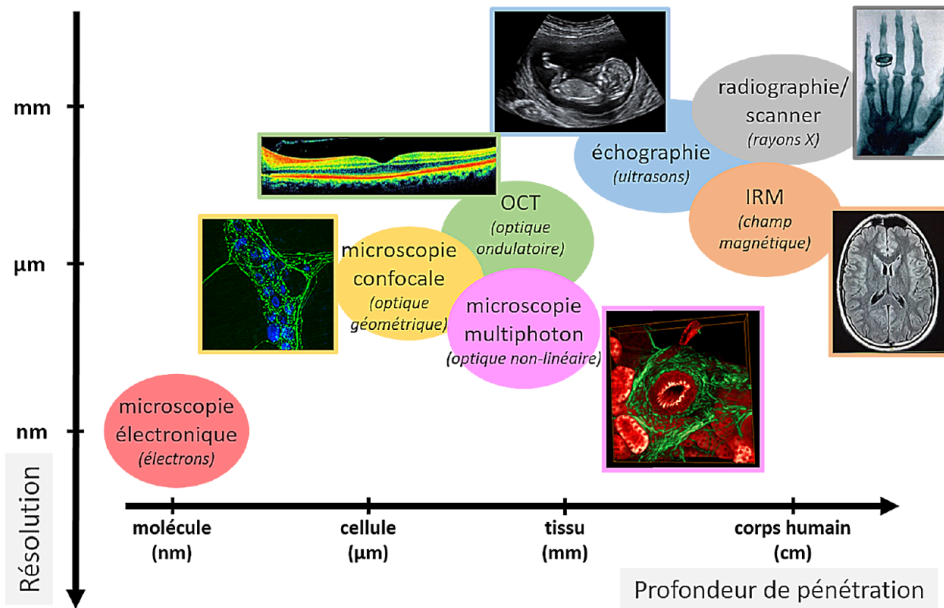


Figure I.7 – Comparaison de techniques d'imagerie courantes dans le domaine biomédical. Elles sont adaptées à des situations particulières dépendant de l'échelle d'observation souhaitée et sont de ce fait complémentaires. Le saint Graal des techniques alliant super-résolution et imagerie de tissu sur toute sa profondeur n'a pas encore été trouvé. Notons que les techniques du type champ proche (AFM) ou nanoscopie (STED, PALM) ne sont pas mentionnées sur ce graphe. Source : Gaël Latour [24].

1.3.1 Microscopie optique en lumière blanche

La technique qui demeure la référence pour évaluer l'état pathologique d'un tissu en milieu hospitalier à partir de biopsies est l'histologie. Elle vise à observer par microscopie optique classique en lumière blanche des lames histologiques de tissus fixés, le plus souvent dans du paraformaldéhyde (PFA), puis marqués à l'aide de colorants chimiques (ou bien à l'aide d'anticorps dans le cas de l'immunohistochimie). Pour les tissus conjonctifs, les principaux colorants sont l'Hématoxyline Eosine Safran (HES), marquant l'ECM en jaune, le trichrome de Masson [25] marquant le collagène en bleu/vert, ou encore le rouge de Sirius colorant en rouge les fibrilles de collagène [26] (Fig. I.8). Cette technique s'applique exclusivement à des coupes minces de tissu fixé.

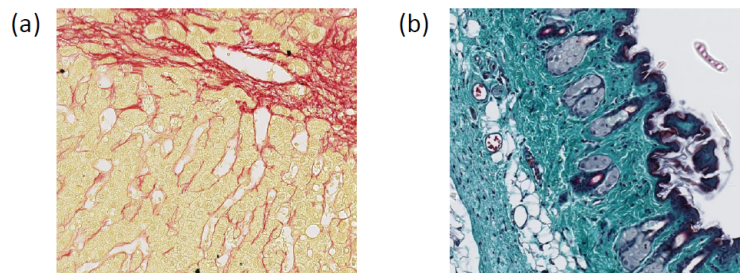


Figure I.8 – Lames histologiques colorées de tissus contenant du collagène. (a) Rouge de Sirius marquant du tissu de foie humain et (b) Trichrome de Masson marquant une peau de souris. Tiré de [2].

La microscopie optique en lumière blanche peut également être utile dans certains cas pour observer un prélèvement, sans avoir recours à une lame histologique : par exemple, on peut observer l'aspect de fibres de collagène issues de parchemins, à des stades de dégradation plus ou moins avancés (Fig. I.9).

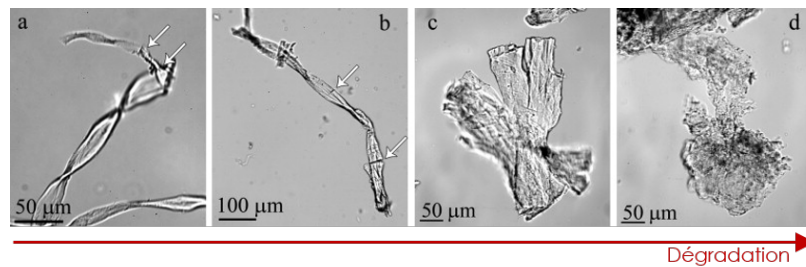


Figure I.9 – Observation par microscopie optique classique en lumière blanche de différents stades de dégradation des fibres d'un parchemin : du moins dégradé à gauche au plus dégradé à droite. Tiré de [27].

Dans tous les cas, la microscopie optique en lumière blanche confine l'observation des échantillons à un plan 2D, ne permettant qu'une connaissance partielle de la structure et de l'organisation du tissu. Différentes stratégies en microscopie optique ont donc été développées afin d'accéder à la troisième dimension.

1.3.2 Microscopie confocale

La microscopie confocale est la technique la plus répandue aujourd'hui pour la caractérisation tridimensionnelle des systèmes biologiques ou des tissus. Elle est basée sur une sélection spatiale de la lumière, rendue possible par l'utilisation d'un diaphragme devant le détecteur, bloquant le signal provenant d'autres plans que le plan focal (voir schéma de principe en figure I.10). On obtient alors un bon sectionnement optique, avec une résolution axiale de l'ordre de 1 μm . Les résolutions latérales sont de l'ordre d'une demi-longueur d'onde (environ 250 nm).

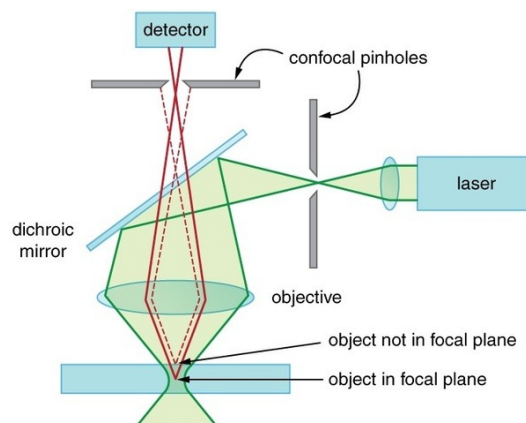


Figure I.10 – Schéma de principe d'un microscope confocal. Source : N. S. Claxton, T. J. Fellers, M. W. Davidson (Rice University).

C'est principalement la fluorescence des échantillons qui est observée en microscopie confocale. Dans le cas du collagène, on peut alors visualiser sa fluorescence endogène (voir section 3.1) ou bien utiliser des marqueurs fluorescents exogènes (fluorophores) pour le repérer, comme des colorants s'attachant à ses groupes hydroxyl et amine [28] ou des protéines fluorescentes [29]. Un autre mode de contraste est accessible avec la microscopie confocale de réflectance. Dans ce cas, aucun marquage n'est nécessaire et le signal détecté est le signal réfléchi par les interfaces présentes dans l'échantillon. L'inconvénient est alors que le signal obtenu n'est pas spécifique du collagène et peut provenir de n'importe quelle interface.

Toutefois, la profondeur de pénétration obtenue avec cette technique est relativement limitée, en particulier dans des milieux diffusants et absorbants. Cela limite son usage pour les tissus biologiques ou les échantillons épais. Deux autres techniques se sont développées depuis les années 1990, tentant de dépasser cette limitation : la tomographie par cohérence optique (OCT [30]), présentée ci-dessous, et la microscopie optique non linéaire, que nous allons utiliser au cours de ce travail, présentée en détail en section 2.

1.3.3 Tomographie par cohérence optique (OCT)

L'OCT présente le même mode de contraste que la microscopie confocale de réflectance, à savoir la réflexion du signal par les interfaces dans les tissus ou par certaines particules (*i.e.* par des variations de l'indice de réfraction). Dans le cas de l'OCT, c'est l'interférence entre le signal réfléchi et un faisceau de référence qui est mesuré. Le dispositif utilisé pour cela est un interféromètre de Michelson : le miroir à l'extrémité du bras de référence est fixe ou mobile selon le type d'OCT, et l'échantillon à étudier remplace le miroir dans le second bras (la lumière incidente sera réfléchi par les interfaces, localisées plus ou moins en profondeur de l'échantillon). Un interférogramme apparaît lorsque les deux bras ont la même longueur $D \pm L_c$ où L_c est la longueur de cohérence temporelle de la source. Des sources à faible cohérence temporelle sont alors privilégiées pour augmenter le sectionnement optique [31].

Deux grands types d'OCT existent, l'un utilisant le domaine fréquentiel (OCT *spectral-domain* ou SD-OCT) et l'autre le domaine temporel (notamment la configuration *plein champ* du FF-OCT).

Dans le premier cas, le miroir de référence est fixe, et la structure en profondeur de l'échantillon est obtenue par transformée de Fourier de l'interférogramme. La grande stabilité mécanique de cette technique ainsi que les nombreuses optimisations industrielles qu'elle a connues font du SD-OCT une technique de référence en imagerie biomédicale *in vivo*, en particulier en ophtalmologie. Elle permet en effet une visualisation rapide de l'œil (rétine, cornée) en coupes transverses (Fig. I.11). La résolution axiale de ce dispositif peut atteindre le micromètre, mais la résolution latérale est un peu moins bonne (entre 5 et 15 μm).

L'OCT plein champ mesure un interférogramme pour chaque déplacement du miroir de référence [32]. Cela rend la technique moins rapide que le SD-OCT, mais le temps d'acquisition d'une image entière est optimisée par une détection "plein champ", c'est-à-dire avec une caméra 2D. Avec cette technique, les résolutions spatiales sont optimisées et homogènes dans les 3 directions, de l'ordre du micromètre.

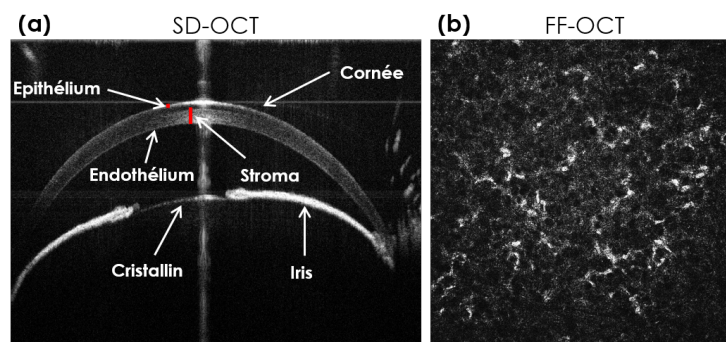


Figure I.11 – Imagerie OCT. (a) Image transverse d'une cornée de souris entière *in vivo* par SD-OCT. Source : Djida Ghoubay, Institut de la Vision. (b) Image **en-face** d'une cornée humaine entière *ex vivo* par FF-OCT, montrant principalement les kératocytes. Source : Romain Bocheux, LOB.

Quelque soit la configuration de l'OCT, une information structurale est obtenue de manière rapide sur toute l'épaisseur de l'échantillon. Cette technique offre toutefois une résolution limitée de l'ordre du micromètre et n'est pas spécifique d'un constituant du tissu en particulier. Par exemple, dans le cas de la cornée, aucune information ne peut être obtenue sur l'orientation des lamelles et la distribution de fibrilles.

1.3.4 Microscopie électronique

Le principe de la microscopie électronique est similaire à celui de la microscopie optique, à ceci près que la source lumineuse est remplacée par un faisceau d'électrons. Un faisceau d'électrons, tout comme un faisceau de photons, peut être focalisé par des "lentilles" (qui sont ici des champs magnétiques à symétrie de révolution), et utilisé pour imager un échantillon. La résolution est ici grandement améliorée : en microscopie électronique à transmission, la longueur d'onde est de l'ordre du picomètre dans les conditions d'utilisation standard (électrons accélérés à environ 100 keV). La résolution n'est donc pas limitée par la diffraction mais uniquement par les aberrations, et est en pratique de l'ordre de l'angström.

De manière analogue à la microscopie optique, on trouve de la microscopie électronique à transmission (TEM), à balayage (SEM), en champ clair, en champ sombre, etc. Le principe des deux premières techniques est illustré sur la figure I.12.

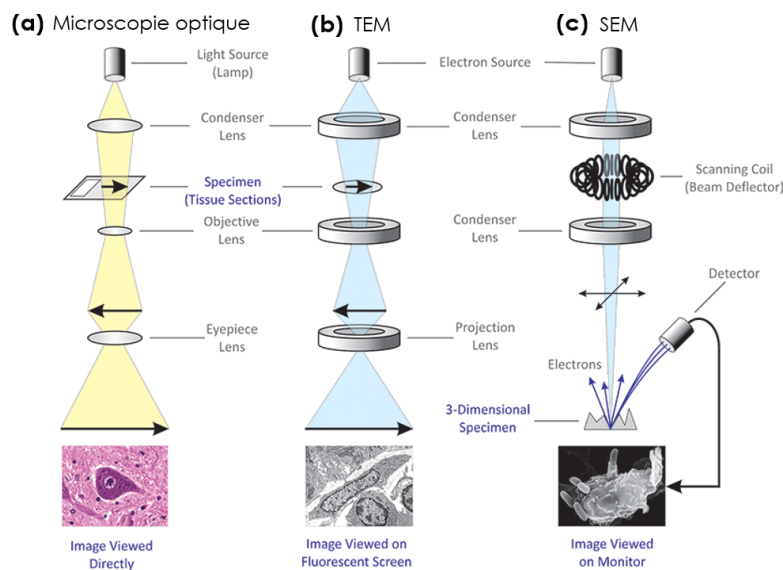


Figure I.12 – Schémas de principe des techniques de microscopie électronique (b) à transmission et (c) à balayage, mis en parallèle avec (a) le principe de la microscopie optique classique. Source : *microbiologyinfo.com*.

Les premières utilisations de la microscopie électronique sur le collagène ont débuté dans les années 40 [33]. Cette technique a permis de résoudre la structure moléculaire et fibrillaire du collagène. Par exemple, on peut observer sur la figure I.13 des fibrilles issues de collagène purifié re-fibrillé, des coupes transverses de tendon ou encore, à une échelle plus large, l'agencement des fibrilles en lamelles dans la cornée humaine.

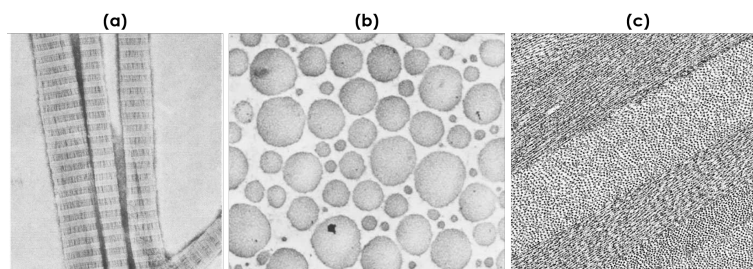


Figure I.13 – Images obtenues en microscopie électronique dans le collagène. (a) Fibrilles issues de collagène purifié puis re-fibrillé ($\approx \times 70\,000$) [34], (b) fibrilles de tendon de rat observées en coupe transverse ($\approx \times 45\,000$) [35] et (c) structure lamellaire d'une cornée humaine observée en coupe transverse ($\approx \times 2\,700$, source : Uwe Hansen, Université de Münster, Allemagne).

La microscopie électronique impose toutefois un protocole précis de préparation des échantillons, invasif et empêchant toute étude dynamique : il faut que l'échantillon soit ultra-fin pour être quasi transparent aux électrons, et préparé de façon à ne pas être dégradé par l'impact du faisceau électronique ou par le vide de la chambre d'observation. Ce dernier point nécessite de stabiliser la structure macromoléculaire des échantillons, soit par congélation (cryo-TEM) soit par fixation chimique et déshydratation. Ils sont ensuite intégrés dans des résines avant d'être sectionnés par un ultra-microtome en coupes de quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur, puis éventuellement marqués et placés sur une grille métallique recouverte d'un film de carbone.

2 Microscopie optique non-linéaire

La microscopie optique non-linéaire (appelée également microscopie multiphoton, et parfois abrégée dans ce texte en microscopie NL) est un ensemble de techniques d'imagerie optiques dont les sources de contraste reposent sur des processus d'optique non-linéaire. Par rapport aux techniques d'imagerie citées précédemment, la résolution tridimensionnelle de la microscopie non-linéaire est équivalente à celle de la microscopie confocale. La microscopie non-linéaire apporte en outre une meilleure profondeur de pénétration dans les tissus et un nombre de modes de contrastes spécifiques plus importants. Enfin cette méthode demeure non invasive et permet ainsi de travailler *in situ* voire *in vivo* ou encore de faire des études dynamiques.

2.1 Formalisme d'optique non-linéaire

Avant de nous intéresser à l'apport des processus d'optique non-linéaire pour la microscopie, nous rappelons ici quelques éléments de formalisme, et donnons les origines physiques de l'absorption à deux photons et de la génération de second harmonique, les deux interactions non-linéaires que nous utiliserons par la suite. Pour une immersion plus intense dans le monde fabuleux de l'optique non-linéaire, le lecteur peut consulter les ouvrages généraux de Y. R. Shen [36] ou R. W. Boyd [37], ou encore l'ouvrage en français de F. Hache [38].

2.1.1 Généralités

Électromagnétisme linéaire Une onde électromagnétique est caractérisée dans le vide par un champ électrique \vec{E} et un champ magnétique \vec{H} . Son évolution est gouvernée par les équations de Maxwell [39]. Si cette onde se propage dans un milieu non magnétique, le champ magnétique est lié à l'induction magnétique \vec{B} par une relation de proportionnalité : $\vec{B} = \mu_0 \vec{H}$. Si le milieu de propagation est un milieu diélectrique, il faut alors introduire un nouveau vecteur \vec{D} , le déplacement électrique, relié au champ \vec{E} par la relation constitutive : $\vec{D} = \epsilon_0 \vec{E} + \vec{P}$. \vec{P} est la **polarisation** du milieu diélectrique, c'est-à-dire la densité volumique de dipôles électriques créée par l'onde électromagnétique.

Explicitons brièvement cette polarisation. Le milieu diélectrique est un ensemble de porteurs de charge qui peuvent chacun se déplacer sous l'effet du champ \vec{E} . Chaque déplacement crée un moment dipolaire \vec{p} , proportionnel au champ \vec{E} (pour l'instant) :

$$\vec{p} = \underline{\underline{\alpha}} \vec{E}, \quad (\text{I.1})$$

où $\underline{\underline{\alpha}}$ est la polarisabilité du porteur du charge (tenseur d'ordre 2). Si le milieu contient N porteurs de charge par unité de volume, la polarisation \vec{P} est alors simplement définie par :

$$\vec{P} = N \vec{p} = N \underline{\underline{\alpha}} \vec{E}. \quad (\text{I.2})$$

La relation entre \vec{P} et \vec{E} n'est pas donnée par les équations de Maxwell mais peut se décrire de manière phénoménologique en introduisant des paramètres appelés les *susceptibilités*, qui contiennent toute l'information sur l'interaction lumière-matière :

$$\vec{P} = \epsilon_0 \underline{\underline{\chi}}^{(1)} \vec{E}. \quad (\text{I.3})$$

Dans ce cas, nous n'avons fait intervenir que la susceptibilité linéaire : cette approximation définit le cadre de l'optique linéaire.

Susceptibilités non-linéaires En fait, la polarisation \vec{P} peut se développer en puissances de \vec{E} :

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

où $\chi^{(n)}$ pour $n > 1$ est la susceptibilité non-linéaire d'ordre n (décrite par un tenseur d'ordre $n+1$).

Ce développement se justifie lorsque le champ \vec{E} est suffisamment fort pour que les termes non-linéaires ne soient pas complètement négligeables. En effet, dans ce cas, les porteurs de charge du milieu diélectrique ne répondent plus de manière proportionnelle au fort champ exciteur \vec{E} (modèle d'oscillateur anharmonique). Le moment dipolaire induit en chaque porteur de charge se développe lui aussi en puissances de \vec{E} :

$$\vec{p} = \underline{\underline{\alpha}} \vec{E} + \underline{\underline{\underline{\beta}}} \vec{E}^2 + \underline{\underline{\underline{\underline{\gamma}}}} \vec{E}^3 + \dots, \quad (\text{I.5})$$

avec $\underline{\underline{\alpha}}$ la polarisabilité, et $\underline{\underline{\underline{\beta}}}$, $\underline{\underline{\underline{\underline{\gamma}}}}$, etc. les hyperpolarisabilités d'ordre 2, 3, etc.

Ce développement en puissances du champ définit donc le cadre de l'optique non-linéaire.

Régime de validité de l'optique non-linéaire Nous avons dit précédemment que le développement de \vec{P} se justifie lorsque le champ appliqué \vec{E} est assez fort. Plus précisément, il faut que le champ \vec{E} ne soit pas trop petit par rapport au champ électrique intra-atomique \vec{E}_{at} que ressent un électron dans un atome (pour l'atome d'hydrogène, $\vec{E}_{at} = 5 \times 10^{11} \text{V/m}$). Toutefois, un tel développement en puissance n'a de sens que si le terme d'ordre $n+1$ est très petit devant le terme d'ordre n . Si le champ devient trop fort, cela n'est plus le cas, et on sort du cadre de l'optique non-linéaire.

2.1.2 Génération de second harmonique (SHG)

La génération de second harmonique (*Second Harmonic Generation*, d'où son abréviation en SHG) est l'archétype des effets non-linéaires du second ordre, et sa première démonstration expérimentale par Franken en 1961 sur un cristal de quartz marque la naissance de l'optique non-linéaire sur le plan expérimental [40].

L'équation I.4 implique que, sous une excitation à ω , des harmoniques 2ω , 3ω , etc. peuvent apparaître dans la réponse des dipôles. En particulier, on voit apparaître une polarisation à la fréquence double 2ω :

$$\vec{P}^{(2)}(2\omega) = \epsilon_0 \underline{\underline{\underline{\chi}}}^{(2)}(2\omega) \vec{E}(\omega) \vec{E}(\omega). \quad (\text{I.6})$$

Cette polarisation rayonne une nouvelle onde oscillant à la fréquence 2ω : c'est la génération de second harmonique, phénomène de diffusion inélastique et cohérent. On voit de plus que l'intensité émise à cette fréquence double est proportionnelle au carré de l'intensité incidente : $I(2\omega) \propto I(\omega)^2$.

Précisons que la notation tensorielle utilisée dans l'équation I.6 sous-entend la relation suivante entre les différentes composantes de \vec{P} et de \vec{E} :

$$P_i^{(2)}(2\omega) = \epsilon_0 \sum_{j,k} \chi_{ijk}^{(2)}(2\omega) E_j(\omega) E_k(\omega). \quad (\text{I.7})$$

Cohérence La génération de second harmonique est un processus cohérent, dont l'efficacité va dépendre de l'accord de phase [37] : le signal SHG ne peut être généré que sur une distance maximale appelée la longueur de cohérence et définie par : $L_c = \frac{\pi}{\|\vec{k}(2\omega) - 2\vec{k}(\omega)\|}$ avec $\vec{k}(2\omega)$ le vecteur d'onde de la seconde harmonique dans la direction d'observation et $\vec{k}(\omega)$ le vecteur d'onde du champ incident, orienté dans le sens de propagation du laser. L_c dépend donc de la direction d'observation : en microscopie, l'observation est faite soit vers l'avant (*forward*, suivant $\vec{k}(\omega)$), soit vers l'arrière (*backward*,

suivant $-\vec{k}(\omega)$). Pour une excitation à 860 nm dans de l'eau ($n(2\omega)=1.3378$ et $n(\omega)=1.3286$ [41]), en prenant en compte la phase de Gouy d'un faisceau focalisé, on peut montrer [42] :

$$\begin{aligned} L_c^{forward} &\approx \frac{3\lambda}{2} = 1.3 \mu m \\ L_c^{backward} &\approx \frac{\lambda}{8} = 100 \text{ nm} \end{aligned} \quad (\text{I.8})$$

Cela rend la SHG généralement plus efficace pour une détection *forward*.

SHG dans les milieux centrosymétriques ? Dans un milieu centrosymétrique, si l'on change le signe du champ incident $\vec{E} \rightarrow -\vec{E}$, la réponse \vec{P} devrait aussi changer de signe $\vec{P} \rightarrow -\vec{P}$. Ainsi, on peut écrire :

$$\begin{aligned} P^{(2)} &= \epsilon_0 \chi^{(2)} E^2 \\ \text{et } -P^{(2)} &= \epsilon_0 \chi^{(2)} (-E)^2 \end{aligned} \quad (\text{I.9})$$

Cela aboutit à $\chi^{(2)} = -\chi^{(2)} = 0$: il ne peut pas y avoir de SHG dans des matériaux centrosymétriques.

Symétries du tenseur $\chi^{(2)}$ Le tenseur $\chi^{(2)}$ est un tenseur d'ordre 3, donc avec 27 composantes. Toutefois, nous voyons par l'équation I.7 que l'ordre des deux derniers indices du tenseur $\chi^{(2)}$ n'est pas important, puisqu'ils sont tous deux associés à une composante du même vecteur \vec{E} à la même fréquence ω . Grâce à cette **symétrie intrinsèque à la SHG**, nous pouvons donc écrire :

$$\chi_{ijk}^{(2)} = \chi_{ikj}^{(2)}, \quad (\text{I.10})$$

et le tenseur se réduit à 18 composantes indépendantes.

Symétrie de Kleinman Loin de toute résonance du système, c'est-à-dire lorsque les énergies des photons en jeu sont toutes inférieures aux énergies de transition du milieu, l'ordre temporel d'arrivée des photons n'a pas d'importance (le milieu a une réponse instantanée) et les susceptibilités non-linéaires deviennent en outre indépendantes des fréquences. Dans ces conditions, toutes les composantes tensorielles correspondant à une permutation d'un ensemble donné d'indices sont égales. Soit, pour le tenseur $\chi^{(2)}$:

$$\chi_{ijk}^{(2)}(2\omega, \omega, \omega) = \chi_{jik}^{(2)}(2\omega, \omega, \omega). \quad (\text{I.11})$$

Dans ce cas, le tenseur ne possède plus que 10 composantes indépendantes, toutes réelles.

Le tenseur peut se simplifier davantage lorsque l'on considère les symétries spatiales du milieu, comme nous allons le voir dans le cas du tenseur du collagène en section 3.2.2.

2.1.3 Absorption et fluorescence excitée à 2 photons (2-PEF)

L'absorption simultanée de plusieurs photons, et en particulier l'absorption à 2 photons, a été démontrée théoriquement par Maria Goeppert-Mayer en 1931 [43]. Mais ce n'est qu'après l'invention des premiers lasers que sa théorie a été validée expérimentalement par Kaiser et Garrett en 1961 [44].

En dérivant l'équation de propagation non-linéaire, on peut obtenir l'équation d'évolution de l'intensité incidente en fonction de sa distance de propagation z [38] :

$$\frac{dI}{dz} = -\alpha_2 I^2, \quad (\text{I.12})$$

avec α_2 le coefficient d'absorption à 2 photons :

$$\alpha_2 = \frac{3\omega \Im[\chi^{(3)}]}{2\epsilon_0 n^2 c^2}. \quad (\text{I.13})$$

Nous voyons donc qu'un phénomène d'absorption a lieu, faisant décroître l'intensité incidente au fur et à mesure de la propagation. Toutefois, contrairement à l'absorption classique, le membre de droite de l'équation I.12 fait intervenir le carré de l'intensité : il faut que les deux photons incidents soient simultanés pour que l'absorption ait lieu.

En tant qu'absorption, ce phénomène est résonant et amène la molécule dans un état excité, contrairement à la SHG qui est une diffusion inélastique. Il est donc suivi d'une relaxation de la molécule, puis de l'émission (incohérente et isotrope) d'un photon, d'énergie un peu plus faible que la somme des énergies des deux photons incidents : c'est la fluorescence excitée à 2 photons (*2-Photon Excited Fluorescence*, abrégé en 2-PEF.).

La puissance émise par une molécule (ou fluorophore) dépend de sa section efficace d'absorption à 2 photons $\sigma_{2\text{-PEF}}$:

$$P_{2\text{-PEF}} \approx \phi_F \sigma_{2\text{-PEF}} I^2 \quad (\text{I.14})$$

où ϕ_F est le rendement quantique de fluorescence. La puissance totale mesurée est ensuite proportionnelle au nombre total de fluorophores dans le volume focal, du fait de l'incohérence du processus.

On remarque que le signal de fluorescence qui découle de cette absorption non-linéaire est proportionnelle au carré de l'intensité incidente, tout comme l'intensité du signal de SHG. Ce sont les deux interactions bi-photoniques qui nous intéresseront par la suite pour étudier le collagène.

2.2 Utilisation en microscopie

En 1978, Sheppard et Kompfner ont conceptualisé et discuté d'un point de vue théorique le principe d'un microscope optique à balayage reposant sur des interactions non-linéaires [45]. Mais ce n'est que 12 ans plus tard, en 1990, que la première implémentation expérimentale de microscopie non-linéaire a été démontrée, par Denk et coll. [46]. Dans cet article pionnier, ils démontrent expérimentalement la possibilité d'exciter la fluorescence à 2 photons (2-PEF) avec un système de microscopie à balayage laser, comme alternative à la microscopie confocale. Depuis les années 2000, de nombreux développements technologiques ont contribué à l'essor de la microscopie non-linéaire, faisant désormais de cette technique un outil indispensable dans l'étude de tissus intacts, pour répondre aussi bien à des questions biologiques fondamentales qu'à des problématiques biomédicales ou cliniques. Nous évoquons ici les différents modes de contraste accessibles en microscopie non-linéaire, puis exposons brièvement les caractéristiques principales d'un microscope non-linéaire, ainsi que les avantages qu'il apporte en termes d'imagerie.

2.2.1 Modes de contraste

Deux grands types de contrastes sont utilisés en microscopie non-linéaire : les contrastes issus de processus non-linéaires incohérents, *i.e.* la fluorescence excitée à plusieurs photons (notamment la 2-PEF, vue en section 2.1.3), et les contrastes issus de processus cohérents (diffusions inélastiques), comme la génération de second harmonique (vue précédemment en section 2.1.2). Quelques uns de ces processus sont représentés en figure I.14 par leur diagramme de Jablonski (diagramme d'énergie des molécules impliquées, où chaque photon est représenté par une flèche traduisant son énergie).

Les processus non-linéaires de fluorescence sont similaires à l'émission de fluorescence excitée à un photon : ces différents modes de contrastes donnent des informations similaires, à savoir la présence et la position de certains fluorophores, exogènes ou endogènes. En particulier, la 2-PEF est compatible avec presque tous les types de fluorophores et colorants développés pour la fluorescence linéaire, avec toutefois des spectres légèrement décalés vers le bleu [47].

Les processus cohérents sont davantage issus des propriétés structurales des molécules ou tissus. Nous avons vu en section 2.1.2 la nécessité d'un environnement non centrosymétrique pour obtenir un signal de SHG. La THG (génération de troisième harmonique), quant à elle, sonde principalement les interfaces entre deux milieux et est nulle au sein d'un milieu homogène [48]. Le contraste CARS (*Coherent Anti-Stokes Raman Scattering*) est une technique de spectroscopie qui permet de sonder des états de vibrations, correspondant à des liaisons chimiques particulières [49, 50].

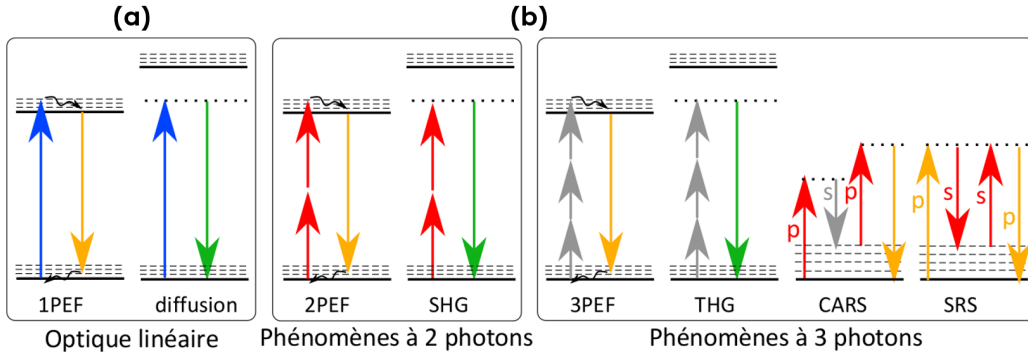


Figure I.14 – Diagrammes de Jablonski représentant différents modes de contraste en optique (a) linéaire et (b) non linéaire. Une flèche correspond à un photon et traduit son énergie (elle est donc de taille inversement proportionnelle à sa longueur d’onde) : une flèche vers le haut, resp. vers le bas, traduit un gain, resp. une perte, d’énergie. Les niveaux électroniques sont représentés en gras et les niveaux de vibration en pointillés. Les flèches noires oscillantes représentent une perte d’énergie par relaxation. Tiré de [2].

Dans ce travail, nous avons utilisé une imagerie multimodale combinant la 2-PEF et la SHG. Pour cela, l’excitation est choisie à 860 nm, donnant un signal de SHG à 430 nm et un signal de fluorescence au dessus de 450 nm environ (Fig. I.15).

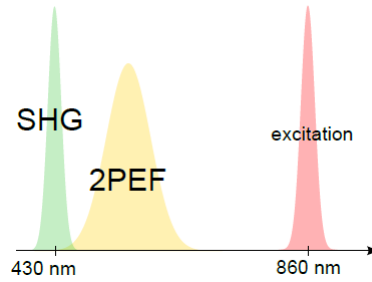


Figure I.15 – Spectre d’excitation et d’émission des deux modes de contraste utilisé ici : la SHG et la 2-PEF. Tiré de [2].

2.2.2 Caractéristiques d’un microscope non-linéaire typique

Les interactions non-linéaires se produisent dans un régime de forte intensité : il faut pouvoir atteindre de telles intensités avec le microscope, tout en restant dans un régime d’intensité moyenne compatible avec l’imagerie de systèmes biologiques. Cela nécessite tout d’abord le confinement temporel des photons émis par le laser, en utilisant un **laser impulsionnel femtoseconde** à la place d’un laser continu. Comme représenté en figure I.16, les photons sont alors regroupés temporellement par paquets de durée τ espacés d’un délai T , afin d’atteindre des fortes intensités crêtes tout en conservant la même intensité moyenne. La relation entre intensité moyenne et intensité crête est donnée dans ce cas par :

$$I_{\omega}^{max} = \frac{T}{\tau} \langle I_{\omega} \rangle \quad (\text{I.15})$$

Un laser femtoseconde typique est le titane :saphir, de durée d’impulsion τ et de taux de répétition $\frac{1}{T}$ respectivement de 100 fs et de 80 MHz : on obtient alors $I_{\omega}^{max} \approx 10^5 \langle I_{\omega} \rangle$. Notons que ce facteur 10^5 est également gagné sur l’intensité du signal d’absorption à 2 photons, qui s’écrit :

$$\begin{aligned} \text{Pour un laser continu : } I_{2\omega}^{max} &\propto \langle I_{\omega} \rangle^2 \\ \text{Pour un laser impulsionnel : } I_{2\omega}^{max} &\propto \frac{\tau}{T} (I_{\omega}^{max})^2 = \frac{T}{\tau} \langle I_{\omega} \rangle^2 \end{aligned} \quad (\text{I.16})$$

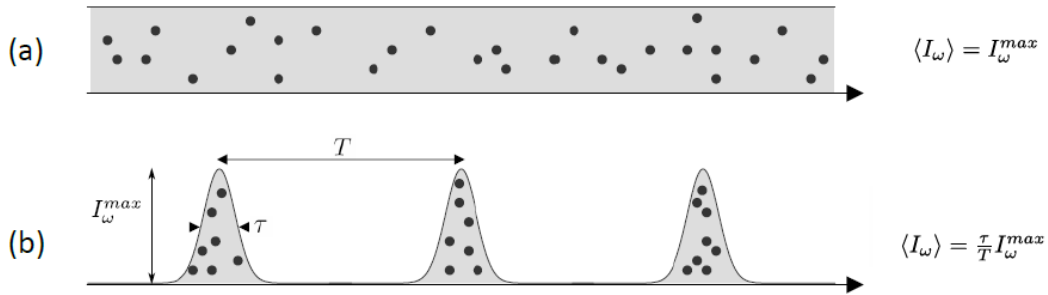


Figure I.16 – Distribution temporelle d'intensité dans le cas (a) d'un laser continu et (b) d'un laser impulsionnel. Tiré de [2].

Ce confinement temporel de l'impulsion doit également s'accompagner d'un confinement spatial en focalisant le faisceau d'excitation dans l'échantillon avec un **objectif à grande ouverture numérique** : l'effet non-linéaire ne se produira qu'au point focal du système. Ce dernier point montre qu'il est nécessaire d'équiper le microscope non-linéaire d'un **système de balayage**, de façon à reconstruire l'image point par point. Généralement, il s'agit d'un balayage de l'excitation pour former une image 2D et d'une translation de l'objectif pour sonder la troisième dimension selon la profondeur.

2.2.3 Imagerie en profondeur

Sectionnement optique intrinsèque Comme nous venons de le voir, l'imagerie non-linéaire 3D s'effectue en déplaçant le volume focal dans l'échantillon. Les processus non-linéaires ont lieu uniquement là où leur probabilité d'occurrence est maximisée, autrement dit seulement au sein du volume focal, où l'intensité incidente est maximale (confinement temporel et spatial des photons). Contrairement à la microscopie confocale, la microscopie non-linéaire présente donc un sectionnement optique tridimensionnel intrinsèque. Aucun signal n'est émis en dehors du plan focal, et il n'y a ainsi pas besoin de diaphragme pour bloquer les signaux provenant d'autres plans.

Ce sectionnement optique intrinsèque est particulièrement bien illustré dans le cas de la fluorescence excitée à deux photons (2-PEF) : lorsque l'on compare la fluorescence émise par une solution de fluorescéine après absorption à un (cas linéaire) ou à deux (cas non-linéaire) photons, la première est distribuée sur tout le cône d'excitation tandis que la seconde n'a lieu que dans un petit volume au voisinage du plan focal (Fig. I.17).

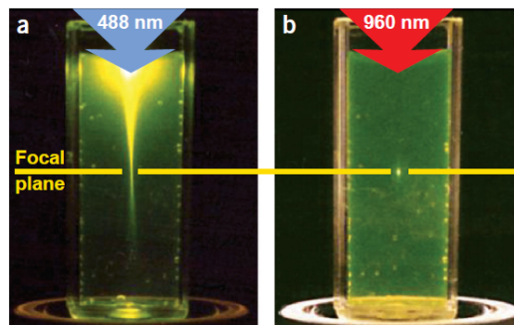


Figure I.17 – Excitation de la fluorescence dans une solution de fluorescéine avec (a) un faisceau à 488 nm (fluorescence excitée à un photon) et (b) un faisceau à 960 nm (fluorescence excitée à 2 photons). Extrait de [51].

Le confinement de l'excitation au volume focal seulement présente l'avantage de limiter la phototoxicité sur l'échantillon ainsi que le photoblanchiment des fluorophores. Les photodommages potentiels sont également très localisés et de ce fait sont minimisés.

Absorption et diffusion dans les tissus Selon le mode de contraste considéré, la longueur d'onde incidente à utiliser peut varier. Si les processus cohérents du type SHG et THG peuvent s'obtenir à n'importe quelle longueur d'onde, les processus de fluorescence à n photons ne se produisent que selon un spectre d'absorption précis, différent d'un fluorophore à l'autre. Généralement, les absorptions à 2 photons se produisent au delà de 700 nm, et il est nécessaire d'utiliser une source proche infrarouge.

L'utilisation d'une source infrarouge dégrade un peu la résolution de la microscopie non-linéaire par rapport à la microscopie confocale. Cependant, l'infrarouge présente l'avantage d'être moins absorbé et moins diffusé par les tissus biologiques, permettant ainsi une meilleure profondeur de pénétration qu'en microscopie confocale.

En effet, la décroissance de l'intensité d'un faisceau se propageant dans un milieu absorbant est décrite par la loi de Beer-Lambert : $I = I_0 e^{-\frac{z}{l_a}}$, avec z la distance de propagation dans le milieu et l_a une longueur caractéristique liée à l'absorption du milieu. Dans les tissus biologiques, l_a est maximale (autrement dit le coefficient d'absorption μ_a est minimal) pour des longueurs d'onde incidentes dans le proche infrarouge : c'est ce qu'on appelle la fenêtre de transparence des tissus, illustrée en figure I.18. Pour la plupart des tissus, on a $l_a \approx 1$ cm avec une excitation dans le proche infrarouge.

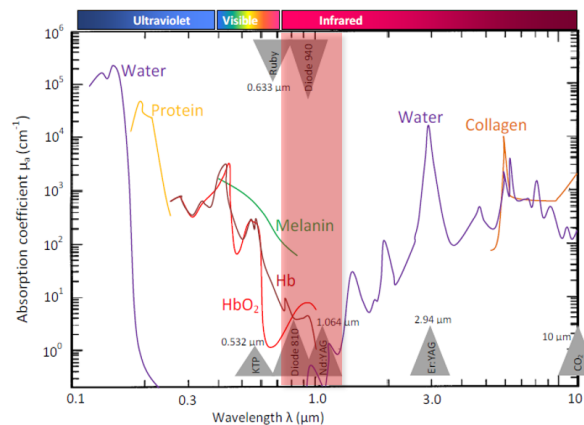


Figure I.18 – Coefficients d'absorption des principaux composants des tissus biologiques, en fonction de la longueur d'onde. La zone en rouge, correspondant au proche infrarouge, est la fenêtre de transparence des tissus. Données tirées de [52].

Les tissus biologiques sont des milieux complexes qui, en plus d'être absorbants, peuvent présenter une diffusion importante. Lors de la propagation dans un milieu diffusant, le nombre de photons balistiques décroît exponentiellement en $e^{-\frac{z}{l_d}}$, avec z la distance de propagation dans le milieu et l_d le libre parcours moyen de diffusion. Si l'on considère que les diffuseurs sont très petits devant la longueur d'onde, on peut décrire la diffusion selon le modèle de Rayleigh : la diffusion en fonction de la longueur d'onde évolue en $\frac{1}{\lambda^4}$. Elle est donc atténuée dans l'infrarouge par rapport au visible. Avec une excitation infrarouge, on trouve typiquement dans les tissus $l_d \approx 100 - 200$ μm . Cependant, même avec une diffusion atténuée dans l'infrarouge, l'intensité incidente est généralement trop faible au delà de quelques centaines de micromètres pour exciter les processus non-linéaires, et le signal est perdu.

Les signaux émis, quant à eux, le sont principalement dans le visible et sont donc soumis à une diffusion plus importante. Cela n'est pas un problème en microscopie non-linéaire : comme de grandes ouvertures numériques sont utilisées pour la détection (et qu'il n'y a pas de diaphragme à la différence de la microscopie confocale), la plupart des photons, balistiques ou non, sont détectés. De plus, ces photons ne proviennent que du volume focal, et non pas de volumes excités par l'intensité incidente diffusée, cette dernière étant trop faible pour exciter des processus non-linéaires. Le rapport signal sur bruit et la résolution sont donc bien préservés.

En conclusion, la microscopie non-linéaire permet d'atteindre des résolutions latérale et axiale similaires à celle de la microscopie confocale, une meilleure pénétration dans les tissus biologiques et une

faible phototoxicité. De plus, les différents modes de contrastes spécifiques disponibles, dont certains sont des signaux endogènes, font de la microscopie non-linéaire une technique d'imagerie biomédicale très appréciable, en particulier pour imager le collagène, comme nous allons le voir dans la section suivante.

3 Réponses non-linéaires du collagène

3.1 Fluorescence Excitée à 2 Photons (2-PEF)

Comme mentionné lors de la présentation de la microscopie confocale en section 1.3.2, il est possible d'utiliser des marqueurs fluorescents sur le collagène pour le détecter par cette fluorescence exogène [28, 29]. Ici, dans l'idée d'une imagerie non invasive sans marquage, nous nous intéressons à la fluorescence endogène du collagène.

Il est connu depuis longtemps que le collagène présente une fluorescence endogène, aussi bien *in vivo* que dans son état purifié, et que celle-ci augmente avec l'âge des tissus [53]. Une origine pour ce signal de fluorescence a été proposée en 1977 par Fujimoto et al. : elle serait due à un type particulier de réticulations (*cross-links*) des chaînes α , entre leurs pyridinolines (dérivés fluorescents de la lysine) [54]. La structure de ces réticulations a été étudiée dans certains tissus et leur fluorescence endogène est confirmée, avec un pic d'émission maximum autour de 400 nm [55]. L'augmentation de cette fluorescence avec l'âge peut s'expliquer par l'augmentation du nombre de réticulations, ainsi que par l'accumulation de composés de type AGE (*advanced glycation end-products*) dans le tissu conjonctif, qui amplifie le signal [56].

Cette fluorescence a été également visualisée avec une absorption à 2 photons, démontrant l'existence d'un signal de 2-PEF dans le collagène [57, 58]. En particulier, une étude a utilisé le niveau de fluorescence 2-PEF dans une solution de collagène pour mesurer la concentration moléculaire [58]. En 2016, des travaux menés au LOB sur des parchemins ont montré une forte augmentation de la fluorescence du matériau, après dégradation du collagène constitutif du parchemin [59]. Une étude corrélative par spectroscopie infrarouge a relié le matériau fluorescent à du collagène dénaturé (gélatine), mais l'origine de la fluorescence de la gélatine n'est à ce jour pas élucidée. Nous reviendrons sur ces travaux lors de notre étude de parchemins, au chapitre III.

Il faut toutefois prendre en compte, lorsque l'on observe le collagène au sein de tissus, que ce dernier est mélangé à d'autres composés qui peuvent également émettre de la fluorescence : c'est notamment le cas de l'élastine, co-distribuée avec le collagène dans la peau [55, 60].

3.2 Génération de Second Harmonique (SHG)

La génération de second harmonique a été observée pour la première fois dans du collagène par Roth et Freund, en 1979 [61]. Elle n'était alors pas couplée à une technique de microscopie, mais a démontré l'existence d'un signal SHG du collagène. Après une étude préliminaire en 1997 [62], l'imagerie par microscopie SHG du collagène a véritablement vu le jour en 2002 et 2003 dans plusieurs groupes de recherche, notamment celui de Campagnola et celui de Webb [51, 63–68].

3.2.1 Origine du signal du collagène

L'observation d'un signal de SHG dans un biopolymère comme le collagène n'est possible qu'à deux conditions, imposant l'absence de centrosymétrie à deux échelles différentes :

1. Le collagène doit posséder une *source élémentaire* de SHG à l'échelle moléculaire. Autrement dit, des dipôles au sein de la structure moléculaire du collagène doivent présenter une hyperpolarisabilité β non nulle, émettant ainsi un signal de SHG à l'échelle moléculaire.
2. Tous les signaux de SHG à l'échelle moléculaire, relativement faibles individuellement, doivent pouvoir se sommer constructivement à toutes les échelles de la structure du collagène, de façon à obtenir un signal SHG détectable à l'échelle macromoléculaire.

Le deuxième point signifie en particulier que les dipôles de la structure moléculaire doivent présenter un certain degré d'alignement les uns par rapport aux autres, de façon à émettre leurs signaux de SHG en phase : la somme sera alors constructive. Ceci est illustré par la figure I.19 dans le cas de deux dipôles tête-bêche et de deux dipôles alignés dans le même sens. On retrouve ici la propriété de symétrie du tenseur $\chi^{(2)}$, qui est nul dans un milieu centrosymétrique (cf. section 2.1.2).

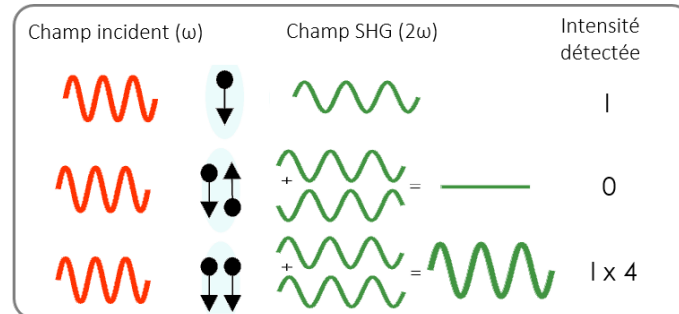


Figure I.19 – Construction cohérente du signal de SHG. Le signal SHG détecté est nul lorsque les dipôles sont tête-bêche (milieu centrosymétrique) alors qu'il est non nul lorsque les dipôles sont alignés dans le même sens et émettent en phase.

L'observation expérimentale de signaux de SHG dans le collagène fibrillaire indique que le collagène fibrillaire répond bien à ces deux exigences. Il a été montré que la source élémentaire de SHG du collagène, à l'échelle moléculaire, se situe au niveau de la liaison peptidique dans la séquence protéique [69–71]. Le comportement de la liaison peut être décrit en première approximation par un modèle *push-pull*, c'est-à-dire présentant un mécanisme de transfert fortement unidirectionnel, composé d'un donneur et d'un accepteur d'électrons à chaque extrémité d'un pont électronique. Dans ce modèle, le transfert de charge est spécifiquement possible dans une unique direction et l'hyperpolarisabilité $\underline{\underline{\beta}}$ (tenseur d'ordre 3) qui décrit le signal de SHG à l'échelle moléculaire ne possède en fait qu'une seule composante : β_{uuu} (ou notée simplement β_{pept}), où \vec{u} peut être considéré, dans une approche simplifiée, comme définissant l'axe de la liaison peptidique. Cet axe forme un angle θ_e avec l'axe de la chaîne α , appelé le *pitch angle*. Il est visible sur la figure I.20 (b).

Il faut maintenant sommer cette réponse non-linéaire pour toutes les échelles de la structure hiérarchique du collagène : à chaque échelle est associée un tenseur de susceptibilité non-linéaire que nous exprimons dans la section suivante.

3.2.2 Construction hiérarchique de la réponse tensorielle

Triple hélice À partir de la réponse non-linéaire du dipôle (liaison peptidique), nous pouvons calculer directement le tenseur $\chi_{TH}^{(2)}$ à l'échelle de la triple hélice, en considérant que tous les dipôles ont le même *pitch angle* θ_e et que l'axe x de la triple hélice est confondu avec celui des chaînes α (c'est l'axe x visible en figure I.20). Les dipôles sont donc tous distribués sur un cône d'axe x et d'angle θ_e , avec des orientations azimutales aléatoires. Certaines approches permettent de rendre compte de l'inclinaison des chaînes α par rapport à la triple hélice, indiquant un angle typique de 12° [71], ou encore de considérer un désordre d'orientation des dipôles [72], mais nous nous limitons ici à un cas simple.

Nous considérons ainsi que la triple hélice présente une symétrie cylindrique (on néglige sa forme en hélice droite). Les seules composantes non nulles du tenseur de susceptibilité non-linéaire $\chi_{TH}^{(2)}$ décrivant

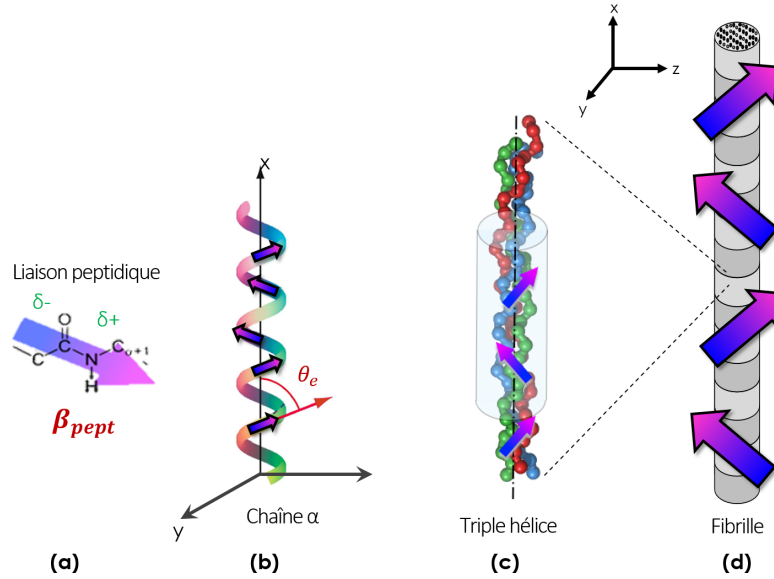


Figure I.20 – Organisation non centrosymétrique des sources de SHG dans le collagène fibrillaire. (a) Les sources élémentaires de SHG dans le collagène sont les liaisons peptidiques entre acides aminés des chaînes α . (b) Elles forment un angle θ_e avec l’axe de la chaîne α (adapté de [72]). (c) et (d) Les tenseurs de susceptibilité non-linéaires des triples hélices $\chi_{TH}^{(2)}$ et des fibrilles $\chi_{fib}^{(2)}$ s’expriment dans le même repère (xyz).

la réponse SHG de la triple hélice sont donc celles correspondant à la symétrie C_∞ [37] :

$$\begin{aligned}
 &\chi_{TH,xxx}^{(2)} \\
 &\chi_{TH,xzz}^{(2)} = \chi_{TH,xyy}^{(2)} \\
 &\chi_{TH,zzz}^{(2)} = \chi_{TH,yxy}^{(2)} = \chi_{TH,zzx}^{(2)} = \chi_{TH,yyx}^{(2)} \\
 &\chi_{TH,yzx}^{(2)} = \chi_{TH,yxz}^{(2)} = -\chi_{TH,zyx}^{(2)} = -\chi_{TH,zxy}^{(2)}
 \end{aligned} \tag{I.17}$$

Si les conditions de la symétrie de Kleinman s’appliquent (cf. l’explication de la symétrie de Kleinman en section 2.1.2), le tenseur se simplifie davantage. En particulier, les composantes données par la dernière ligne de l’équation I.17 (les composantes *chirales*, liées à la chiralité du collagène et nulles en symétrie $C_{\infty v}$), s’annulent, et d’autres composantes deviennent égales. Finalement, on obtient 7 composantes non nulles, avec seulement 2 composantes indépendantes :

$$\begin{aligned}
 &\chi_{TH,xxx}^{(2)} \\
 &\chi_{TH,xzz}^{(2)} = \chi_{TH,xyy}^{(2)} = \chi_{TH,zzz}^{(2)} = \chi_{TH,yxy}^{(2)} = \chi_{TH,zzx}^{(2)} = \chi_{TH,yyx}^{(2)}
 \end{aligned} \tag{I.18}$$

Chacune de ces composantes s’obtient en fonction de la composante non nulle de l’hyperpolarisabilité β_{pept} . Pour cela, le tenseur $\underline{\underline{\beta}}$ de chaque dipôle est exprimé dans le repère (xyz) de la triple hélice, puis toutes les réponses exprimées dans le même repère sont sommées [36, 69, 72] :

$$\begin{aligned}
 \chi_{TH,xxx}^{(2)} &= N_p \beta_{pept} \cos^3(\theta_e) \\
 \chi_{TH,xyy}^{(2)} &= \frac{1}{2} N_p \beta_{pept} \cos(\theta_e) \sin^2(\theta_e)
 \end{aligned} \tag{I.19}$$

où N_p est la densité de dipôles (liaisons peptidiques) dans la triple hélice.

Fibrille Nous avons à nouveau recours à un cas simplifié, en considérant que la fibrille présente une symétrie cylindrique, avec des triples hélices parfaitement parallèles entre elles. Le tenseur non-linéaire

à cette échelle $\chi_{\text{fib}}^{(2)}$ aura donc les mêmes composantes non nulles que le tenseur $\chi_{\text{TH}}^{(2)}$ d'une triple hélice, et s'exprimera simplement comme la somme des tenseurs $\chi_{\text{TH}}^{(2)}$ des N triples hélices présentes dans la fibrille (les tenseurs à ces deux échelles s'expriment dans le même repère (xyz) montré en figure I.20).

$$\chi_{\text{fib}}^{(2)} = N\chi_{\text{TH}}^{(2)} \quad (\text{I.20})$$

Tissu De la même manière que précédemment, en sommant les tenseurs $\chi_{\text{fib}}^{(2)}$ exprimés dans un repère commun (celui du tissu ou du laboratoire), on peut obtenir la réponse non-linéaire du collagène à l'échelle du tissu. Le formalisme que nous avons utilisé pour cette étape est détaillé au chapitre II, section 1.1.1.

Nous avons utilisé ici une approche relativement simple pour calculer la réponse totale non-linéaire du collagène, en faisant des approximations sur son organisation à chaque échelle. D'autres approches plus élaborées permettent de prendre en compte des structurations hiérarchiques plus complexes [70, 73, 74]. Toutefois, notre approche est suffisante pour nous permettre de décrire en première approximation l'imagerie de tissus complexes.

3.2.3 Spécificité pour le collagène fibrillaire

La construction hiérarchique de la réponse tensorielle a été menée dans la section précédente pour du collagène fibrillaire. Dans ce cas, l'organisation du collagène à chaque échelle peut se décrire en première approximation par des structures de symétrie cylindrique et non centrosymétriques, ce qui permet une somme constructive des signaux. Cela n'est pas le cas de tous les collagènes : le collagène de type IV par exemple, a une organisation macromoléculaire en réseau centrosymétrique, et la somme cohérente des réponses tensorielles au delà de la triple hélice sera destructive [75]. Expérimentalement, l'absence de signal SHG dans du collagène IV a été constatée dans un tissu fibrosé de rein humain [76].

La SHG apparaît donc comme un mode de contraste spécifique pour le collagène fibrillaire, et donc notamment pour le collagène de type I, permettant de distinguer cette protéine des autres composants (y compris des autres types de collagène) présents dans le tissu étudié. La microscopie SHG peut donc servir à visualiser l'architecture du collagène I dans les tissus, mais peut également apparaître comme une technique de diagnostic, permettant de distinguer le collagène fibrillaire bien préservé du collagène fibrillaire dégradé (dont la structure a alors été impactée), notamment dans des tissus pathologiques. En particulier, le stade ultime d'altération du collagène, sa gélatinisation (dénaturation), impacte fortement la structure hiérarchique du collagène qui devient centrosymétrique (Fig. I.5), ce qui a pour conséquence d'annuler le signal de SHG.

La microscopie SHG a ainsi été utilisée avec succès pour l'étude du collagène fibrillaire dans de nombreux tissus [77]. La figure I.21 en montre quelques exemples.

Conclusion

Le collagène, en particulier le type I, est une protéine omniprésente dans les tissus, dont la visualisation *in situ* et en profondeur, par des techniques d'imagerie adaptées, est un enjeu important dans le domaine du biomédical. De nombreuses techniques peuvent être utilisées selon l'échelle que l'on souhaite étudier, mais elles imposent toutes un compromis entre la résolution et la profondeur d'imagerie. La microscopie non-linéaire, et en particulier les contrastes reposant sur les processus bi-photoniques de 2-PEF et de SHG, apparaît comme une technique d'imagerie de choix, car elle permet une bonne résolution tout en limitant les phénomènes de diffusion et d'absorption dans les tissus qui restreignent la profondeur d'imagerie.

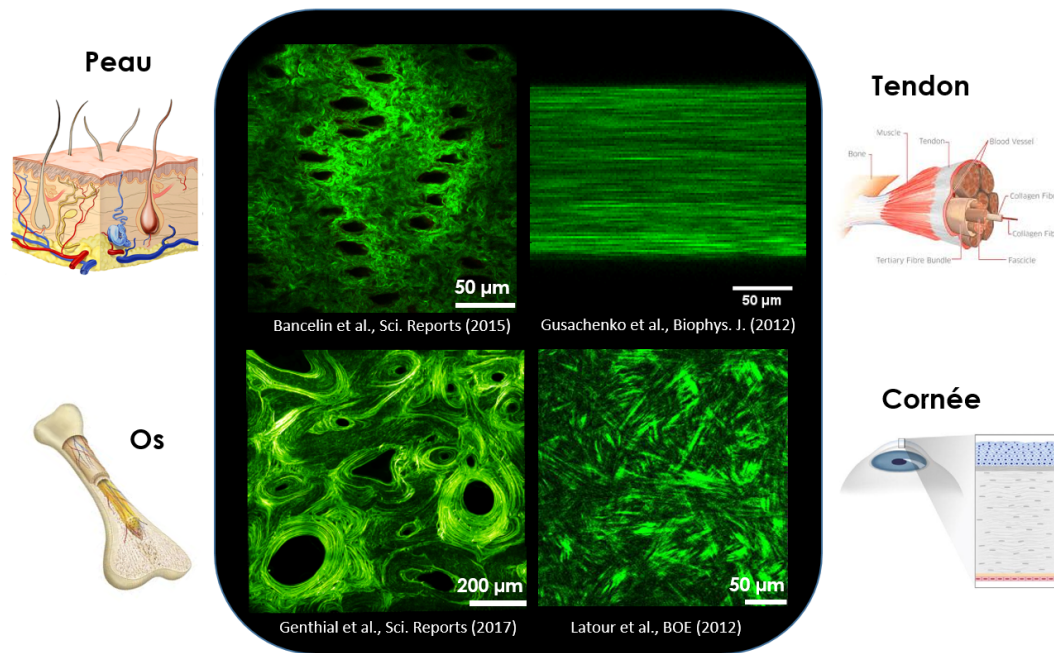


Figure I.21 – Imagerie du collagène par microscopie SHG dans différents tissus : la peau [78], le tendon [79], l’os [80] et la cornée [81].

De plus, la microscopie SHG est aujourd’hui une technique incontournable d’imagerie du collagène, car elle permet de sonder de manière spécifique le collagène fibrillaire, grâce à la structure hiérarchique et non-centrosymétrique à toutes les échelles de ce biopolymère. Pour une partie des études de microscopie SHG du collagène, l’excitation se fait avec un faisceau incident de polarisation quasi-circulaire pour ne favoriser aucune direction d’émission. Mais différentes modalités de la microscopie SHG ont également émergé, tirant profit de la possibilité d’imposer un état de polarisation particulier au champ incident. Il s’agit notamment de la P-SHG (*Polarization-resolved SHG*) et du CD-SHG (*Circular Dichroism with SHG*). Ce sont ces deux modalités qui vont nous intéresser dans la suite du manuscrit.

Chapitre II

Microscopie de second harmonique résolue en polarisations linéaire et circulaire

Concerto en Sol
Maurice RAVEL



Sommaire

1	Aspects théoriques	33
1.1	Formalisme	33
1.2	Calcul analytique de l'intensité SHG	34
1.3	Informations extraites par P-SHG	38
2	Perfectionnement du système expérimental	41
2.1	Dispositif général	41
2.2	Optimisation des résolutions et du champ de vue	43
2.3	Réglages des polarisations	46
3	Acquisition et traitement des données	48
3.1	Principe des mesures	48
3.2	Extraction des paramètres P-SHG en <i>post-processing</i>	49
	Conclusion	55

Cela fait plus d'un demi-siècle que la polarisation de la lumière est utilisée en biologie ou biochimie pour obtenir des informations sur l'orientation des molécules et des protéines, notamment en spectroscopie de fluorescence [82]. Le développement important de la microscopie optique depuis quelques dizaines d'années a permis l'émergence de nouvelles techniques d'imagerie basées sur la polarisation, comme l'anisotropie de fluorescence ou la polarimétrie de Mueller. D'une manière générale, l'imagerie résolue en polarisation permet de prendre en compte la nature vectorielle de l'interaction lumière-matière et apporte des informations complémentaires sur l'organisation moléculaire dans les cellules ou les tissus.

Une lumière incidente polarisée a été utilisée dès les premières expériences de génération de second harmonique (SHG) dans le collagène : les premiers signaux SHG du collagène observés par Roth et Freund en 1979 sont des signaux polarimétriques [61]. La microscopie P-SHG (*Polarization-resolved SHG*) a ensuite été introduite en 2002, au début de la microscopie SHG dans le collagène, par Stoller et coll. [64].

La P-SHG est une modalité de la microscopie SHG qui permet une résolution en polarisation, c'est-à-dire qui utilise un champ incident polarisé linéairement suivant une direction variable. Cette technique combine d'une part la sensibilité des techniques de polarimétrie à l'orientation et à l'ordre moléculaire, et d'autre part la spécificité de la génération de second harmonique au collagène fibrillaire. Dans leur travail pionnier, Stoller et coll. montrent l'intérêt de la P-SHG pour établir des cartes d'orientation des fibres de collagène dans différents tissus. À chaque point de l'image est associé une orientation principale ce qui permet de discerner des motifs d'orientation à l'échelle du pixel. Ils extraient également un paramètre de contraste sensible aux propriétés optiques du tissu, et notamment lié à l'organisation des fibrilles au sein du volume focal. De nombreux articles sur la P-SHG du collagène, postérieurs à la publication de Stoller, font également mention d'un tel paramètre reflétant le désordre à l'échelle micrométrique (cf. par exemple [73, 79, 83, 84]), ou permettant de sonder la structure moléculaire (cf. par exemple [72-74]).

Une autre modalité de la microscopie SHG a récemment émergé : le CD-SHG (*Circular Dichroism with SHG*). Elle fait intervenir des excitations de polarisations *parfaitement* circulaires, gauche et droite, et exploite le phénomène de différence circulaire présent chez certaines molécules (les molécules chirales) qui répondent différemment à une polarisation circulaire droite et à une polarisation circulaire gauche. Ainsi, la différence entre deux signaux générés respectivement par des polarisations circulaires droite et gauche sera non nulle dans certains cas, offrant un nouveau mode de contraste. Ce contraste a été implémenté pour la première fois en microscopie SHG sur des tissus biologiques en 2012 par le groupe de Campagnola [85]. Depuis, des études semblent indiquer un lien entre la polarité hors du plan d'imagerie des structures imagées et le signal de CD-SHG, indiquant le potentiel de cette modalité pour obtenir de nouvelles informations sur l'orientation des structures au sein du volume focal [86, 87].

Dans ce chapitre, nous allons tout d'abord présenter le formalisme utilisé pour l'interprétation de nos signaux de SHG. Puis nous décrirons le dispositif expérimental ainsi que nos protocoles expérimentaux et numériques d'acquisition et de traitement de données de P-SHG et de CD-SHG, qui ont été améliorés au cours de ce travail.

Notons que le formalisme ainsi que les protocoles utilisés pour le CD-SHG sont ici volontairement très brefs et généraux : ils seront précisés en détail dans les deux derniers chapitres de ce manuscrit, entièrement dédiés au CD-SHG.

1 Aspects théoriques

Avant de nous intéresser à la mise en place des expériences de SHG résolues en polarisation, nous présentons ici les bases théoriques nécessaires pour comprendre les informations fournies par de telles mesures. Les expressions théoriques des intensités SHG obtenues avec des états de polarisations linéaires ou circulaires y sont développées, ce qui nous permet de différencier les paramètres qui ont une influence sur le signal de SHG. Mais, dans un premier temps, nous explicitons nos hypothèses de travail, en termes de symétries et d'orientations à considérer pour le collagène.

1.1 Formalisme

1.1.1 Symétrie du milieu, repère et conventions angulaires

Nous associons au référentiel du laboratoire le repère (XYZ). L'axe Z est l'axe de propagation du laser, qui, dans le cas d'un microscope droit, pointe vers le bas. Le plan (XY) correspond donc au plan focal. Le milieu constituant le volume focal (générant le signal de second harmonique) qui a été considéré pour les calculs est un milieu homogène constitué de fibrilles de collagène de symétrie cylindrique alignées les unes avec les autres, avec pas ou peu de désordre. Le milieu lui-même présente une symétrie cylindrique autour d'un axe, que l'on note l'axe x (en minuscule). Cet axe indique la polarité (orientation directionnelle) moyenne des fibrilles au sein du volume focal. Le repère associé au milieu est le repère (xyz) (quelquefois référencé en tant que repère des fibrilles), et est lié au repère (XYZ) par l'intermédiaire des angles φ et ψ , visibles en figure II.1.

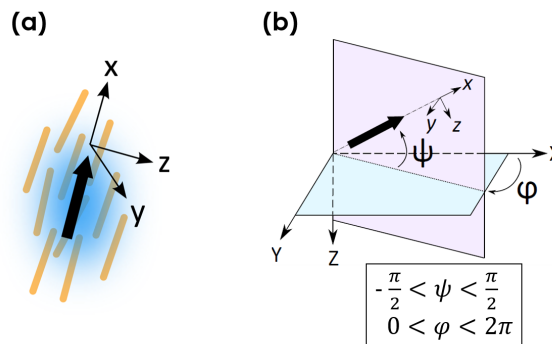


Figure II.1 – (a) Milieu considéré dans le volume focal : les fibrilles de collagène y sont organisées selon une direction moyenne. (b) Angles φ et ψ liant le repère du laboratoire (XYZ) au repère des fibrilles (xyz). Ils correspondent aux directions moyennes des fibrilles respectivement dans le plan d'imagerie et hors-plan. Adapté de [2].

Dans notre convention, l'angle φ représente la direction moyenne des fibrilles dans le plan de l'image (XY), entre 0 et 2π : il est nul lorsque les fibrilles ont une orientation moyenne dans le plan selon l'axe X. L'angle ψ représente la polarité hors-plan des fibrilles et est défini de $-\frac{\pi}{2}$ à $+\frac{\pi}{2}$: un angle ψ positif, resp. négatif, correspond donc à un paquet de fibrilles qui *pointe* vers le haut, resp. le bas¹.

Deux remarques importantes de vocabulaire :

- On utilise les termes *orientation* et *polarité* pour parler respectivement d'une orientation non directionnelle (double-flèche) et d'une direction avec un sens (flèche simple).
- L'angle φ est défini de 0 à 2π de façon à couvrir tout l'espace 3D euclidien, pour la gamme de ψ choisi. Toutefois, la plupart des méthodes en SHG qui mesurent l'angle dans le plan des fibrilles (analyse d'images ou P-SHG) mesurent en fait φ modulo π : il s'agit alors d'une orientation et non d'une polarité dans le plan.

1. C'est pour avoir un accès direct à cette polarité hors-plan que ces angles ne respectent pas la convention classique des angles d'Euler.

1.1.2 Tenseur du collagène

Le milieu considéré a la même symétrie que les fibrilles de collagène qui le constituent : son tenseur de susceptibilité non-linéaire $\chi^{(2)}$ a donc les mêmes composantes non nulles que le tenseur d'une fibrille $\chi_{fib}^{(2)}$, décrit au chapitre précédent (section 3.2.2). Plus précisément, comme nous avons fait l'hypothèse d'un désordre faible au sein du volume focal, on peut considérer que $\chi^{(2)} = N\chi_{fib}^{(2)}$ où N est la densité de fibrilles dans le volume focal. En pratique, si le désordre augmente, le tenseur se moyenne sur plusieurs orientations, ce qui entraîne une diminution globale de la valeur de ses composantes (la distribution se rapproche d'une distribution centrosymétrique, affaiblissant la réponse SHG).

Dans notre cas, ce tenseur possède quatre composantes indépendantes :

$$\begin{aligned} \chi_{xxx}^{(2)} \\ \chi_{xyy}^{(2)} &= \chi_{xzz}^{(2)} \\ \chi_{yxy}^{(2)} &= \chi_{zxx}^{(2)} \\ \chi_{yzx}^{(2)} &= \chi_{yxz}^{(2)} = -\chi_{zyx}^{(2)} = -\chi_{zxy}^{(2)} \end{aligned} \quad (\text{II.1})$$

Dans les conditions de la symétrie de Kleinman, les termes chiraux (en rouge) s'annulent et les termes achiraux bleus et verts sont égaux. Il ne reste alors que deux composantes achirales indépendantes : $\chi_{xxx}^{(2)}$ et $\chi_{xyy}^{(2)}$.

1.2 Calcul analytique de l'intensité SHG

Nous dérivons ici l'expression analytique de l'intensité SHG, en nous plaçant dans l'hypothèse d'ondes planes (la focalisation n'est pas prise en compte) : le champ incident $\vec{E}(\omega)$ est donc polarisé dans le plan de l'image, c'est-à-dire le plan (XY) dans le repère du laboratoire. Ce champ va induire une polarisation non-linéaire dans le collagène, qui s'écrit :

$$\vec{P}^{(2)}(2\omega) = \epsilon_0 \chi^{(2)} \vec{E}(\omega) \vec{E}(\omega). \quad (\text{II.2})$$

Cette polarisation rayonne à son tour un champ $\vec{E}(2\omega)$, sous la forme :

$$\vec{E}(2\omega) \propto (\hat{n} \times \vec{P}^{(2)}) \times \hat{n}, \quad (\text{II.3})$$

où \hat{n} est la direction d'observation. Dans notre cas, il s'agit de l'axe Z du repère du laboratoire, et $\hat{n} = \hat{e}_Z$. Ainsi, le champ rayonné s'écrit simplement :

$$\vec{E}(2\omega) \propto P_X^{(2)} \hat{e}_X + P_Y^{(2)} \hat{e}_Y. \quad (\text{II.4})$$

On remarque qu'il est polarisé dans le même plan (XY) que le champ incident. L'intensité SHG totale détectée s'écrit alors :

$$I^{2\omega} \propto |P_X^{(2)}|^2 + |P_Y^{(2)}|^2. \quad (\text{II.5})$$

Il nous suffit donc ici de connaître l'expression de la polarisation non-linéaire $\vec{P}^{(2)}(2\omega)$ induite dans le milieu considéré, décrit en section précédente. Le tenseur $\chi^{(2)}$ décrivant les fibrilles de collagène est connu mais exprimé dans le repère (xyz) des fibrilles, différent du repère (XYZ) du laboratoire. Pour limiter les calculs matriciels de changement de repère, nous choisissons ici d'exprimer la génération de second harmonique dans le repère (xyz) des fibrilles², en effectuant les opérations suivantes :

1. Expression du champ incident $\vec{E}(\omega)$ dans le repère (xyz) des fibrilles de collagène, à l'aide de la matrice de rotation $T(\varphi, \psi)$ donnée dans l'encadré II.1. Les angles φ et ψ sont respectivement l'orientation moyenne des fibrilles dans le volume focal et leur angle hors-plan.

2. C'est une approche légèrement différente mais équivalente à celle proposée par Claire Teulon dans sa thèse [2], où le changement de repère est appliqué directement sur le tenseur $\chi^{(2)}$, nécessitant 27 opérations.

2. Calcul de la polarisation non-linéaire $\vec{P}^{(2)}(2\omega)$ dans le repère (xyz) des fibrilles, suivant l'équation II.2.
3. Expression de la polarisation dans le repère (XYZ) du laboratoire, à l'aide de la matrice transposée tT , puis calcul de $I^{2\omega}$ grâce à son expression donnée en II.5.

Encadré II.1. - Matrice de changement de base

Pour exprimer un vecteur dans le repère (xyz) des fibrilles, lorsqu'on connaît ses composantes dans le repère (XYZ) du laboratoire, on utilise la matrice de passage T telle que

$$\vec{V}_{fib} = T\vec{V}_{lab}. \quad (\text{II.6})$$

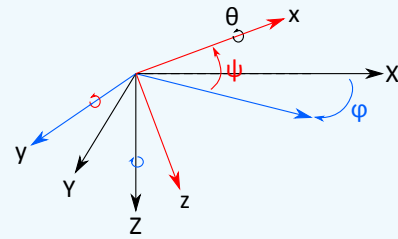
Étant donné que pour passer du repère (XYZ) du laboratoire au repère (xyz) des fibrilles, deux rotations sont effectuées :

1. Une rotation d'angle φ autour de l'axe Z (en bleu sur le schéma), caractérisée par la matrice de passage

$$M_\varphi = \begin{bmatrix} \cos \varphi & \sin \varphi & 0 \\ -\sin \varphi & \cos \varphi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}, \quad (\text{II.7})$$

2. Une rotation d'angle ψ autour de l'axe y (en rouge), caractérisée par la matrice de passage

$$M_\psi = \begin{bmatrix} \cos \psi & 0 & -\sin \psi \\ 0 & 1 & 0 \\ \sin \psi & 0 & \cos \psi \end{bmatrix}, \quad (\text{II.8})$$



Passage du repère (XYZ) du laboratoire au repère (xyz) des fibrilles par deux rotations successives. L'angle θ n'est ici pas pertinent et peut être fixé à 0° du fait de la symétrie cylindrique des fibrilles.

la matrice T se calcule directement comme le produit $M_\psi M_\varphi$

$$T(\varphi, \psi) = \begin{bmatrix} \cos \varphi \cos \psi & \sin \varphi \cos \psi & -\sin \psi \\ -\sin \varphi & \cos \varphi & 0 \\ \cos \varphi \sin \psi & \sin \varphi \sin \psi & \cos \psi \end{bmatrix}. \quad (\text{II.9})$$

Suivant ces trois étapes, nous allons dériver l'expression de l'intensité SHG $I^{2\omega}$ dans deux cas : tout d'abord dans le cas d'un champ incident $\vec{E}(\omega)$ polarisé linéairement, puis dans le cas d'un champ $\vec{E}(\omega)$ polarisé circulairement. Ces deux cas correspondent à nos deux modes de mesures : la P-SHG (polarisations linéaires) et le CD-SHG (polarisations circulaires).

1.2.1 Polarisation incidente linéaire

Le champ incident polarisé linéairement selon θ (angle formé entre sa direction de polarisation et l'axe X) s'écrit dans le repère (XYZ) du laboratoire :

$$\vec{E}_\theta(\omega) = E_0 \cos \theta \hat{e}_X + E_0 \sin \theta \hat{e}_Y. \quad (\text{II.10})$$

Après multiplication à gauche par la matrice $T(\varphi, \psi)$, on trouve le champ dans le repère (xyz) des fibrilles :

$$\vec{E}_\theta(\omega) = E_0 (\cos \psi \cos(\theta - \varphi) \hat{e}_x + \sin(\theta - \varphi) \hat{e}_y + \sin \psi \cos(\theta - \varphi) \hat{e}_z). \quad (\text{II.11})$$

Chaque composante de la polarisation induite à 2ω dans le repère (xyz) s'exprime alors ainsi :

$$\begin{aligned}
 \frac{1}{\epsilon_0} P_{x,\theta}^{(2)} &= \chi_{xxx}^{(2)} E_x^2(\omega) + \chi_{xyy}^{(2)} (E_y^2(\omega) + E_z^2(\omega)) \\
 &= E_0^2 \left(\chi_{xxx}^{(2)} \cos^2 \psi \cos^2(\theta - \varphi) + \chi_{xyy}^{(2)} (1 - \cos^2 \psi \cos^2(\theta - \varphi)) \right), \\
 \frac{1}{\epsilon_0} P_{y,\theta}^{(2)} &= 2\chi_{yxy}^{(2)} E_x(\omega) E_y(\omega) + 2\chi_{yxz}^{(2)} E_x(\omega) E_z(\omega) \\
 &= 2E_0^2 \left(\chi_{yxy}^{(2)} \cos \psi \cos(\theta - \varphi) \sin(\theta - \varphi) + \chi_{yxz}^{(2)} \sin \psi \cos \psi \cos^2(\theta - \varphi) \right), \\
 \frac{1}{\epsilon_0} P_{z,\theta}^{(2)} &= 2\chi_{zxx}^{(2)} E_x(\omega) E_z(\omega) + 2\chi_{zxy}^{(2)} E_x(\omega) E_y(\omega) \\
 &= 2E_0^2 \left(\chi_{zxx}^{(2)} \sin \psi \cos \psi \cos^2(\theta - \varphi) + \chi_{zxy}^{(2)} \cos \psi \cos(\theta - \varphi) \sin(\theta - \varphi) \right).
 \end{aligned} \tag{II.12}$$

Pour continuer les calculs, nous faisons l'hypothèse classique que les conditions de symétrie de Kleinman (excitation à une longueur d'onde assez loin des résonances) sont ici respectées, de manière à alléger les expressions analytiques. Ainsi les composantes chirales (en rouge) s'annulent et les termes bleus et verts sont égaux. Il ne reste plus que 2 composantes tensorielles indépendantes : $\chi_{xxx}^{(2)}$ et $\chi_{xyy}^{(2)}$. Après linéarisation des fonctions trigonométriques de θ , la polarisation non-linéaire prend la forme :

$$\begin{aligned}
 \frac{1}{\epsilon_0} P_{x,\theta}^{(2)} &= E_0^2 \left(\frac{\cos^2 \psi}{2} (\chi_{xxx}^{(2)} - \chi_{xyy}^{(2)}) + \chi_{xyy}^{(2)} + \cos(2(\theta - \varphi)) \frac{\cos^2 \psi}{2} (\chi_{xxx}^{(2)} - \chi_{xyy}^{(2)}) \right), \\
 \frac{1}{\epsilon_0} P_{y,\theta}^{(2)} &= E_0^2 \chi_{xyy}^{(2)} \cos \psi \sin(2(\theta - \varphi)), \\
 \frac{1}{\epsilon_0} P_{z,\theta}^{(2)} &= \frac{E_0^2}{2} \chi_{xyy}^{(2)} \sin(2\psi) (1 + \cos(2(\theta - \varphi))).
 \end{aligned} \tag{II.13}$$

Il suffit maintenant de calculer le produit ${}^t T(0, \psi) \vec{P}_{(xyz)}^{(2)}$ pour obtenir les deux composantes qui nous intéressent P_X et P_Y dans le repère (XYZ) :

$$\begin{aligned}
 P_{X,\theta}^{(2)} &= \epsilon_0 E_0^2 \left(\cos \varphi \mathcal{A}(\chi^{(2)}, \psi, \theta - \varphi) - \sin \varphi \mathcal{B}(\chi^{(2)}, \psi, \theta - \varphi) \right), \\
 P_{Y,\theta}^{(2)} &= \epsilon_0 E_0^2 \left(\sin \varphi \mathcal{A}(\chi^{(2)}, \psi, \theta - \varphi) + \cos \varphi \mathcal{B}(\chi^{(2)}, \psi, \theta - \varphi) \right),
 \end{aligned} \tag{II.14}$$

avec

$$\begin{aligned}
 \mathcal{A}(\chi^{(2)}, \psi, \theta - \varphi) &= \frac{\cos^3 \psi}{2} \chi_{xxx}^{(2)} + \left(2 - \frac{3}{2} \cos^2 \psi \right) \cos \psi \chi_{xyy}^{(2)} \\
 &\quad + \cos(2(\theta - \varphi)) \left[\frac{\cos^3 \psi}{2} \chi_{xxx}^{(2)} + \left(1 - \frac{3}{2} \cos^2 \psi \right) \cos \psi \chi_{xyy}^{(2)} \right], \\
 \mathcal{B}(\chi^{(2)}, \psi, \theta - \varphi) &= \sin(2(\theta - \varphi)) \cos \psi \chi_{xyy}^{(2)}.
 \end{aligned} \tag{II.15}$$

En supposant que toutes les composantes tensorielles sont réelles, l'expression de l'intensité SHG va alors se simplifier ainsi :

$$\begin{aligned}
 I^{2\omega} &\propto |P_X^{(2)}|^2 + |P_Y^{(2)}|^2 \\
 &\propto (\cos \varphi \mathcal{A} - \sin \varphi \mathcal{B})^2 + (\sin \varphi \mathcal{A} + \cos \varphi \mathcal{B})^2 \\
 &\propto \mathcal{A}^2 + \mathcal{B}^2.
 \end{aligned} \tag{II.16}$$

Dans cette expression, l'orientation du champ θ n'intervient que par la fonction $\cos(2(\theta - \varphi))$ ou son carré. Cela montre donc que l'intensité SHG en fonction de θ s'écrit comme une somme de cosinus, d'ordre de fréquence pair. Plus précisément :

$$I^{2\omega}(\theta) = K(I^\omega)^2 \cos^2(\psi) \times [a_0(\psi) + a_2(\psi) \cos(2(\theta - \varphi)) + a_4(\psi) \cos(4(\theta - \varphi))], \tag{II.17}$$

où $I^\omega \propto E_0^2(\omega)$ est l'intensité incidente, K est une constante de proportionnalité prenant en compte ϵ_0 , les indices de réfraction, la célérité de la lumière et des facteurs géométriques, et a_0 , a_2 et a_4 sont des constantes par rapport à θ , ne dépendant que de l'angle hors-plan ψ et du tenseur du collagène $\chi^{(2)}$ dans le repère (xyz) des fibrilles (leurs expressions complètes sont données en annexe A).

On constate que cette expression fait apparaître le facteur $(I^\omega)^2 \cos^2(\psi)$ qui traduit en première approximation le comportement de l'intensité SHG en fonction de l'angle hors-plan ψ des fibrilles.

1.2.2 Polarisation incidentes circulaires

Le champ incident polarisé circulairement à gauche (LCP, indicé L, +) ou à droite (RCP, indicé R, -) s'écrit dans le repère (XYZ) du laboratoire :

$$\vec{E}_{L/R}(\omega) = \frac{E_0}{\sqrt{2}} (\hat{e}_X \pm i\hat{e}_Y). \quad (\text{II.18})$$

Après changement de repère grâce à la matrice T donnée dans l'encadré II.1, on obtient le champ incident dans le repère (xyz) des fibrilles :

$$\vec{E}_{L/R}(\omega) = \frac{E_0}{\sqrt{2}} e^{\pm i\varphi} (\cos \psi \hat{e}_x \pm i\hat{e}_y + \sin \psi \hat{e}_z). \quad (\text{II.19})$$

En pratique, pour une polarisation circulaire, l'orientation des fibrilles dans le plan (XY) n'importe pas et l'on peut alors simplifier la matrice de passage $T(\varphi, \psi) = T(0, \psi)$. Cela permet de s'affranchir du facteur $e^{\pm i\varphi}$ dans l'expression du champ incident.

Calculons maintenant la polarisation induite dans le repère (xyz), composante par composante :

$$\begin{aligned} \frac{1}{\epsilon_0} P_{x,L/R}^{(2)} &= \chi_{xxx}^{(2)} E_x^2(\omega) + \chi_{xyy}^{(2)} (E_y^2(\omega) + E_z^2(\omega)) = \frac{E_0^2}{2} \cos^2 \psi (\chi_{xxx}^{(2)} - \chi_{xyy}^{(2)}), \\ \frac{1}{\epsilon_0} P_{y,L/R}^{(2)} &= 2\chi_{xyx}^{(2)} E_x(\omega) E_y(\omega) + 2\chi_{yzx}^{(2)} E_x(\omega) E_z(\omega) = E_0^2 \cos \psi (\pm i\chi_{xyx}^{(2)} + \sin \psi \chi_{yzx}^{(2)}), \\ \frac{1}{\epsilon_0} P_{z,L/R}^{(2)} &= 2\chi_{zxx}^{(2)} E_x(\omega) E_z(\omega) + 2\chi_{zxy}^{(2)} E_x(\omega) E_y(\omega) = E_0^2 \cos \psi (\sin \psi \chi_{zxy}^{(2)} \mp i\chi_{yzx}^{(2)}). \end{aligned} \quad (\text{II.20})$$

Il suffit maintenant de calculer le produit ${}^t T(0, \psi) \vec{P}_{(xyz)}^{(2)}$ pour obtenir les deux composantes qui nous intéressent P_X et P_Y dans le repère (XYZ) :

$$\begin{aligned} P_{X,L/R}^{(2)} &= \epsilon_0 \frac{E_0^2}{2} \cos \psi [(\chi_{xxx}^{(2)} - \chi_{xyy}^{(2)}) \cos^2 \psi + 2\chi_{yxy}^{(2)} \sin^2 \psi \mp 2i\chi_{yzx}^{(2)} \sin \psi], \\ P_{Y,L/R}^{(2)} &= \epsilon_0 \frac{E_0^2}{2} \cos \psi [2\chi_{yzx}^{(2)} \sin \psi \pm 2i\chi_{yxy}^{(2)}]. \end{aligned} \quad (\text{II.21})$$

La seule différence pour $P_X^{(2)}$ et $P_Y^{(2)}$ entre une excitation polarisée circulairement à droite ou à gauche réside dans le signe du terme portant le $2i$. Ainsi, si toutes les composantes tensorielles sont réelles (en particulier, si la composante chirale $\chi_{yzx}^{(2)}$ ne présente pas de déphasage avec les autres composantes achirales), il s'agit simplement du signe de la partie imaginaire et le passage au module carré annulera cette différence. L'intensité SHG détectée sera donc strictement identique quelque soit le sens de rotation de la polarisation incidente, et prendra la forme :

$$I^{2\omega} = K \frac{(I^\omega)^2}{4} \cos^2 \psi \{ |(\chi_{xxx}^{(2)} - \chi_{xyy}^{(2)}) \cos^2 \psi + 2\chi_{yxy}^{(2)} \sin^2 \psi|^2 + 4|\chi_{yxy}^{(2)}|^2 + 8|\chi_{yzx}^{(2)}|^2 \sin^2 \psi \}, \quad (\text{II.22})$$

Encore une fois, l'intensité SHG est proportionnelle à $(I^\omega)^2 \cos^2 \psi$ en première approximation.

Ce calcul met en évidence que pour détecter une différence entre les signaux obtenus avec deux polarisations incidentes RCP et LCP, c'est-à-dire pour mesurer un signal de CD-SHG, il est nécessaire que la composante chirale $\chi_{yzx}^{(2)}$ soit non nulle et qu'un déphasage existe entre les termes chiraux et achiraux du tenseur $\chi^{(2)}$. Cela implique en particulier de sortir des conditions de symétrie de Kleinman, et d'aborder des points théoriques qui dépassent le cadre de ce chapitre. Un calcul analytique complet du CD-SHG sera présenté lors de l'étude détaillée de cette technique au chapitre V, ce qui nous permet de centrer ce chapitre plus particulièrement sur la technique de P-SHG.

1.3 Informations extraites par P-SHG

1.3.1 Intensité moyenne

Lors de mesures en P-SHG, le volume focal est excité par un champ incident polarisé linéairement suivant une direction θ que l'on fait varier. Une première information disponible lors de ces mesures est l'intensité moyenne du signal de P-SHG : $I_{moy}^{2\omega} = K a_0(\psi) (I^\omega)^2 \cos^2(\psi)$, moyenne des $I^{2\omega}(\theta)$ sur toutes les orientations θ utilisées. Ce paramètre est similaire à l'intensité obtenue par microscopie SHG classique (avec une polarisation quasi-circulaire), et est principalement sensible à l'angle hors plan des structures ψ .

1.3.2 Orientation moyenne dans le plan

L'équation II.17, donnant l'intensité SHG en fonction de θ (direction de la polarisation linéaire incidente), montre l'influence de φ (orientation moyenne, dans le plan (XY) du laboratoire, des fibrilles contenues dans le volume d'excitation) sur le signal SHG : lorsque θ varie, le signal de SHG est modulé, et la phase de cette modulation est donnée par φ . La modulation a lieu sur chaque pixel de l'image, rendant possible l'extraction de φ à l'échelle de chaque volume de tissu sondé (chaque pixel). Ceci est le grand avantage de la P-SHG par rapport à des méthodes d'analyse d'images acquises en microscopie SHG conventionnelle qui requièrent généralement des structures orientées sur plusieurs pixels de long pour pouvoir extraire une orientation.

La P-SHG permet donc d'obtenir des cartes d'orientation φ de mêmes résolutions que les images SHG. On rappelle toutefois que, comme avec des méthodes d'analyse d'images, les angles obtenus correspondent aux orientations moyennes dans le plan et non pas au **sens** des fibrilles, autrement dit φ est extrait seulement modulo π . En effet, changer φ en $\varphi + \pi$ dans l'expression de $I^{2\omega}(\theta)$ (équation II.17) laisse l'intensité inchangée. Seule la microscopie SHG couplée à de l'interférométrie permet de retrouver la polarité des fibrilles (I-SHG, voir l'encadré II.2 et l'annexe B).

Une seconde ambiguïté peut résider lors de l'obtention de φ . Si nous changeons φ en $\varphi + \frac{\pi}{2}$ dans l'expression de $I^{2\omega}(\theta)$, nous inversons simplement le signe de $a_2(\psi)$. Selon le traitement des données utilisé pour extraire l'angle φ , en particulier si aucune condition n'est imposée sur le signe de $a_2(\psi)$, on risque alors de déterminer φ modulo $\frac{\pi}{2}$. Nous verrons plus loin dans le chapitre une façon simple de lever cette ambiguïté (section 3.2).

1.3.3 Paramètre d'anisotropie

Un troisième paramètre d'importance révélé par des mesures en P-SHG est le paramètre d'anisotropie. Ce paramètre, noté ρ , est défini par :

$$\rho = \sqrt{\frac{I^{2\omega}(\theta = \varphi)}{I^{2\omega}(\theta = \varphi + \frac{\pi}{2})}} = \sqrt{\frac{a_0(\psi) + a_2(\psi) + a_4(\psi)}{a_0(\psi) - a_2(\psi) + a_4(\psi)}} \quad (\text{II.23})$$

D'après les expressions des coefficients $a_0(\psi)$, $a_2(\psi)$ et $a_4(\psi)$, données en annexe A, ce paramètre

informations sur la structure moléculaire du collagène, à l'échelle de la triple hélice. En effet, le lien entre les composantes tensorielles d'une triple hélice et l'organisation des dipôles (liaisons peptidiques) qui la constituent (caractérisée par leur angle d'inclinaison ou *pitch angle* θ_e avec l'axe de l'hélice) a été donné en section 3.2.2 du chapitre I par l'équation I.19. En prenant le rapport des composantes, on trouve :

$$\rho = \frac{\chi_{\text{TH},xxx}^{(2)}}{\chi_{\text{TH},xyy}^{(2)}} = \frac{2}{\tan^2 \theta_e} \quad (\text{II.26})$$

Selon cette expression, la mesure de ρ est une indication directe de l'angle d'inclinaison des dipôles θ_e . La mesure de cet angle par P-SHG a d'ailleurs fait l'objet de nombreux travaux, sur du collagène mais aussi de la myosine ou de l'amidon [69, 72, 88, 89].

En pratique, l'équation II.26 est valide uniquement dans le cas où l'angle d'inclinaison θ_e est le même pour tous les dipôles. De plus, la relation entre ρ et la structure moléculaire peut se compliquer si l'on s'éloigne d'une géométrie simplifiée où toutes les fibrilles sont bien alignées dans le plan (XY) [90]. L'équation II.24 montre notamment que ρ est influencé par la polarité hors-plan moyenne des fibrilles et il tend vers 3 lorsque les fibrilles s'alignent perpendiculairement au plan de l'image. Dans les applications présentées dans la suite, nous ne regardons principalement que des échantillons "à plat", présentant très peu de structures hors du plan de l'image⁴, et pouvons alors considérer que la polarité hors-plan moyenne des fibrilles est nulle dans ces cas. Mais le milieu peut tout de même présenter du désordre inter-fibrillaire. Autrement dit, au lieu d'être toutes alignées parallèlement au plan (XY), les fibrilles contenues dans le volume focal présentent une dispersion d'orientations autour de leur axe principal (Fig. II.2). Un ancien doctorant de l'équipe, Ivan Gusachenko, a montré que la

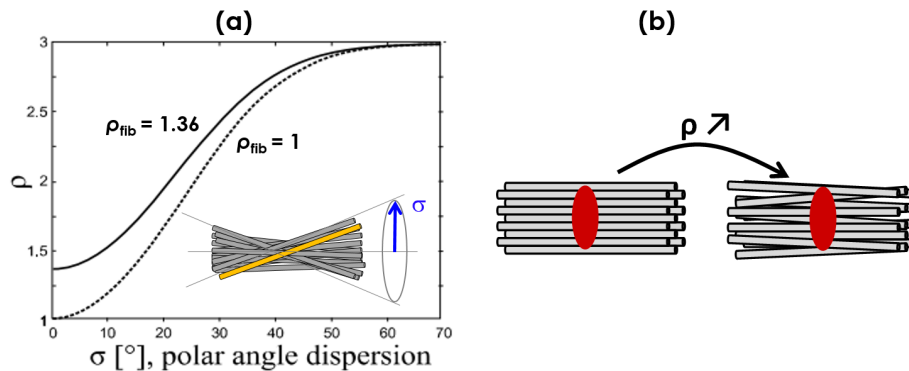


Figure II.2 – Effet de la dispersion d'orientations des fibrilles contenues dans le volume focal sur le paramètre d'anisotropie ρ . (a) Simulations d'Ivan Gusachenko donnant la valeur de ρ en fonction de σ , largeur de la distribution gaussienne d'orientations autour de l'axe x. (b) Représentation visuelle de l'augmentation de ρ dans un volume focal désordonné.

présence de désordre dans le milieu amplifiait le paramètre d'anisotropie [79]. Le calcul a été fait en considérant une distribution gaussienne d'orientations autour de l'axe x, de largeur σ : ρ augmente avec σ . Si le milieu conserve sa symétrie cylindrique, l'augmentation du désordre fait tendre ρ vers 3, comme l'augmentation de l'angle hors-plan.

Pour accéder à une mesure fiable de ρ_{fib} , il est alors nécessaire de maîtriser la géométrie de l'échantillon. C'est ce qui a été fait dans des travaux précédents de l'équipe : en utilisant un tendon à plat et bien tendu pour minimiser le désordre, Gusachenko et al. ont donné une mesure du paramètre d'anisotropie du collagène dans le tendon $\rho_{fib} = 1.36$ [79].

En résumé, le paramètre d'anisotropie ρ traduit principalement la structuration locale au sein du volume focal. Cette dernière peut être liée soit à la structure des triples hélices (variation du *pitch*

4. Mises à part des coupes transverses de cornées humaines, mais sur lesquelles nous filtrons ρ avec des critères spécifiques

Facteurs	Influences sur ρ
Structure moléculaire : orientation des dipôles non-linéaires θ_e	$\rho \searrow$ quand $\theta_e \nearrow$
Echelle sub-micrométrique : -dispersion angulaire des fibrilles σ -orientation hors-plan des fibrilles ψ	$\rho \nearrow$ quand $\sigma \searrow$ $\rho \nearrow$ quand $\psi \searrow$
Paramètres optiques linéaires du tissu : Biréfringence, diatténuation, diffusion	$\rho \searrow$ avec la profondeur d'imagerie (corrections possibles en <i>post-processing</i>)
Géométrie de la mesure : -forte focalisation -direction de détection	Perte de précision sur ρ ρ surestimé en <i>forward</i> , sous-estimé en <i>backward</i>

Tableau II.1 – Influence de différents facteurs sur la mesure du paramètre d'anisotropie ρ .

angle), soit à l'augmentation du désordre inter-fibrillaire (dispersion des orientations des fibrilles par rapport à leur axe principal).

Toutefois, d'autres facteurs peuvent également influencer la valeur de ρ , lorsqu'il est mesuré en régime fortement focalisé, dans des tissus épais et diffusant, potentiellement biréfringent et hétérogènes, qui peuvent déformer la polarisation [91, 92]. Les différents facteurs influençant le paramètre d'anisotropie ρ sont rassemblés dans le tableau II.1. Les deux premiers points permettent d'obtenir des informations sur le tissu à diverses échelles. En revanche, les deux points suivants doivent être maîtrisés lors des expériences pour assurer des mesures fiables, par exemple en utilisant toujours la même focalisation et la même géométrie de détection pour comparer deux échantillons, ou en corrigeant certains effets par traitement d'images.

Ce sont ces deux derniers points, étudiés en détail par les doctorants précédents au sein de l'équipe, qui expliquent notre approche théorique relativement simple par rapport à d'autres modèles plus élaborés, que ce soit dans l'expression du tenseur (pas de simplification $\chi_{yxy}^{(2)} = \chi_{xxy}^{(2)}$ par exemple [70, 72]) ou dans l'organisation moléculaire [74]. De plus, comme nous comparerons des tissus de même type et présentant des fibrilles essentiellement dans le plan de l'image, nous interpréterons les variations du paramètre d'anisotropie comme des indications de désorganisation locale.

2 Perfectionnement du système expérimental

2.1 Dispositif général

Sauf mention spécifique, toutes les expériences présentées dans cette thèse ont été effectuées sur le même microscope non-linéaire droit à balayage laser, permettant une imagerie multimodale SHG/2PEF. Son schéma de principe est représenté en figure II.3. Ce dispositif a été conçu au LOB par Emmanuel Beaurepaire. Des développements ultérieurs sur le programme de pilotage (LabVIEW, National Instruments) et sur le contrôle des polarisations ont ensuite été apportés spécifiquement par l'équipe.

Source La source d'excitation utilisée est un laser femtoseconde titane :saphir (Mai Tai DeepSee, Spectra-Physics) accordé à 860 nm, délivrant des impulsions courtes d'environ 100 fs avec un taux de répétition de 80 MHz. Les impulsions s'élargissant temporellement lorsqu'elles traversent les différentes optiques du système, un module de pré-compensation introduisant une dispersion négative choisie permet de corriger la largeur d'impulsion et d'obtenir les impulsions les plus courtes possibles au point focal (module DeepSee). En sortie de laser, la puissance moyenne accessible est d'environ 2.5 W, et la polarisation est linéaire.

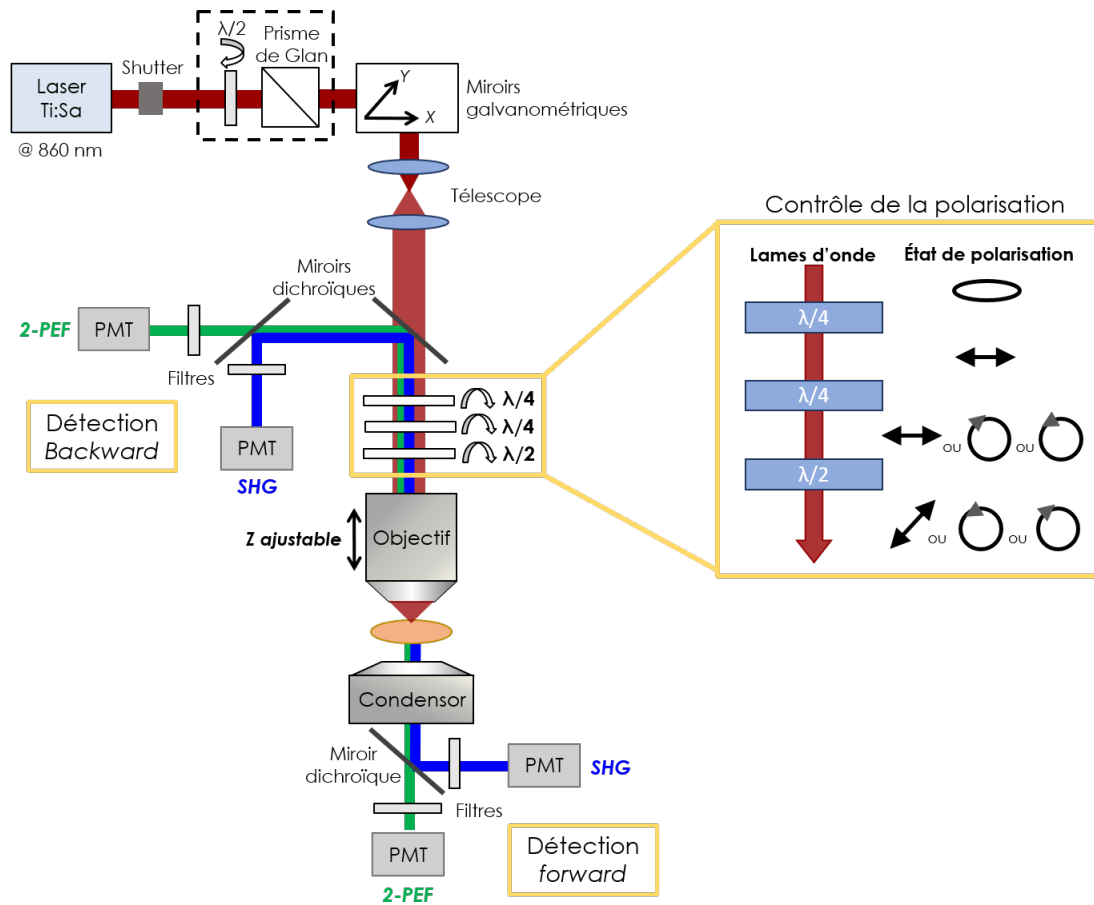


Figure II.3 – Dispositif expérimental.

Contrôle de la puissance Le contrôle de la puissance de la source s'effectue en sortie de laser à l'aide d'une lame demi-onde $\frac{\lambda}{2}$ achromatique, montée sur un servomoteur et couplée avec un prisme de Glan. Le prisme de Glan bloque par réflexion totale une polarisation parallèle à l'un de ses axes neutres, et transmet intégralement la polarisation orthogonale. La lame $\frac{\lambda}{2}$ tourne la polarisation incidente en amont du prisme, modulant ainsi la fraction de puissance transmise entre 0 et 100 % de la puissance moyenne maximale. La polarisation en aval du prisme est toujours linéaire.

Shutter Un obturateur mécanique se situe juste en sortie de laser et bloque le faisceau entre deux acquisitions, ce qui limite le temps d'exposition et réduit ainsi le photoblanchiment et les photodommages sur l'échantillon.

Trajet optique Après le module de contrôle de la puissance, le faisceau est réfléchi par des miroirs galvanométriques qui vont permettre le balayage latéral du volume d'excitation. Un système afocal (télescope) conjugue le plan des miroirs galvanométriques au plan de la pupille arrière de l'objectif tout en augmentant le diamètre du faisceau afin de couvrir l'intégralité de la pupille arrière. Juste en amont de la pupille arrière se situe un module comprenant 3 lames d'onde pour le contrôle de la polarisation incidente. Il sera détaillé en section 2.3. La focalisation de la source dans l'échantillon s'effectue ensuite au moyen d'un objectif à forte ouverture numérique, à immersion dans l'eau ou dans l'air selon les applications visées.

Balayage Au cours d'une acquisition, l'image est formée en balayant le volume d'excitation dans l'échantillon. Le balayage s'effectue en deux temps :

- Balayage latéral (dans le plan XY) grâce aux miroirs galvanométriques. La position du point focal dans le plan (XY) dépend de l'angle entre le faisceau incident et la normale au plan de

la pupille arrière : cet angle varie selon l'angle d'incidence du faisceau sur les miroirs galvanométriques, permettant un balayage latéral lorsque l'orientation des miroirs bouge. Ce balayage génère une image 2D à une certaine profondeur Z de l'échantillon.

- Balayage axial (en Z). Les objectifs utilisés ont des distances de travail (distances de focalisation) fixes, mais sont montés sur un moteur à courant continu, autorisant leur déplacement selon l'axe Z. Ainsi, différentes profondeurs d'imagerie peuvent être atteintes, ce qui permet d'obtenir des piles d'images 3D. La précision de pas en Z du moteur est d'environ 0.1 - 0.2 μm .

Voies de détection Les signaux émis par l'échantillon sont détectés dans deux directions : vers l'avant (détection *forward*) et vers l'arrière (détection *backward*). L'efficacité de détection des signaux SHG est plus importante vers l'avant, mais elle dépend de l'épaisseur et des propriétés de diffusion des échantillons.

- Détection *forward* : les signaux sont collectés par un condenseur de grande ouverture numérique placé au plus près de l'échantillon (U-AAC Olympus, NA 1.4).
- Détection *backward* : les signaux sont collectés par l'objectif de focalisation, et séparés du faisceau d'excitation par un miroir dichroïque réfléchissant toutes les longueurs d'onde en dessous de 695 nm (695DCXRU, Chroma).

Sur les deux voies de détection, un miroir dichroïque (FF458-Di01, Semrock) permet la séparation des signaux de SHG et de 2-PEF, en ne transmettant que les longueurs d'onde au dessus de 458 nm. En effet, la longueur d'onde des photons SHG est de 430 nm, inférieure à la longueur d'onde des photons 2-PEF (environ 500 nm), du fait du déplacement de Stokes. Puis, des filtres appropriés sont placés devant chaque détecteur, d'une part pour rejeter le faisceau d'excitation résiduel (filtres passe-bas FF01-680/SP and FF01-720/SP, Semrock, bloquant respectivement les longueurs d'ondes au-dessus de 680 nm et 720 nm), et d'autre part sélectionner plus finement les signaux de SHG (filtre interférentiel passe-bande FF01-427/10, Semrock, à 427 nm et de largeur spectrale 20 nm) et de 2-PEF (filtre coloré passe-haut GG455, Schott, bloquant les longueurs d'onde en dessous de 455 nm).

Détecteurs Afin d'être sensible aux phénomènes non linéaires rares que sont la SHG et la 2-PEF, des systèmes de détection fonctionnant en comptage de photons sont nécessaires. Nous utilisons des tubes photomultiplicateurs (PMT), sensibles sur une bande de 300 à 550 nm (P25PC, SensTech) donc pouvant détecter à la fois les signaux de SHG et de 2-PEF. Utilisés en mode de comptage de photons à une fréquence de 100 MHz, supérieure au taux de répétition du laser, ils peuvent détecter individuellement chaque photon par effet photoélectrique puis amplification, à condition de rester sous le seuil de saturation. Ce dernier est dépassé typiquement au delà d'un photon émis toutes les 5 impulsions laser.

2.2 Optimisation des résolutions et du champ de vue

2.2.1 Changement des optiques

Au cours de cette thèse, nous avons procédé à un changement des optiques du télescope, d'une part pour améliorer la qualité des lentilles utilisées et donc minimiser les aberrations optiques pour améliorer la résolution, et d'autre part pour optimiser le grandissement du télescope et donc augmenter le champ de vue du microscope. Nous avons vu précédemment que le télescope, placé entre les miroirs galvanométriques et la pupille arrière de l'objectif, agrandit le diamètre du faisceau pour couvrir parfaitement la pupille arrière de l'objectif, afin de tirer profit de l'intégralité de son ouverture numérique pour obtenir la meilleure résolution possible. Toutefois, plus le grandissement de ce télescope est important, plus le champ de vue est petit, et il est donc intéressant de minimiser ce grandissement.

En pratique, ce changement des optiques s'est traduit par la mise en place de deux télescopes, l'un en amont du système de balayage et l'autre entre les miroirs galvanométriques et l'objectif.

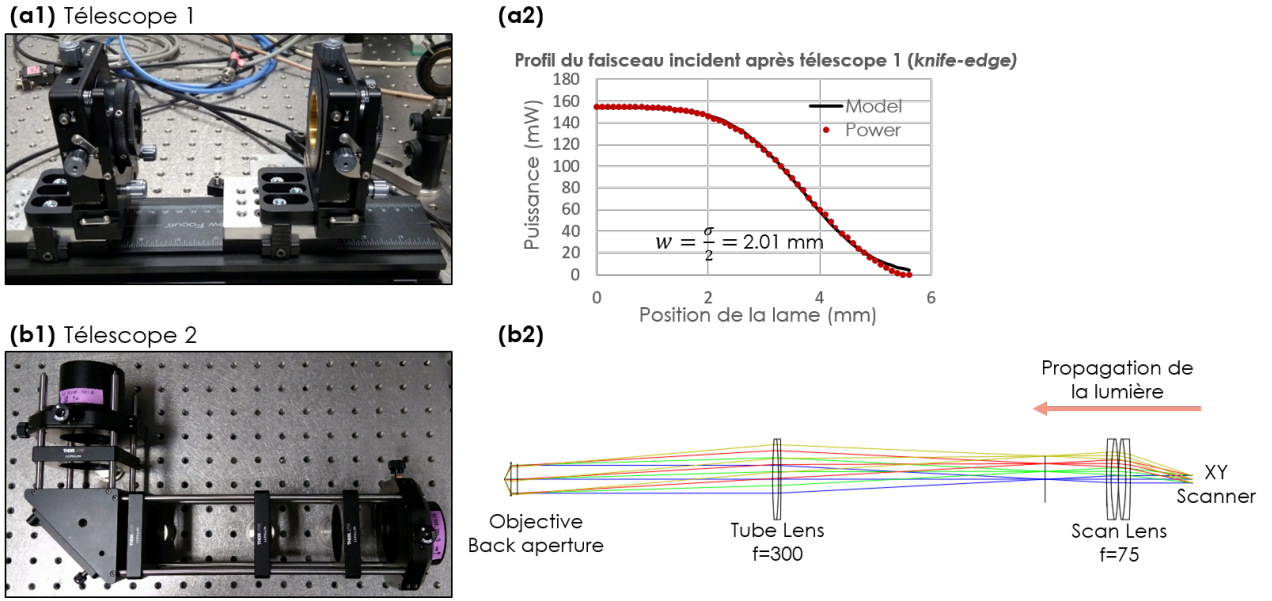


Figure II.4 – Mise en place de deux nouveaux télescopes. (a1) Télescope 1 doublant la largeur du faisceau avant l’injection dans le système de balayage. (a2) Profil du faisceau après le télescope 1 mesuré par la technique *knife-edge*, confirmant la largeur totale du faisceau de 4 mm. (b1) Télescope 2 placé entre les miroirs galvanométriques et la pupille arrière de l’objectif, de grandissement 4x. (b2) Tracé de rayon sur Zemax dans la configuration du télescope 2 optimisée.

Télescope 1 Les miroirs galvanométriques en place ont une largeur légèrement supérieure à 4 mm, et la pupille arrière de nos objectifs est d’environ 16 mm. Cela nous donne un grandissement minimal de 4, avec un faisceau de diamètre 4 mm sur les miroirs galvanométriques. Le faisceau en sortie de laser ayant un diamètre de 2 mm, nous avons dans un premier temps mis en place un nouveau télescope en amont du système de balayage (télescope 1), afin de doubler la taille du faisceau et atteindre une largeur de 4 mm sur les miroirs galvanométriques (Fig. II.4 (a1)). La taille du faisceau a été estimée par la méthode *knife-edge* : une lame de rasoir vient progressivement couper le faisceau laser latéralement (selon X), et la puissance du faisceau tronqué est mesurée après la lame en fonction de la position X de la lame [93]. Dans ce cas, la puissance mesurée est donnée par la fonction d’erreur :

$$P(x) = \frac{P_{max}}{2} \left[1 - \operatorname{erf} \left(\frac{\sqrt{2}(x - x_0)}{w} \right) \right] \quad (\text{II.27})$$

où P_{max} est la puissance maximale mesurée sans lame de rasoir, x_0 la position de lame qui commence à couper le faisceau, et w la demi-largeur du faisceau (rayon à $\frac{1}{e^2}$).

Les mesures de puissance ont été prises en déplaçant la lame tous les 0.1 mm sur 6 mm. L’ajustement de nos données selon l’équation II.27 a confirmé la taille souhaitée du faisceau après le télescope 1 : $w = 2.01$ mm soit une largeur totale de 4.02 mm (Fig. II.4 (a2)).

Télescope 2 Le second télescope, optimisé sur Zemax par l’ingénieur de recherche du laboratoire, Pierre Mahou (Fig. II.4 (b2)), a ensuite été mis en place entre les miroirs galvanométriques et la pupille arrière de l’objectif, agrandissant le faisceau jusqu’à 16 mm (Fig. II.4 (b1)). Nous avons utilisé pour la lentille de tube et la lentille de *scan* respectivement un doublet de distance focale 300 mm (AC508-300-B, Thorlabs) et un double doublet (deux doublets accolés) de focale totale 75 mm (AC508-150-B, Thorlabs). Cette optimisation de la lentille de *scan* (la plus proche des miroirs galvanométriques, donc soumise à des angles d’incidence plus importants) est cruciale pour réduire les aberrations, en particulier chromatiques et sphériques, et donc pour améliorer la résolution du microscope.

2.2.2 Caractérisation des résolutions et des champs de vue

Nous avons mesuré les résolutions avant et après optimisation du système, avec un objectif Olympus à immersion dans l'eau, de grandissement 25x et d'ouverture numérique 1.05, présentant une grande distance de travail (2 mm) (objectif XLPLN25XWMP2, Olympus). Ces mesures ont été effectuées sur des sondes nanométriques de SHG (cristaux de KTP de 150 nm), préparées suivant le protocole de Pierre Mahou récemment publié [94]. Les résultats sont comparés aux résolutions théoriques (FWHM de la PSF $I^2(\omega)$ au point focal) données par [51] :

$$\begin{aligned} \text{PSF}_{XY} &= \sqrt{2 \ln(2)} \frac{0.325\lambda}{\text{NA}^{0.91}}, \\ \text{PSF}_Z &= \sqrt{2 \ln(2)} \frac{0.532\lambda}{n - \sqrt{n^2 - \text{NA}^2}}, \end{aligned} \quad (\text{II.28})$$

avec n l'indice du milieu d'immersion de l'objectif, NA est l'ouverture numérique et λ la longueur d'onde. Dans la cas de l'objectif Olympus, ces paramètres valent respectivement $n=1.33$, $\text{NA}=1.05$ et $\lambda=860$ nm.

Nous voyons, dans le tableau II.2, que le changement d'optique a permis une amélioration des résolutions axiale et latérale, ainsi qu'une augmentation du champ de vue total. Cette amélioration, notamment de la résolution axiale, peut s'avérer déterminante pour résoudre des structures fines comme les lamelles de la cornée humaine d'épaisseur entre 1 et 3 μm . Toutefois, les nouvelles résolutions ne sont pas encore égales aux résolutions théoriques maximales atteignables, ce qui peut être lié à des aberrations sphériques résiduelles, ainsi qu'à une ouverture numérique effective de l'objectif légèrement inférieure à 1.05.

Olympus 25x NA 1.05	Théor.	Exp. avant optim.	Exp. après optim.
Résolution axiale (Z) (nm)	1050	1700 - 2100	1200 - 1400
Résolution latérale (XY) (nm)	315	440	356
Champ de vue total (μm)	-	380	540

Tableau II.2 – Résolutions axiales et latérales de l'objectif Olympus 25x à immersion dans l'eau ($\text{NA} = 1.05$) ainsi que le champ de vue total obtenu avant optimisation du système (2^e colonne) et après optimisation (3^e colonne). Les résolutions théoriques à 860 nm sont données en 1^{ère} colonne.

Sauf mention spécifique, toutes les études expérimentales présentées dans cette thèse ont été menées avec l'objectif 25x caractérisé par le tableau II.2, mise à part l'étude présentée en chapitre III, section 1, sur les parchemins. En effet, pour des applications en lien avec les sciences du patrimoine, les échantillons ne peuvent pas être étudiés avec un objectif à immersion dans l'eau, qui entraînerait leur altération, mais seulement avec des objectifs à air. L'objectif utilisé dans ce cas est un objectif à air Zeiss de grandissement 20x, ouverture numérique 0.8 et distance de travail 0.55 mm (objectif Plan-Apochromat 20x air, Zeiss). Cet objectif, comme tous les objectifs à air de qualité suffisante (corrigés des aberrations sphériques et chromatiques et présentant une grande ouverture numérique), est optimisé pour l'utilisation d'une lamelle de verre entre l'objectif et l'échantillon. Comme il n'est pas toujours possible (ni permis!) de contraindre l'objet précieux avec une lamelle de verre, nous avons développé un capuchon en résine fabriqué par impression 3D et s'ajustant parfaitement à la tête de notre objectif, sur l'extrémité duquel est fixée une lamelle de verre circulaire de 4 mm de diamètre (Fig. II.5). Les résolutions de cet objectif amélioré, mesurées sur des micro-billes fluorescentes de 100 nm de diamètre (Carboxylate-modified FluoSpheres beads, ThermoFisher Scientific), sont reproduites dans le tableau II.3 et comparées aux résolutions théoriques à 860 nm données par l'équation II.28. Elles ont été mesurées au moment où nous avons utilisé cet objectif (application aux parchemins, chapitre III, section 1), c'est-à-dire avant l'optimisation du système décrite précédemment.

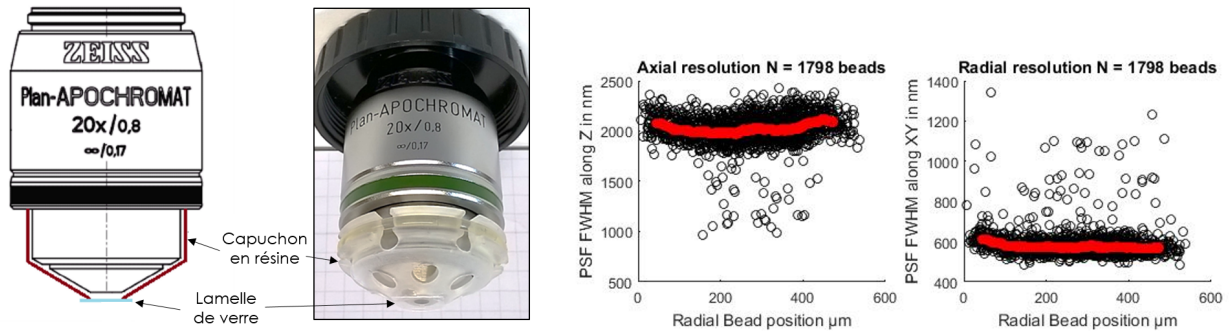


Figure II.5 – Amélioration frugale de l’objectif Zeiss 20x à air (NA = 0.8) par un capuchon en résine. En bas, les mesures de résolutions axiales (à gauche) et latérales (à droite) sont tracées en fonction de la distance au centre de l’image, et moyennées par la courbe rouge.

Zeiss 20x NA 0.8	Résolutions théoriques	Résolutions expérimentales
Résolution axiale (Z) (nm)	1350	2000
Résolution latérale (XY) (nm)	400	600
Champ de vue total (μm)	-	442

Tableau II.3 – Résolution axiale, résolution latérale, et champ de vue total obtenus avec l’objectif Zeiss 20x à air avec capuchon (NA = 0.8), avant optimisation du système. Les résolutions théoriques à 860 nm sont données en 1^{ère} colonne.

2.3 Réglages des polarisations

Un module de contrôle des polarisations incidentes est inséré en pupille arrière de l’objectif. Il est visible sur la partie droite du schéma en figure II.3. Il est composé de trois lames d’onde successives qui permettent de changer rapidement l’orientation du champ polarisé linéairement, ou de basculer rapidement d’une polarisation linéaire à une polarisation circulaire droite ou gauche. On rappelle que l’état de polarisation du laser est caractérisé en partie par son ellipticité, donnée par $e = \frac{E_{min}}{E_{max}}$. Cette ellipticité est maximale pour une polarisation circulaire ($E_{min} = E_{max}$) et minimale pour une polarisation linéaire. Nous l’exprimons ici en pourcentage, de 0 % pour une polarisation parfaitement linéaire à 100 % pour une polarisation parfaitement circulaire.

En sortie de laser, la polarisation est linéaire, mais elle va être déformée durant le trajet optique notamment par les miroirs galvanométriques et le miroir dichroïque. Elle est donc légèrement elliptique à l’entrée du module ($e \approx 10 - 20\%$). La première lame d’onde est une lame quart d’onde $\frac{\lambda}{4}$ qui permet de corriger cette ellipticité et rend à nouveau linéaire la polarisation ($e \approx 3\%$). Les deux autres lames sont utilisées selon des orientations différentes en fonction de la polarisation finale souhaitée.

Polarisation linéaire On place les axes neutres de la seconde lame quart d’onde sur l’axe de la polarisation linéaire incidente pour la garder linéaire. La lame demi-onde $\frac{\lambda}{2}$ permet ensuite de faire tourner cette polarisation linéaire dans le plan (XY). Nous réglons la position d’origine de la lame demi-onde de façon à ce que l’angle θ entre la polarisation linéaire et l’axe X du laboratoire soit nul. Pour cela, une lame fluorescente (Chroma) est imagée et les signaux détectés en *forward* sont séparés par un cube analyseur, réfléchissant uniquement la polarisation selon Y que l’on cherche à minimiser.

Polarisation circulaire Les axes de la seconde lame quart d’onde sont placés à 45° de la polarisation linéaire incidente pour la transformer en polarisation circulaire, droite ou gauche selon l’orientation de la lame. La convention utilisée pour définir le sens gauche ou droit de la polarisation circulaire est celle de Fowles [95] : lorsque l’on est face à la source (la lumière se dirige vers notre œil), une rotation du champ dans le sens horaire donne une polarisation circulaire droite, alors qu’une rotation dans

le sens anti-horaire donne une polarisation circulaire gauche. En pratique, il nous suffit de connaître deux axes :

1. l'axe de la polarisation linéaire incidente sur la seconde lame quart d'onde (direction obtenue après optimisation de la première lame quart d'onde),
2. l'axe lent de la seconde lame quart d'onde.

Notons ensuite γ l'angle orienté entre ces deux axes (1 vers 2). Si $\gamma = +45^\circ$ alors la polarisation après la seconde lame quart d'onde est circulaire gauche, et si $\gamma = -45^\circ$ on a une polarisation circulaire droite. Ce sens de rotation est ensuite inversé par la lame demi-onde placée juste après la seconde lame quart d'onde.

Calibration des polarisations Pour mesurer l'ellipticité de la polarisation incidente, un analyseur tournant motorisé (LPVIS100 et PRM1Z8, Thorlabs) est placé en pupille arrière de l'objectif et un puissance-mètre (Nova II, Ophir) mesure la puissance au foyer de l'objectif pour un angle α de l'analyseur variant de 0 à 180° avec des pas de 5° . La loi de Malus nous permet d'ajuster nos données de puissance mesurée en fonction de l'angle α de l'analyseur par la fonction :

$$P(\alpha) = P_{min} + (P_{max} - P_{min}) \cos^2 \left(\frac{\alpha - \alpha_0}{\pi} \right), \quad (\text{II.29})$$

où α_0 est l'angle de l'analyseur maximisant la puissance transmise, et P_{min} et P_{max} sont respectivement les puissances minimale et maximale transmises, qui nous permettent de calculer l'ellipticité $e = \sqrt{\frac{P_{min}}{P_{max}}}$.

Nous optimisons l'ellipticité obtenue par une procédure itérative d'ajustements de la position des lames et de mesures d'ellipticité. Cette calibration est effectuée au centre du champ de vue, et permet d'atteindre des ellipticités de 3 % pour les polarisations linéaires et supérieures à 98 % pour les polarisations circulaires gauche et droite. Les variations d'ellipticité sont assez faibles sur toute la zone centrale du champ de vue mais peuvent devenir plus critiques aux bords. Aussi, nous effectuons les mesures de P-SHG et de CD-SHG principalement sur des petits champs de vue.

Hystérésis Mécaniquement, les lames d'ondes sont superposées dans un support commun, et chacune est reliée à un servomoteur permettant de les contrôler séparément (Fig. II.6 (a)).

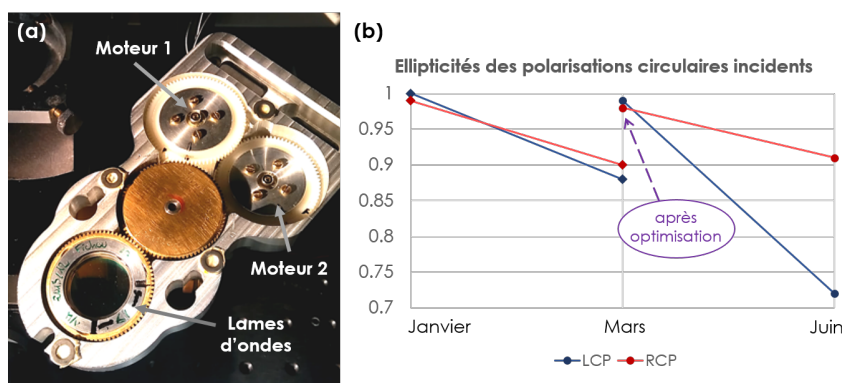


Figure II.6 – Support mécanique des lames d'ondes (a) et évolution des ellipticités au cours du temps (b).

Une instabilité des polarisations circulaires dans le temps a été constatée, faisant chuter l'ellipticité de 99 % juste après optimisation, à 72 % (dans le pire des cas pour LCP) au bout de 3 mois (Fig. II.6 (b)). La procédure de calibration étant assez longue, il n'est pas possible de régler la position des lames d'onde pour optimiser les polarisations avant chaque expérience, et de telles instabilités de polarisations ne sont pas acceptables pour les expériences de dichroïsme circulaire en SHG (l'importance de polarisations circulaires parfaites pour le CD-SHG sera détaillée en section 2). Le support de lames a donc été légèrement modifié pour inclure une épaisseur fine de teflon entre les lames, solidaire

du support, de façon à renforcer l'indépendance mécanique des lames et supprimer l'hystérésis due à l'entraînement d'une lame par le mouvement de l'autre. Après cela, nous n'avons plus observé de perte d'ellipticité.

3 Acquisition et traitement des données

Nous détaillons dans cette dernière section les protocoles d'acquisition et de traitement de données de SHG, P-SHG et CD-SHG. Les protocoles pour la SHG et la P-SHG étaient déjà en place au laboratoire, au début de ce travail de thèse. Toutefois, une étape de réécriture des programmes de traitement de données a été nécessaire afin de fusionner et d'harmoniser les contributions de plusieurs membres de l'équipe, d'adapter le filtrage des images et d'éviter l'obtention de valeurs artéfactuelles sur les paramètres de P-SHG⁵. Les procédures expérimentales et numériques pour le CD-SHG seront détaillées davantage dans le chapitre IV.

3.1 Principe des mesures

Avant toute acquisition, en SHG, P-SHG ou CD-SHG, plusieurs paramètres doivent être choisis :

- Puissance du laser.
Elle doit être suffisamment importante pour obtenir de l'échantillon un signal exploitable, mais ne doit pas induire de dommage à l'échantillon. En pratique, nous ne dépassons pas les 20 mW de puissance moyenne au foyer de l'objectif.
- Champ de vue et échantillonnage.
Les champs de vue totaux sont de 540 μm x 540 μm pour l'objectif 25x et de 442 μm x 442 μm pour l'objectif 20x. Lors de mesures en P-SHG ou en CD-SHG pour lesquelles l'état de polarisation doit être homogène dans tout le champ de vue, nous choisissons des champs de vue carrés plus petits (entre 50 et 200 μm). Le champ de vue est échantillonné au minimum avec 320 x 320 pixels. L'échantillonnage choisi dépend de l'application visée, mais donne typiquement une taille pixel entre 100 nm et 600 nm.
- Fréquence d'acquisition.
L'électronique d'acquisition intègre le nombre de photons détectés pour chaque pixel pendant un temps donné (temps d'exposition), que l'on choisit typiquement entre 5 et 20 μs . Cela correspond à une fréquence d'acquisition entre 50 et 200 kHz, qui présente un bon compromis entre le rapport signal sur bruit et la vitesse d'acquisition.

L'imagerie SHG conventionnelle est faite avec une polarisation circulaire de l'excitation, pour ne favoriser aucune orientation de structure dans l'échantillon (ellipticité e proche de 1, mais il n'est pas indispensable dans ce cas d'avoir un état de polarisation parfaitement circulaire). Le temps d'acquisition typique, pour une image 2D de 200 μm x 200 μm avec une taille pixel de 400 nm et un temps d'exposition par pixel de 5 μs , est d'environ 2 s. Ce temps est à multiplier par le nombre de plan d'imagerie en Z pour avoir le temps d'acquisition total d'une pile 3D d'images en microscopie SHG conventionnelle.

Les mesures de CD-SHG ou de P-SHG nécessitent l'acquisition de plusieurs images par plan 2D :

CD-SHG Deux images en intensité SHG sont acquises séquentiellement, la première en polarisation circulaire droite (RCP) et la seconde en polarisation circulaire gauche. L'ellipticité des polarisations est ici critique pour obtenir des résultats fiables (ceci sera détaillé en section 2 au chapitre IV). L'image en intensité moyenne $\frac{1}{2}(\text{LCP} + \text{RCP})$ et l'image différence ($\text{LCP} - \text{RCP}$) sont calculées sous ImageJ ou sous Matlab, et leur rapport donne l'image en CD-SHG. Une image de CD-SHG typique est donnée en figure II.7 (b).

5. Ces programmes ont permis un traitement plus robuste des données de l'article [96].

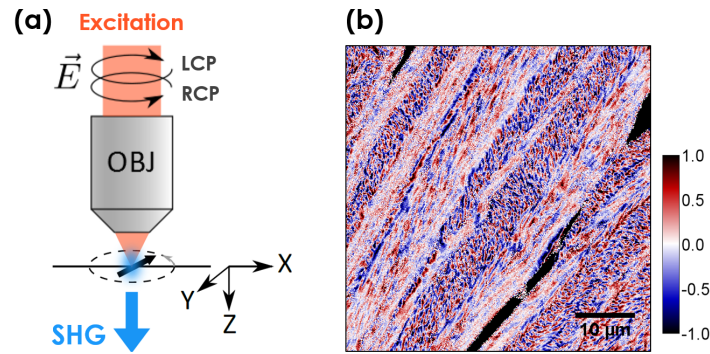


Figure II.7 – Principe des mesures de dichroïsme circulaire en SHG (CD-SHG). (a) Excitation avec un champ polarisé circulairement, à droite puis à gauche. (b) Image de CD-SHG typique obtenue sur une coupe transverse de cornée humaine.

P-SHG L'échantillon est excité par un champ incident polarisé linéairement dans le plan XY du laboratoire (plan de l'image), dont l'axe de polarisation linéaire forme un angle θ avec l'axe X du laboratoire. Nous faisons varier θ entre 0° et θ_{max} (généralement $\theta_{max} = 180^\circ$ ou 360°), avec des pas typiquement de 10° ou de 15° : une image en intensité SHG est acquise pour chaque angle θ , ce qui fait entre 18 et 36 images par plan 2D.

Nous pouvons alors tracer le diagramme angulaire⁶ de l'intensité SHG $I^{2\omega}(\theta)$ en fonction de la direction θ de la polarisation linéaire incidente : c'est la représentation polaire de la fonction donnée par l'équation II.17. Dans le cas du collagène, un diagramme typique est tracé en figure II.8 (b) : il présente deux minima et permet de visualiser l'orientation moyenne des fibrilles dans le plan de l'image φ (double flèche noire) ainsi que le paramètre d'anisotropie $\rho = \sqrt{\frac{I^{2\omega}(\varphi)}{I^{2\omega}(\varphi + \frac{\pi}{2})}}$.

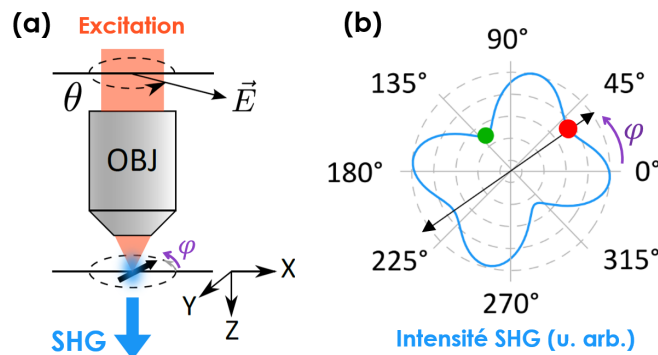


Figure II.8 – Principe des mesures résolues en polarisation linéaire (P-SHG). (a) Excitation avec un champ polarisé linéairement, orienté à différents angles θ . (b) Diagramme angulaire typique donnant $I^{2\omega}(\theta)$ et fonction de θ , dans le cas du collagène.

Ensuite, un programme Matlab permet d'extraire les 3 paramètres mentionnés en section 1.3 pour chaque pixel des images, ou pour chaque ensemble de pixels regroupés si l'on a *binné* nos images (moyenne du signal sur des carreaux de $n \times n$ pixels voisins pour gagner en précision aux dépens de la résolution). On détaille ci-dessous le traitement des données utilisé.

3.2 Extraction des paramètres P-SHG en *post-processing*

L'équation II.17 dérivée précédemment donne la forme théorique de l'intensité SHG $I^{2\omega}(\theta)$ obtenue pour chaque pixel en fonction de l'orientation θ de la polarisation linéaire incidente. Nous la noterons

6. Officieusement connu sous le pseudonyme de diagramme papillon.

comme suit pour plus de clarté :

$$I_{théo}^{2\omega}(\theta) = a_0 + a_2 \cos(2(\theta - \varphi)) + a_4 \cos(4(\theta - \varphi)). \quad (\text{II.30})$$

Notre but ici est d'extraire de manière robuste et relativement rapide, à partir de nos données expérimentales $I_{exp}^{2\omega}(X, Y, Z, \theta)$, les coefficients a_0, a_2, a_4 (pour le calcul du paramètre d'anisotropie ρ) ainsi que l'orientation moyenne φ , en chaque pixel (X, Y, Z) de la pile d'images à analyser. Pour cela, il est possible d'ajuster la fonction théorique à nos données expérimentales avec un algorithme d'ajustement itératif par la méthode des moindres carrés, mais cette opération à effectuer pour tous les pixels est très coûteuse en temps. Une méthode, utilisée par le groupe de D. Artigas à l'ICFO (Barcelone, Espagne) [97], a été mise en pratique au LOB par Claire Teulon, ancienne doctorante de l'équipe. Cette méthode repose sur l'utilisation de l'algorithme de transformée de Fourier rapide (FFT) pour calculer la transformée de Fourier discrète 1D de $I_{exp}^{2\omega}$, tirant profit de son expression théorique simple en somme de cosinus.

Le traitement des données d'une pile d'images 3D est effectué plan par plan. Dans la suite, nous nous fixons donc sur un plan Z et explicitons le traitement de nos données expérimentales pour un pixel (X, Y) appartenant à ce plan Z . Nous noterons donc plus simplement $I_{exp}^{2\omega}(X, Y, Z, \theta) = I_{exp}^{2\omega}(\theta)$.

3.2.1 Transformée de Fourier du signal

L'équation II.30 de l'intensité SHG théorique se réécrit à l'aide des formules d'Euler :

$$I_{théo}^{2\omega}(\theta) = a_0 + \frac{1}{2} \left(a_2 e^{2i(\theta-\varphi)} + a_4 e^{4i(\theta-\varphi)} + c.c. \right) = \alpha_0 + \alpha_2 e^{2i\theta} + \alpha_4 e^{4i\theta} + c.c., \quad (\text{II.31})$$

où α_0, α_2 et α_4 sont définis par :

$$\begin{aligned} \alpha_0 &= a_0 \\ \alpha_k &= \frac{1}{2} a_k e^{-ik\varphi_k} \quad (k = 2 \text{ ou } 4)^7. \end{aligned} \quad (\text{II.32})$$

Si notre signal expérimental suit bien la forme du signal théorique, chaque α_k défini par l'expression II.32 correspond à la composante de Fourier d'ordre k renvoyée par la transformée de Fourier discrète de $I_{exp}^{2\omega}(\theta)$. Nous calculons cette dernière sous Matlab par FFT 1D selon la dimension de θ ⁸. Puis, nous extrayons les trois composantes α_k^{TF} d'intérêt, d'ordre 0, 2 et 4 (correspondant respectivement aux fréquences angulaires nulle, $\frac{1}{\pi}$ et $\frac{2}{\pi}$).

Il suffit ensuite de prendre les modules des composantes de Fourier pour avoir accès aux coefficients a_0, a_2 et a_4 recherchés, à ceci près que l'on ne connaît pas encore le signe de ces coefficients. On peut donc seulement écrire :

$$\begin{aligned} a_0 &= \pm |\alpha_0^{\text{TF}}|, \\ a_2 &= \pm 2|\alpha_2^{\text{TF}}|, \\ a_4 &= \pm 2|\alpha_4^{\text{TF}}|. \end{aligned} \quad (\text{II.33})$$

Le coefficient a_0 correspond à la valeur moyenne du signal : il doit être positif par définition pour avoir un sens physique. On a ainsi accès à l'intensité SHG moyenne sur toutes les polarisations : $I_{moy}^{2\omega} = |\alpha_0^{\text{TF}}|$. Cela lève l'ambiguïté de signe sur le premier coefficient. Les signes des deux autres coefficients seront déterminés dans la section suivante, par des considérations sur les valeurs que peut prendre le paramètre d'anisotropie dans des tissus collagéniques.

Remarques sur la transformée de Fourier discrète.

Pour pouvoir prendre la transformée de Fourier discrète d'un signal échantillonné, il faut l'avoir mesuré sur un multiple entier de sa période. Dans notre cas, où le signal $I^{2\omega}$ est périodique de période π , cela correspond à le mesurer sur une plage d'angles θ de 180° ou de 360° . Un échantillonnage entre 0 et 180° est donc a priori

7. A priori $\varphi_2 = \varphi_4$.

8. Le calcul est matriciel et se fait sur tous les pixels (X, Y, Z) de la pile d'images d'un coup !

suffisant, mais nous avons constaté expérimentalement qu'il est moins robuste qu'un échantillonnage entre 0 et 360°, en particulier si l'échantillon génère un faible signal. Notons également que, si l'échantillonnage a été fait entre 0 et 180°, la transformée de Fourier discrète considère tout de même que l'échantillonnage a été effectué sur 2π . Il faut alors bien penser à extraire les composantes α_1^{TF} et α_2^{TF} à la place de α_2^{TF} et α_4^{TF} pour obtenir effectivement les harmoniques de fréquence angulaire respective $\frac{1}{\pi}$ et $\frac{2}{\pi}$.

3.2.2 Calcul du paramètre d'anisotropie

Dans le cas du collagène, les mesures du paramètre d'anisotropie donnent des valeurs inférieures à 3 [79, 81]. Cela nous renseigne alors sur le signe de a_4 : ce coefficient doit être négatif (le calcul a été fait dans [91] en exprimant a_4 en fonction de ρ).

Par ailleurs, comme nous avons vu en section 1.3.3, une ambiguïté réside sur l'angle φ si l'on n'impose pas le signe de a_2 , avec le risque d'extraire $\varphi + \frac{\pi}{2}$ à la place du vrai φ . Sur le diagramme angulaire représenté en figure II.8 (b), cela correspond à une rotation de 90° du "papillon" bleu, et donc à l'inversion des points rouge et vert. Ainsi, le paramètre d'anisotropie calculé dans ce cas vaut : $\rho_{90} = \frac{1}{\rho}$. Comme les mesures expérimentales du paramètre d'anisotropie donne $\rho > 1$, on a alors $\rho_{90} < 1$ et cela permet de distinguer le cas décalé et le cas exact. Plus précisément, la condition $\rho > 1$ permet d'imposer $a_2 \geq 0$ (voir l'expression de a_2 en fonction de ρ dans [91]).

Les équations II.33 peuvent alors être réécrites avec les signes déterminés :

$$\begin{aligned} a_0 &= |\alpha_0^{\text{TF}}|, \\ a_2 &= 2|\alpha_2^{\text{TF}}|, \\ a_4 &= -2|\alpha_4^{\text{TF}}|. \end{aligned} \quad (\text{II.34})$$

Nous sommes désormais en mesure de calculer le paramètre d'anisotropie, grâce aux modules des composantes de Fourier extraites :

$$\rho^2 = \frac{a_0 + a_2 + a_4}{a_0 - a_2 + a_4} = \frac{|\alpha_0^{\text{TF}}| + 2|\alpha_2^{\text{TF}}| - 2|\alpha_4^{\text{TF}}|}{|\alpha_0^{\text{TF}}| - 2|\alpha_2^{\text{TF}}| - 2|\alpha_4^{\text{TF}}|}. \quad (\text{II.35})$$

Expérimentalement, nous pouvons ponctuellement trouver des valeurs $\rho < 1$ ou $\rho > 3$: comme ces valeurs n'ont pas de sens physique pour le collagène, nous décidons de les exclure. Un paramètre d'anisotropie moyen est calculé pour chaque plan Z, sur les valeurs de ρ non exclues.

3.2.3 Calcul de l'orientation moyenne dans le plan

Obtention de φ^{TF}

La phase des composantes de Fourier extraites nous donne accès à une estimation de l'orientation moyenne dans le plan φ^{TF} . En effet, cet angle apparaît en tant que φ_2 dans la phase de α_2^{TF} et en tant que φ_4 dans la phase de α_4^{TF} . Plus précisément :

$$\begin{aligned} \varphi_2 &= -\frac{\arg(\alpha_2)}{2}, \\ \varphi_4 &= -\frac{\arg(\alpha_4) \pm \pi}{4}. \end{aligned} \quad (\text{II.36})$$

Le terme $\pm\pi$ introduit dans l'expression de φ_4 vient de la contrainte $a_4 \leq 0$.

Il a été montré par S. Brasselet et coll. que la précision optimale sur φ^{TF} est obtenue en utilisant une combinaison linéaire (moyenne pondérée) des deux angles φ_2 et φ_4 [98, 99] :

$$\varphi^{\text{TF}} = \eta\varphi_2 + (1 - \eta)\varphi_4, \quad (\text{II.37})$$

avec

$$\eta = \frac{|\alpha_2|^2}{|\alpha_2|^2 + 4|\alpha_4|^2}. \quad (\text{II.38})$$

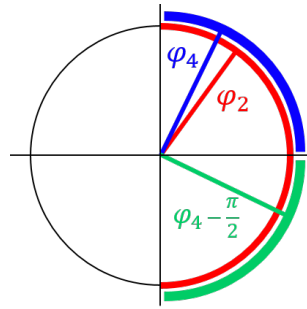


Figure II.9 – Domaine de définition des angles extraits. φ_2 est défini sur $] -\frac{\pi}{2}, \frac{\pi}{2}]$. Pour φ_4 , il y a ambiguïté ($\in] -\frac{\pi}{2}, \frac{\pi}{2}]$ ou $\in] -\frac{\pi}{2}, \frac{\pi}{2}]$) et seule la comparaison avec φ_2 permet de conclure.

Cette combinaison linéaire peut être effectuée à la condition que les deux angles soient définis sur le même intervalle. Or, d'après l'équation II.36, nous extrayons φ_2 modulo π et φ_4 modulo $\frac{\pi}{2}$. Autrement dit, φ_2 donne une orientation contenue dans le demi-cercle rouge tracé en figure II.9 alors que φ_4 peut se situer soit sur le quart de cercle vert soit sur le quart de cercle bleu. La bonne valeur de φ_4 modulo π est nécessairement l'une de ces 3 valeurs : φ_4 , $\varphi_4 + \frac{\pi}{2}$ ou $\varphi_4 - \frac{\pi}{2}$. Plus précisément, c'est celle qui minimise l'écart avec φ_2 .

Une fois que φ_2 et φ_4 sont correctement obtenus et définis sur le même intervalle, nous calculons leur moyenne pondérée donnée par l'équation II.37, et obtenons l'orientation moyenne dans le plan des fibrilles pour chaque pixel (X, Y) . On remarque bien que φ^{TF} est défini modulo π (en pratique, entre -90° et 90°) : c'est donc bien une orientation et non une polarité.

À cette étape, il se peut tout de même que φ^{TF} prenne une valeur hors des limites de l'intervalle $] -\frac{\pi}{2}, \frac{\pi}{2}]$. Nous ajoutons donc une étape de recalage pour, par exemple, renvoyer une valeur de 91° vers -89° .

Indice d'orientation et entropie

À partir de la connaissance de φ sur tous les pixels de l'image, nous pouvons calculer la **fréquence** d'occurrence $f(\varphi)$ de chaque orientation φ entre -90° et 90° , définie comme le rapport du nombre de pixels possédant l'orientation φ sur le nombre total de pixels de l'image. L'orientation φ_{max} qui maximise $f(\varphi)$ est appelée l'orientation principale dans le champ de vue. La fréquence d'occurrence de φ normalisée par la somme des fréquences de toutes les orientations est la **probabilité** d'occurrence de φ (probabilité pour des fibrilles au sein de l'image d'être alignées suivant φ) et est notée :

$$p(\varphi) = \frac{f(\varphi)}{\sum_{\phi=-90^\circ}^{90^\circ} f(\phi)}. \quad (\text{II.39})$$

Cela nous permet de définir deux paramètres qui quantifient le degré d'organisation du collagène à l'échelle de l'image : l'indice d'orientation OI et l'entropie S.

L'**indice d'orientation OI** indique le degré d'alignement suivant l'orientation principale φ_{max} , ou autrement dit la fraction de fibrilles parallèles à φ_{max} :

$$OI = \left[2 \left(\frac{\int_{\varphi=-90^\circ}^{90^\circ} f(\varphi) \cos^2(\varphi - \varphi_{\text{max}}) d\varphi}{\int_{\varphi=-90^\circ}^{90^\circ} f(\varphi) d\varphi} \right) - 1 \right] * 100. \quad (\text{II.40})$$

Dans le cas d'une distribution isotrope de fibrilles, $OI = 0 \%$. Dans le cas où toutes les fibrilles sont orientées suivant φ_{max} , $OI = 100 \%$.

L'entropie S permet de déterminer le degré d'organisation des fibrilles sans considérer d'orientation majoritaire. Elle est intéressante pour des distributions isotropes ou lorsqu'il existe plusieurs orientations significatives dans le tissu⁹. Sa définition est celle d'une entropie statistique :

$$S = -\frac{1}{N_\varphi} \sum_{\varphi=-90^\circ}^{90^\circ} p(\varphi) \ln(p(\varphi)), \quad (\text{II.41})$$

où N_φ est le nombre d'orientations φ considérées. L'entropie d'un échantillon isotrope ($p(\varphi) = \frac{1}{N_\varphi}$) vaut 1, et diminue pour un échantillon plus organisé (alignement des fibrilles suivant une ou plusieurs orientations particulières).

3.2.4 Critères de qualité

Le calcul de $I_{moy}^{2\omega}$, ρ et φ pour chaque pixel permet d'obtenir des cartes (X, Y) de ces 3 paramètres pour chaque Z , résolues à l'échelle du pixel. Un exemple typique de ces cartes est donné en figure II.10.

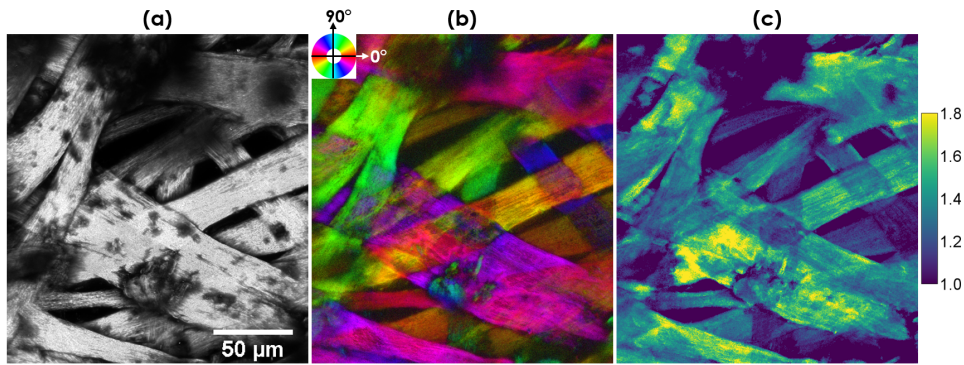


Figure II.10 – Cartes (X, Y) des 3 paramètres obtenues par mesures de P-SHG sur un parchemin. (a) Intensité moyenne $I_{moy}^{2\omega}$, (b) orientation moyenne dans le plan φ et (c) paramètre d'anisotropie ρ .

Toutefois, les pixels de ces cartes ne sont pas tous pertinents, et certains génèrent des valeurs de paramètres artificiels. C'est notamment le cas des pixels présentant un signal de SHG saturé ou confondu avec le bruit. Ainsi, pour chaque pixel (X, Y) , s'il existe au moins un θ pour lequel $I_{exp}^{2\omega}(X, Y, \theta)$ est supérieure au seuil de saturation ou inférieure au seuil de bruit, nous considérons ce pixel *invalidé*. Les seuils d'intensité sont fixés comme suit :

- Seuil de bruit : l'intensité minimale sous laquelle le bruit prédomine dans le signal est fixée à 1 photon détecté pendant le temps d'exposition.
- Seuil de saturation : empiriquement, les compteurs de photons saturent si plus d'un photon atteint les compteurs en l'espace de 5 impulsions laser. Le taux de répétition de notre laser est de 80 MHz, soit 800 tirs en 10 μ s. Si le temps d'exposition par pixel est fixé à 10 μ s, les compteurs saturent s'ils détectent plus de $800/5 = 160$ photons.

Le calcul des paramètres présenté dans les deux sections précédentes a été effectué sous l'hypothèse que nos données expérimentales suivent bien la forme théorique de $I_{théo}^{2\omega}$ en somme de cosinus. Il nous est possible *a posteriori* de vérifier cette hypothèse, en comparant pour chaque pixel (X, Y) nos données expérimentales $I_{exp}^{2\omega}(X, Y, \theta)$ avec la forme théorique en somme de cosinus pondérés par les coefficients FFT extraits sous Matlab :

$$I_{TF}^{2\omega}(X, Y, \theta) = |\alpha_0^{TF}| + 2|\alpha_2^{TF}| \cos(2(\theta - \varphi^{TF})) - 2|\alpha_4^{TF}| \cos(4(\theta - \varphi^{TF})). \quad (\text{II.42})$$

9. Par exemple, les deux orientations orthogonales des lamelles dans la cornée humaine !

Comme on le voit sur la figure II.11, nos données expérimentales représentées sous forme de diagramme angulaire (étoiles bleues) sont dans certains cas très proches de la courbe $I_{TF}^{2\omega}$ (Fig II.11 (a)) et dans d'autres cas assez éloignées (Fig II.11 (b) et (c)). Un écart important entre les deux courbes signifie que le signal SHG détecté sur le pixel considéré a été affecté par des facteurs extérieurs (déformation ou rotation trop importante des polarisations due à la diffusion dans les tissus par exemple, ou anomalie ponctuelle durant l'expérience) et il n'est pas pertinent de prendre en compte ce pixel. Pour quantifier l'écart, nous comparons les deux courbes par la méthode des moindres carrés et calculons le coefficient de détermination R^2 en chaque pixel :

$$R^2 = \max \left(0, 1 - \frac{\sum_{\theta} (I_{exp}^{2\omega}(\theta) - I_{TF}^{2\omega}(\theta))^2}{\sum_{\theta} (I_{exp}^{2\omega}(\theta) - I_{moy}^{2\omega})^2} \right) \quad (\text{II.43})$$

Si la courbe $I_{TF}^{2\omega}$ correspond parfaitement à la courbe expérimentale, $R^2 = 1$. Le coefficient R^2 diminue lorsque la cohérence entre les données expérimentales et la forme théorique est moins bonne. Généralement, nous considérons un pixel *valide* s'il respecte le critère de qualité $R^2 > 0.7$.

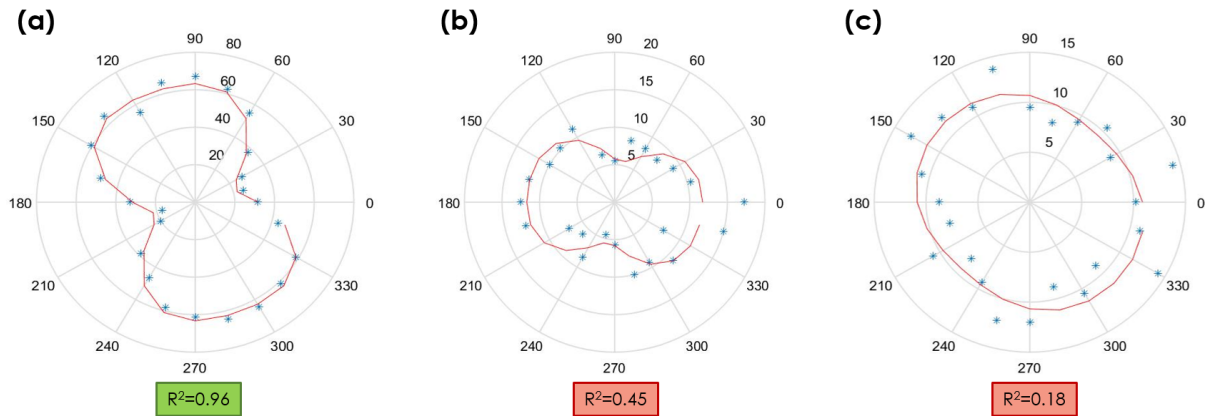


Figure II.11 – Diagrammes angulaires représentant les données expérimentales $I_{exp}^{2\omega}$ (étoiles bleues) et la courbe $I_{TF}^{2\omega}$ suivant la forme théorique de l'intensité SHG (trait plein rouge), en fonction de l'orientation θ de la polarisation linéaire incidente, pour 3 pixels différents d'une même image. Le coefficient de détermination R^2 est indiqué en dessous de chaque diagramme.

Avec ces 3 critères (bruit, saturation, R^2), nous ne gardons que des pixels (X,Y) présentant des résultats fiables, appelés *pixels valides*. Pour chaque plan Z, la moyenne du paramètre ρ , l'entropie S et l'indice d'orientation OI sont calculés uniquement sur ces pixels valides. Nous calculons également le pourcentage de pixels valides au sein de l'image (rapport entre le nombre de pixels valides et le nombre total de pixels sur l'image). Cela nous permet d'éliminer certains plans d'imagerie qui présentent trop peu de pixels valides, car il peut s'agir de plans hors de l'échantillon¹⁰ ou trop affectés par la diffusion. Le pourcentage de pixels valides minimal à considérer pour filtrer les plans Z dépend beaucoup de l'échantillon étudié et est ajusté empiriquement (typiquement entre 1 et 10 %).

Remarque :

Un modèle plus fin et plus complexe pour décrire les signaux de SHG (avec moins de symétries pour le tenseur par exemple) pourraient donner des informations plus complètes, à condition de mesurer des données "parfaites", i.e. qui s'ajustent bien au modèle. Toutefois, dans des tissus ou des matériaux complexes et diffusants, les données expérimentales n'atteignent pas toutes cette précision. Nous ne pouvons donc pas nous permettre de conserver seulement les données parfaites ($R^2 > 0.99$), non représentatives de l'ensemble de l'échantillon.

10. Juste au dessus de la surface de l'échantillon, on détecte déjà du signal de SHG, mais ce dernier n'est pas bien modulé et présentera un R^2 faible.

Conclusion

Finalement, le système expérimental du laboratoire présenté dans ce chapitre nous permet aussi bien d'effectuer des expériences de microscopie SHG conventionnelle que d'exploiter les modalités de P-SHG ou de CD-SHG. Les résolutions atteignables par le microscope ont été améliorées et des problèmes d'hystérésis sur les lames d'ondes ont été corrigés, de façon à réaliser ces expériences dans les meilleures conditions.

En particulier, la P-SHG est bien en place au LOB et a déjà été finement étudiée par les doctorants précédents de l'équipe [2, 42]. Les programmes de traitement de données sont désormais optimisés et nous pouvons nous atteler à appliquer cette technique à des diagnostics dans des tissus ou des matériaux. Deux applications originales, nous plongeant dans des univers aussi variés que le patrimoine et le biomédical, font l'objet du chapitre suivant.

On note toutefois une limitation de la P-SHG en terme de temps d'acquisition des données résolues en polarisation, trop important pour l'étude de phénomènes dynamiques : différentes stratégies ont été proposées pour dépasser cette limite [100, 101]. Des travaux ont notamment été conduits au laboratoire par G. Ducourthial pour développer une nouvelle méthode de P-SHG rapide, utilisant un modulateur électro-optique pour contrôler quasi-instantanément les polarisations de façon synchronisée avec le balayage en ligne de l'image [96]. Cela dit, les études en P-SHG présentées dans ce manuscrit ne portant pas sur des phénomènes dynamiques, elles ont été menées avec le système conventionnel de P-SHG, décrit dans ce chapitre.

Notre système offre aussi la possibilité de conduire des expériences de CD-SHG, dont le contraste encore méconnu pourrait apporter d'autres informations sur l'organisation du collagène. Cette modalité a commencé à être étudiée au LOB par C. Teulon en 2016, mais elle ne se prête pas encore à de véritables applications. Il faudra tout d'abord bien caractériser le signal expérimentalement, et comprendre l'origine de ce contraste : ce sera l'objet des chapitres IV et V.

Chapitre III

Applications de la microscopie SHG résolue en polarisation linéaire (P-SHG)

Trois Romances
Robert SCHUMANN

Nicht schnell. M. M. $\text{♩} = 100.$

The image shows a musical score for the first movement of 'Trois Romances' by Robert Schumann. The tempo is marked 'Nicht schnell.' with a metronome marking of 100 quarter notes per minute. The score is for Hoboe and Piano/Forte. The Hoboe part is in the treble clef, and the Piano/Forte part is in the grand staff (treble and bass clefs). The music is in 3/4 time and begins with a piano (p) dynamic. The Hoboe part features a melodic line with slurs and accents, while the Piano/Forte part provides harmonic support with chords and arpeggiated figures.

Sommaire

1	Évaluation quantitative de la dégradation du collagène dans les parchemins	59
1.1	Contexte bibliographique	59
1.2	Matériels et méthodes	61
1.3	Résultats	66
1.4	Discussions des résultats et perspectives de l'étude	74
2	Caractérisation de pathologies structurales de la cornée	79
2.1	Les pathologies structurales de la cornée	79
2.2	Caractérisations sur cornée humaine	81
2.3	Modèle murin de pathologie structurale cornéenne	85
2.4	Discussions sur l'outil et sur les modèles	96
	Conclusions et perspectives	98

La microscopie de second harmonique résolue en polarisation (P-SHG) a aujourd'hui dépassé les preuves de concept, et a été appliquée à plusieurs tissus. Cette modalité de la microscopie SHG va au-delà de l'imagerie, puisqu'elle donne accès à des informations quantitatives résolues à l'échelle du volume focal, comme l'orientation moyenne des fibrilles de collagène et un paramètre de désordre local sub-micrométrique. Au LOB, grâce à l'optimisation de notre système expérimental et de nos programmes de traitement de données spécifiques à cette modalité, et grâce aux travaux d'ancien-ne-s doctorant-e-s qui ont pris en compte les paramètres pouvant affecter les résultats [91, 92], nous pouvons

utiliser la P-SHG de manière systématique et robuste, ouvrant la voie à d'intéressantes applications de plus en plus complexes et dans des domaines variés.

Durant cette thèse, nous avons en particulier travaillé sur deux applications de la microscopie P-SHG, la première s'inscrivant dans le domaine du patrimoine, la seconde dans le domaine biomédical. Ces travaux ont été effectués dans le cadre de collaborations : avec le groupe de L. Robinet au CRC (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris) d'une part, et avec les groupes de U. Hansen à l'Université de Münster (Allemagne) et de V. Borderie à l'Institut de la Vision et l'hôpital des Quinze-Vingt (Paris) d'autre part. Ce chapitre est structuré en deux parties, chacune correspondant à l'une de ces études. Les deux sections peuvent donc être lues de manière indépendante.

La première problématique qui nous a intéressé-e-s concerne l'évaluation quantitative de la dégradation du collagène dans les parchemins. Pour caractériser l'état de conservation de tels objets précieux, des techniques non invasives sont nécessaires. Le parchemin étant issu de peau animale, la microscopie SHG apparaît comme une méthode pertinente pour visualiser très spécifiquement les fibres de parchemin, composées de collagène fibrillaire. Pourtant, si la microscopie optique non-linéaire est aujourd'hui largement utilisée en imagerie biomédicale, elle n'a été que très rarement appliquée au domaine du patrimoine. Dans la littérature, une seule étude (menée notamment au LOB) utilise la microscopie non-linéaire (SHG et 2-PEF) sur des parchemins préservés et dégradés [59]. Le travail présenté ici se place dans sa continuité, en montrant l'apport de la résolution en polarisation de l'excitation.

Dans un deuxième temps, retournant vers un tissu bien connu au laboratoire, la cornée, nous avons souhaité caractériser par P-SHG des pathologies ayant un impact sur la structure cornéenne, comme le kératocône. En effet, si la P-SHG s'est révélée pertinente pour mieux comprendre l'organisation de la cornée [81, 83], elle pourrait également aider la compréhension des mécanismes induisant de telles pathologies structurelles.

1 Évaluation quantitative de la dégradation du collagène dans les parchemins

En Europe occidentale, le parchemin a été le principal support d'écriture au Moyen Âge jusqu'à l'expansion de la production de papier aux XIV^e et XV^e siècles. Ce sont des parchemins historiques qui conservent (sous forme de manuscrits, de codices, de registres, etc.) presque l'intégralité de l'héritage intellectuel du monde occidental, du Moyen Âge à la Renaissance. L'importance d'une évaluation précise de l'état de détérioration du matériau (pouvant s'accompagner d'une dégradation des encres affectant la lisibilité) afin d'élaborer les stratégies les plus appropriées de conservation, d'exposition ou de restauration, n'est donc pas à démontrer. Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre (voir l'encadré I.1), un parchemin s'obtient à partir du derme d'une peau animale, trempé dans un bain de chaux puis raclé pour ôter les poils et les restes de chair, avant d'être séché sous tension. À l'issue de cette préparation, les deux faces du parchemin (face fleur et face chair, correspondant aux côtés de la peau animale orientés respectivement vers l'extérieur et vers l'intérieur du corps) peuvent être utilisées pour l'écriture. Toutefois les procédés de fabrication du parchemin ont une grande influence sur la structure du collagène qui devient moins stable [20] : il est alors d'autant plus sensible aux facteurs de dégradation (chaleur, hydrolyse, oxydation, etc.) pouvant conduire à une gélatinisation du matériau, stade ultime d'altération du collagène qui est dénaturé (voir section 1.2 du chapitre I). Macroscopiquement, le parchemin devient translucide, rigide et cassant, donc très difficilement lisible et extrêmement fragile. L'un des grands enjeux pour la conservation des parchemins est de réussir à identifier les stades de "pré-gélatinisation" du collagène afin de mettre en place des traitements adéquats et préventifs et de maintenir des conditions de conservation appropriées. Toutefois, la plupart des techniques conventionnelles utilisées pour étudier l'état des parchemins [102] sont destructives car elles nécessitent un prélèvement : mesures thermiques par DSC ou MHT [103, 104], microscopie électronique à balayage [103], chromatographie liquide [105], etc. Seules très peu de techniques, comme la spectroscopie Raman ou infrarouge [106, 107] ou encore la microscopie optique conventionnelle, ne présentent aucune invasivité. La microscopie non-linéaire, et en particulier la microscopie SHG, permettant de visualiser le collagène sans contact ni prélèvement, pourrait ainsi répondre au besoin d'outils non invasifs pour étudier la dégradation des parchemins et plus globalement celle de nombreux objets du patrimoine.

Dans un premier temps, nous détaillerons l'utilisation globale de la microscopie non-linéaire dans le patrimoine, puis son application aux parchemins récemment démontrée par Latour et al. en 2016 [59]. L'exposition de nos travaux sur parchemins par microscopie P-SHG se structurera ensuite en trois temps. Tout d'abord, nous présenterons les différents types d'échantillons étudiés (parchemins contemporains et anciens). Puis nous exposerons les résultats obtenus en P-SHG, avec pour certains échantillons la comparaison à une technique de référence. Enfin, ces résultats seront discutés dans une quatrième partie.

1.1 Contexte bibliographique

1.1.1 La microscopie non-linéaire dans le patrimoine

Depuis plusieurs années, les techniques de microscopie optique sont en plein essor dans le domaine du patrimoine. En effet, elles présentent un caractère non destructif ni même invasif, ce qui constitue un atout immense pour l'analyse d'objets d'art ou objets historiques, souvent précieux, uniques et fragiles. Outre des propriétés optiques riches (brillance, couleur), ces objets présentent des structures d'intérêt (épaisseurs de couches, morphologie, composés présents) de l'ordre du micromètre, ordre de grandeur de la résolution optique. Il est d'autant plus intéressant d'utiliser des technologies optiques qui dépassent l'observation 2D classique en microscopie conventionnelle : une observation 3D permet en effet d'obtenir une stratigraphie virtuelle des objets, et par exemple de distinguer des couches de pigments sur des peintures ou encore des couches de vernis sur des stradivarius [108, 109]. Actuellement, deux techniques optiques sont principalement utilisées pour le patrimoine : l'OCT et la microscopie

non-linéaire, dont les premiers travaux dans ce domaine ont été publiés il y a une quinzaine d'année (OCT en 2004-2005 [108, 110, 111] et microscopie NL en 2007-2008 [112, 113]). En microscopie non-linéaire du patrimoine, ce sont surtout les interactions à deux ou trois photons qui sont exploitées, dans une configuration standard de microscopie NL. On peut toutefois trouver des travaux ponctuels du groupe de Warren de Duke University qui utilisent une configuration pompe-sonde pour discriminer des pigments organiques et inorganiques dans des peintures de chevalet [114, 115].

Les premiers travaux en microscopie non-linéaire sur des objets du patrimoine ont permis de détecter en fluorescence des écritures peintes sur une amphore romaine du II^e siècle av. J.-C. [110]. Depuis, d'autres applications ont permis de révéler le potentiel de cette technique, notamment lié à la spécificité des signaux émis. Sur des peintures, la nature des pigments et des liants formant les couches picturales joue sur les signaux de fluorescence [109]. Il est ainsi possible de les distinguer en choisissant des propriétés d'excitation ou de détection adaptées. On détecte également des signaux de SHG spécifiques sur des composés picturaux présentant des structures cristallines non centrosymétriques, comme le sulfate de calcium héli-hydrate (bassanite) [109]. Des matériaux similaires sont trouvés dans les vernis, utilisés sur certains objets d'art comme les instruments de musique en bois, pour donner un aspect particulier au bois sous-jacent. La microscopie non-linéaire est donc capable de donner des informations sur les matériaux qui composent les vernis, mais également sur la structure du bois lui-même. En effet, les vernis étant relativement transparents, les cellules végétales sous-jacentes, dont les parois émettent à la fois de la fluorescence (lignine) et de la SHG (cellulose), sont facilement observables en microscopie NL. Cela permet de caractériser la structure du bois en profondeur, et de quantifier la présence de cellulose cristalline donnant au bois ses propriétés mécaniques [109]. Enfin, des travaux récents ont démontré la pertinence de l'utilisation de la microscopie non-linéaire, et en particulier de la microscopie SHG, pour étudier des matériaux issus de peaux animales (riches en collagène !), comme les cuirs ou les parchemins, très présents dans les archives et les collections historiques des bibliothèques en tant que couverture ou support d'écriture de manuscrits médiévaux [59, 116]. La section suivante expose les principaux résultats obtenus jusqu'à présent par microscopie SHG sur parchemins.

1.1.2 Application aux parchemins

L'application de la microscopie non-linéaire à des parchemins anciens est très récente (2016) et a été initiée au LOB par Gaël Latour, en collaboration avec le Centre de Recherche sur la Conservation (CRC, Muséum d'Histoire Naturelle, Paris) et avec le Laboratoire de Chimie Physique (LCP, Orsay) [59]. Nous détaillons ici quelques résultats de leur article.

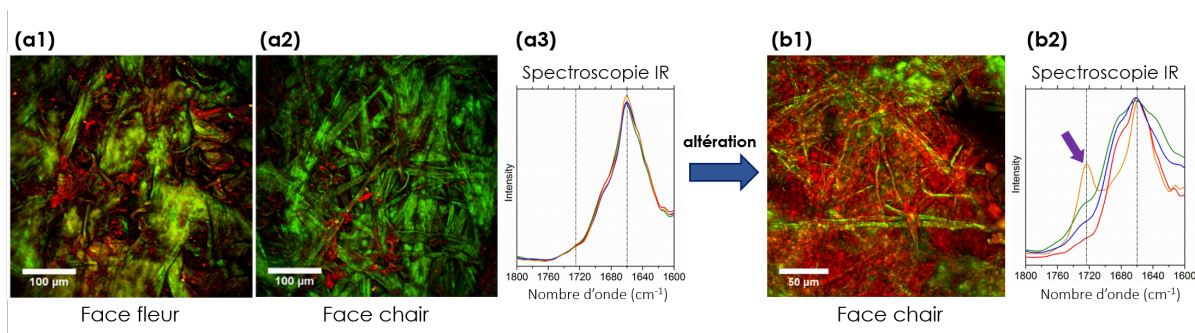


Figure III.1 – Étude corrélative en microscopie non-linéaire et nanoscopie infrarouge de parchemins. (a1-a3) Parchemin dans un bon état de conservation et (b1-b2) parchemin gélatinisé. (a1)(a2)(b1) Signaux de SHG (en vert) et de 2-PEF (en rouge). (a3)(b2) Spectres locaux d'absorption obtenus par nanoIR. La flèche violette indique la bande d'absorption carbonyle. Adapté de [59].

Dans un premier temps, un parchemin ancien mais dans un très bon état de conservation a été imagé par microscopie SHG et 2-PEF (Fig. III.1 (a1-a2)). Cette imagerie a démontré la pertinence de la microscopie SHG pour visualiser spécifiquement la morphologie du parchemin et l'agencement de ses fibres de collagène, qui présentent un fort signal de SHG, avec un contraste amélioré par rapport

à l'imagerie optique standard. Contrairement au cas de la peau non traitée, les fibres de parchemin sont alignées dans le plan de l'image, parallèlement à la surface, probablement à cause de la mise sous tension du parchemin lors de sa fabrication. Des caractéristiques structurales différentes ont été observées entre la face fleur (Fig. III.1 (a1)) et la face chair (Fig. III.1 (a2)) du parchemin. La face fleur, barrière contre les agressions extérieures, a une structure plus dense avec des fibres plus resserrées et présente des follicules pileux, tandis que les fibres face chair sont plus larges et étirées. Un faible signal de fluorescence, dispersé dans le réseau de fibres, a également été détecté en 2-PEF : il peut être dû à des résidus de kératine laissés par les poils de la face fleur, ou encore à des restes de graisse ou d'élastine. La présence de matière exogène accumulée sur le parchemin avec le temps peut également contribuer au signal de fluorescence.

Dans un second temps, une zone de ce même parchemin ancien a été prélevée puis dégradée artificiellement par immersion dans l'eau pendant deux jours dans un environnement assez chaud (30 - 35°C). À l'œil, ce fragment altéré est alors plus transparent et plus rigide, caractéristique de ce que les scientifiques du patrimoine appellent un parchemin gélatinisé. Son imagerie par microscopie non-linéaire met en évidence une perte de la structure fibrée au profit d'un matériau compact et amorphe. Un tel matériau présente moins d'interfaces qu'une structure en fibres et est donc moins diffusant, ce qui pourrait expliquer la transparençation du parchemin. Cela s'accompagne d'un changement radical des intensités de signal détectées : l'intensité SHG a fortement diminué et on constate l'apparition d'un signal dominant et homogène de fluorescence (Fig. III.1 (b1)). Nous avons vu au chapitre I, section 1.2, que le processus de gélatinisation conduit à une perte de la non-centrosymétrie du collagène : le signal de SHG ne peut plus se construire de manière efficace, et sa disparition était bien attendue sur ce fragment altéré.

Enfin, une analyse par nanoscopie infrarouge (nanoIR, spectroscopie infrarouge réalisée sous un microscope à force atomique (AFM) afin de bénéficier d'une résolution spatiale de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres pour la mesure des spectres d'absorption) a été effectuée sur des prélèvements des deux échantillons, préservé et altéré, afin de déterminer la nature chimique des modifications à l'échelle de la fibre de collagène (Fig. III.1 (a3)(b2)). Cela a permis de confirmer que la dégradation induite est bien associée à la formation de gélatine, car le matériau amorphe observé en microscopie présente une bande d'absorption carbonyle à environ 1720 cm^{-1} , caractéristique de la gélatine (information connue par des mesures sur collagène purifié fibrillé puis dénaturé en gélatine). Ces résultats ont été confirmés dans le même article, par analyse corrélative en microscopie NL et nanoscopie IR d'un fragment gélatinisé d'une carte maritime du XVII^e siècle dégradée à la suite d'une inondation.

Grâce à ces travaux, il est désormais connu qu'un parchemin préservé et un parchemin gélatinisé présentent des signaux caractéristiques en microscopie SHG et 2-PEF, spécifiques de leur état d'altération. Si cette étude démontre le haut potentiel de la microscopie non-linéaire pour caractériser ces deux états extrêmes, elle suscite également notre curiosité quant aux états intermédiaires de dégradation : est-il possible de détecter une altération intermédiaire, et en particulier les stades précoces de dégradation ? L'enjeu pour les conservateurs et les restaurateurs est en effet d'être en mesure de poser un diagnostic très tôt afin de prendre les meilleures décisions de conservation et de restauration. C'est dans ce sens que nos travaux, présentés ici, se sont orientés : le développement de mesures quantitatives pour sonder l'évolution de l'état de dégradation des parchemins, à partir de stades très précoces. La P-SHG, qui permet des mesures du désordre ou de la désorganisation à l'échelle locale du collagène, est apparue comme un outil prometteur.

1.2 Matériels et méthodes

1.2.1 Parchemins contemporains

Pour établir la pertinence de l'imagerie de parchemins en P-SHG, nous avons tout d'abord étudié des parchemins modèles contemporains fabriqués en 2002 à partir d'une peau de veau, fournis par le CRC (Centre de Recherche sur la Conservation, Muséum national d'Histoire naturelle). Ces parchemins sont issus d'un projet européen collaboratif, le projet IDAP (*Improved Damage Assessment of Parchments*)

[27], au cours duquel les chercheurs les ont soumis à des dégradations artificielles suivant un protocole imitant les altérations naturelles liées à l'âge : ils ont été chauffés de manière homogène dans un four à 100°, durant des temps d'exposition plus ou moins longs, pouvant aller jusqu'à 122 jours d'exposition. Pour notre étude, des extraits carrés de 6.5 cm x 6.5 cm ont été prélevés de quelques-uns de ces parchemins modèles. La liste exhaustive des échantillons étudiés, avec leur temps d'exposition, est donnée par le tableau III.1. L'aspect visuel de quelques-uns de ces parchemins peut être observé sur la figure III.2. Chaque parchemin a été étudié recto verso, c'est-à-dire à la fois sur la face chair et sur la face fleur. L'identification visuelle des faces est assez immédiate pour ces parchemins, les follicules pileux présents face fleur étant la plupart du temps visibles à l'œil sous forme de points noirs.

Nom du fragment	Temps d'exposition à la chaleur (100°)
pRef1	0 jour (référence)
pRef2	0 jour (référence)
p2	2 jours
p4	4 jours
p16	16 jours
p40	40 jours
p80	80 jours
p122	122 jours

Tableau III.1 – Liste des parchemins étudiés, issus du projet IDAP. La colonne de droite indique la dégradation artificielle subie par chaque échantillon.

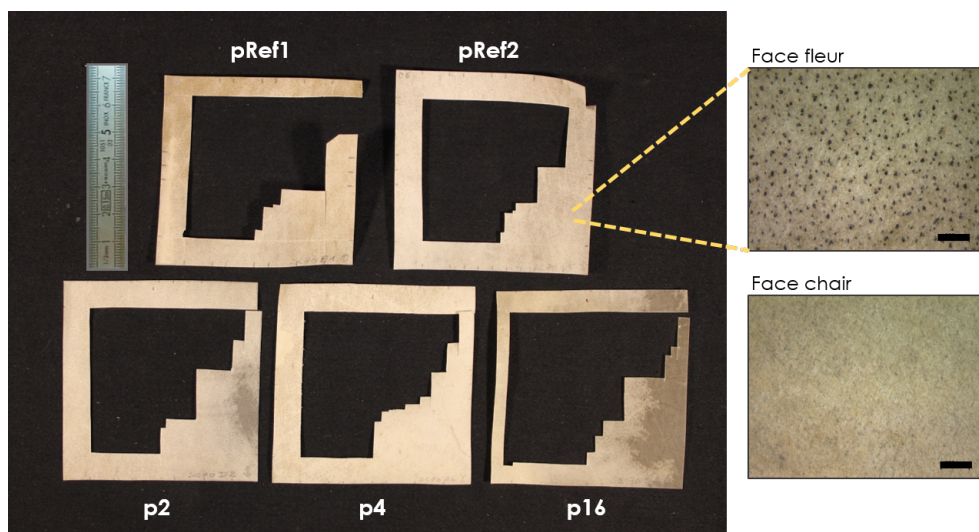


Figure III.2 – Faces fleurs des 5 premiers parchemins étudiés, issus du projet IDAP (exposition à la chaleur entre 0 et 16 jours), et photographie avec loupe optique du parchemin pRef2, côté fleur (présence de follicules pileux) et côté chair. Barre d'échelle 1 mm.

1.2.2 Parchemins historiques

Pour compléter notre étude, des feuillets de manuscrits historiques issus de la médiathèque de Chartres, L'Apostrophe, ont également été analysés en P-SHG. Ce travail s'inscrit au sein du projet REMAC (*À la Recherche des Manuscrits de Chartres*), débuté en 2017 et porté par le CRC en partenariat avec le LOB, le DYPAC (Dynamiques Patrimoines et Culturelles) et l'IRHT (Institut de Recherche et d'Histoire des Textes). Ce projet associe historiens, physiciens et physico-chimistes, et vise à faire *reparler* les manuscrits brûlés de Chartres, c'est-à-dire à révéler les textes de certains manuscrits actuellement inexploitable par les historiens. Les travaux des collègues du CRC ont été

publiés : ils permettent aujourd’hui à la médiathèque de Chartres d’avoir un protocole de numérisation sous lumière UV qui révèle certaines écritures [117]. La participation du LOB visait, quant à elle, à évaluer l’état de conservation du support, donc du parchemin proprement dit. Nos travaux ont conduit à deux publications [118, 119].

La Bibliothèque municipale de Chartres contenait une prestigieuse collection d’environ 500 manuscrits médiévaux d’une grande importance culturelle. Elle constituait notamment un témoignage exceptionnel du chapitre de la cathédrale Notre-Dame ou encore des Écoles de Chartres, dont l’influence intellectuelle au Moyen Âge a été considérable sur tout l’Occident chrétien. En 1944, à la suite d’un bombardement américain, plus de la moitié des parchemins est détruite ou endommagée par un incendie qui a ravagé l’hôtel Montescot, abritant à l’époque la bibliothèque, puis par l’eau utilisée pour tenter de contenir les flammes (les photographies en noir et blanc de la figure III.3 illustrent les dégâts). 60 % du fonds est irrémédiablement perdu, le reste est touché de manière plus ou moins sévère. Une opération de sauvetage est immédiatement lancée à la Bibliothèque nationale de Paris où les vestiges sont acheminés et les feuillets de parchemins agglutinés par l’action de la chaleur et de l’eau sont séparés par des techniques chimiques. Toutefois, les manuscrits portent encore la marque de l’incendie et se trouvent dans des états de dégradation plus ou moins prononcés (Fig. III.3). En 2005, débute une nouvelle campagne de restauration au centre technique de la BnF à Bussy-Saint-Georges dans le but de rendre à nouveau lisibles des manuscrits subsistants dont les écrits sont visibles mais indéchiffrables du fait des plis et du rétrécissement des feuillets sous l’effet de la chaleur. Ces parchemins suivent un protocole de relaxation : ils sont réhydratés en chambre d’humidification pour retrouver leur souplesse avant d’être nettoyés, aplanis et mis sous tension de façon à faire disparaître les plis.

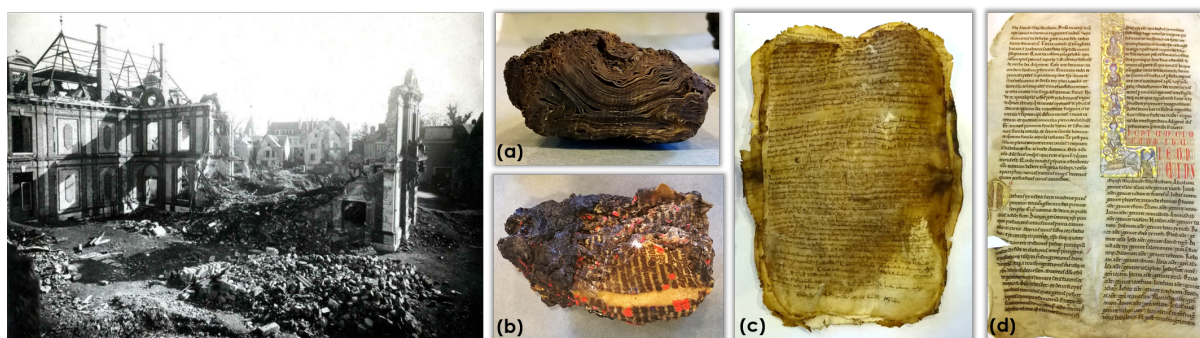


Figure III.3 – Hôtel Montescot bombardée à Chartres le 26 mai 1944 et sauvetage des manuscrits calcinés. Les manuscrits subsistent dans des états variables : (a) et (b) Blocs de parchemin carbonisé, (c) Parchemin du XIV^e siècle en partie gélatinisé sous l’action simultanée de la chaleur de l’incendie et de l’eau. Il s’est transpirisé et est par conséquent indéchiffrable. (d) Bible latine restaurée par relaxation au centre technique de la BnF à Bussy-Saint-Georges : elle est désormais lisible.

Le corpus de manuscrits chartains étudié dans ce travail est présenté en figure III.4. Il se compose de trois feuillets du manuscrit endommagé Ms.205, *Recueil d’œuvres théologiques et spirituelles de l’époque romane*, datant du XIII^e siècle, ainsi que d’un feuillet de la liasse 451, qui n’a pas encore été identifiée par les historiens. Le feuillet 301 du manuscrit Ms.205, contrairement aux trois autres feuillets étudiés, a été restauré durant la campagne au centre technique de la BnF à Bussy-Saint-Georges. En plus de ces feuillets entiers, nous avons pu récupérer des petits fragments résiduels de parchemins chartains, détachés de liasses ou de manuscrits fragilisés par la dégradation et devenus rigides et cassants. Ces petits fragments, visibles en figure III.5, ne sont donc pas précieux contrairement aux feuillets entiers, nous donnant plus de liberté dans les mesures. Comme pour les parchemins IDAP, nous avons imagé ces feuillets et ces fragments recto verso. Les follicules pileux n’étant cette fois pas visibles à l’œil nu, les faces fleur et chair ont été reconnus *a posteriori* à partir de nos images, chaque face présentant des structures caractéristiques en fibres plus ou moins denses.

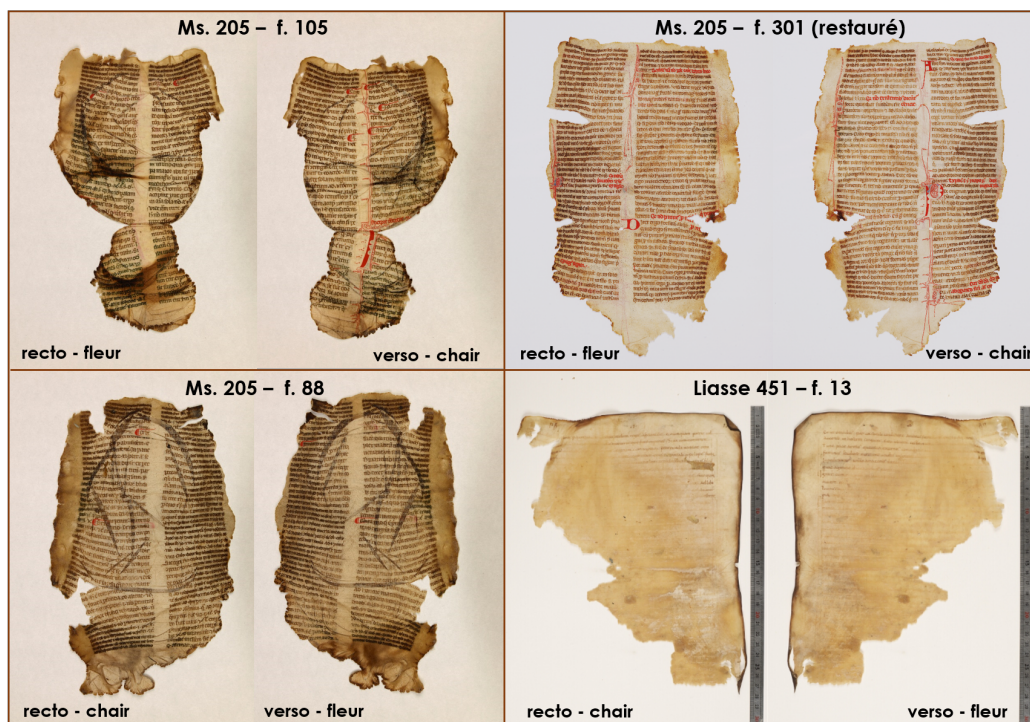


Figure III.4 – Feuilletts entiers de Chartres analysé durant ce travail. Ils sont référencés par leur numéro de manuscrit ou de liasse d’origine ainsi que par un numéro de feuillet.

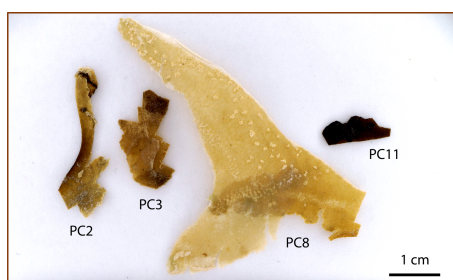


Figure III.5 – Fragments de parchemins chartreux étudiés, détachés de leurs feuillets d’origine à cause de la fragilité des manuscrits de Chartres subsistants. Leurs parchemins d’origine ne sont pas identifiés.

1.2.3 Méthodes

Microscopie non-linéaire

L’imagerie de tous les parchemins s’est faite avec l’objectif à air Zeiss (20x, NA 0.8) décrit en section 2.2.2 du chapitre II. Le capuchon a été ajouté à l’objectif pour la quasi-totalité des mesures sauf celles sur les feuillets entiers de Chartres, pour ne pas risquer d’endommager ces objets précieux avec la lamelle en verre. Pour imager les parchemins IDAP et les fragments chartreux, nous avons construit un porte-échantillon spécifique pour garantir leur planéité sur toute la surface. Une ouverture a été faite au milieu de la plateforme pour permettre la détection simultanée des signaux vers l’avant (forward) et vers l’arrière (backward). Toutefois, les résultats issus des signaux forward sont moins pertinents, car ils dépendent de l’épaisseur et des propriétés optiques variables des parchemins étudiés. De plus, la détection backward est la seule configuration compatible avec les objets entiers du patrimoine, qu’il s’agisse de parchemins non-transparents ou encore de livres ou manuscrits épais. Les feuillets entiers de Chartres ont ainsi nécessité un espace important sous le microscope pour pouvoir être imagés sans contrainte. Il a donc fallu démonter notre système de détection forward, pour intégrer un large plateau sur lequel étaient déposés les parchemins (Fig. III.6). De ce fait, seuls les signaux vers l’arrière ont pu être collectés. Nous ne présentons donc ici que des résultats obtenus en détection backward.

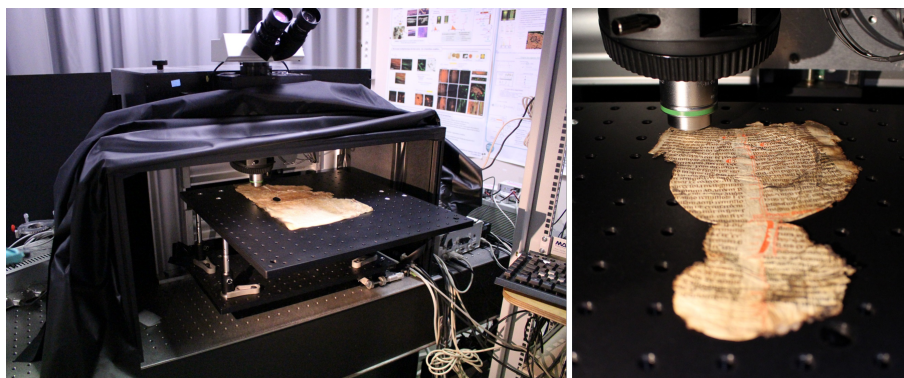


Figure III.6 – Adaptation du microscope pour accueillir des parchemins précieux. Il est possible de descendre la grande plateforme noire, pour l'imagerie d'objets plus encombrants.

Pour chaque face du parchemin (fleur et chair), nous acquérons une pile d'images avec un grand champ de vue ($442\ \mu\text{m} \times 442\ \mu\text{m}$) et une polarisation incidente quasi-circulaire, puis 4 ou 5 piles d'images P-SHG (mesures en polarisations incidentes linéaires variant par pas de 10° de 0° à 170° pour les parchemins IDAP et de 0° à 360° pour les parchemins de Chartres) avec un plus petit champ de vue ($207\ \mu\text{m} \times 207\ \mu\text{m}$). La taille pixel est de $0.46\ \mu\text{m}$, et le temps d'exposition par pixel de $5\ \mu\text{s}$ ($200\ \text{kHz}$). Dans notre cas, cela correspond à environ 1 image par seconde pour les petits champs de vue et à 1 image toutes les 4.6 secondes pour les larges champs de vue. Les données sont acquises en 3D (pile d'images) en translatant axialement l'objectif tous les $1\ \mu\text{m}$, sur une épaisseur de parchemin variable d'un échantillon à l'autre, entre 15 et $100\ \mu\text{m}$. La puissance laser au focus est comprise entre 5 et $10\ \text{mW}$ et aucun dommage n'a été observé sur les échantillons durant les mesures.

Mesures calorimétriques

Par ailleurs, des échantillons de quelques millimètres carrés ($0.5\ \text{mg}$ à $1\ \text{mg}$) ont été prélevés sur les parchemins IDAP et sur les fragments de parchemins de Chartres afin de mesurer leur température de dénaturation par calorimétrie différentielle à balayage (référéncée en tant que DSC, *differential scanning calorimetry*). La température de dénaturation (T_d) est la température à laquelle il faut porter l'échantillon étudié pour que son collagène se dénature et se transforme en gélatine (voir section 1.2 du chapitre I) : c'est un indicateur de l'état de conservation. La DSC est une technique de référence dans le domaine du patrimoine pour déterminer l'état de dégradation des matériaux collagéniques, mais c'est une technique destructive puisqu'elle nécessite un prélèvement, qui est ensuite dénaturé [103, 120, 121]. De fait, certains objets précieux ne peuvent pas se soumettre à ces mesures invasives : en particulier, les analyses DSC n'ont pas été effectuées sur les feuillets des manuscrits de Chartres.

La technique standard d'analyse DSC est la mesure à partir d'un échantillon saturé en eau : chaque prélèvement est trempé dans $500\ \mu\text{L}$ d'eau ultra-pure pendant 1h, avant d'être encapsulé dans des capsules d'aluminium de $30\ \mu\text{L}$ supportant jusqu'à 3 bars de pression. La capsule est ensuite placée dans une chambre chauffante (appareil utilisé : DSC 8000 Perkin Elmer) et des mesures sont prises à chaque incrémentation de température ($+10^\circ\text{C}$ toutes les minutes, de 20°C à 160°C). À partir d'une certaine hausse de température, le collagène de l'échantillon étudié commence à se dénaturer. La dénaturation du collagène en gélatine est une réaction endothermique qui se caractérise en DSC par un échange de chaleur plus important entre la référence de l'appareil et l'échantillon étudié. Le thermogramme DSC (courbe représentant l'échange de chaleur en fonction de la température de la chambre, dont un exemple est montré en figure III.7) présente alors un pic endothermique caractéristique : la température mesurée au pied de ce pic est la température de dénaturation T_d du collagène dans l'échantillon, et l'aire sous le pic correspond à l'enthalpie ΔH de la réaction, c'est-à-dire l'énergie mise en jeu lors de la dénaturation du collagène indiquant la quantité de collagène encore intacte avant dénaturation.

Plus le collagène est bien préservé dans l'échantillon, plus l'énergie qu'il est nécessaire d'apporter pour le dénaturer est importante, autrement dit plus sa dénaturation a lieu à des hautes températures.

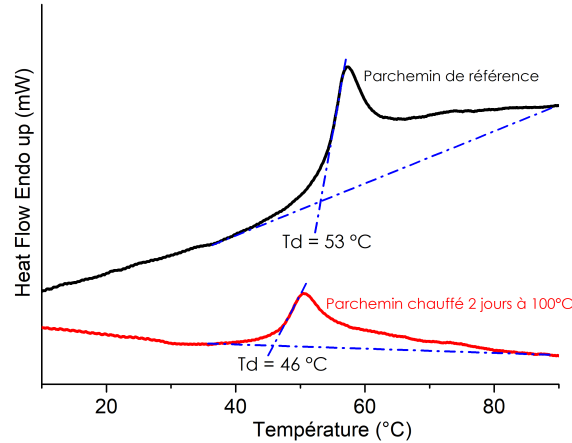


Figure III.7 – Thermogramme typique obtenu lors de mesures DSC. Il représente l'échange de chaleur entre la référence de l'appareil et l'échantillon étudié en fonction de la température de la chambre, que l'on incrémente au cours des mesures. La température de dénaturation T_d est l'abscisse du point d'intersection entre la ligne de base et la plus forte tangente de la 1^e partie du pic. L'enthalpie ΔH est la surface du pic (aire sous le pic et au-dessus de la ligne de base).

Ainsi, lors de mesures en DSC standard (saturées en eau), un parchemin neuf a une température de dénaturation autour de 55 - 60°C quand un parchemin dégradé peut voir sa température de dénaturation descendre en dessous de 30°C. On remarque alors que si un parchemin est très dégradé, sa température de dénaturation dans l'eau s'approche de la température ambiante du laboratoire, et la simple préparation de l'échantillon en milieu humide suffit à dénaturer le collagène : dans ces cas, aucun pic n'apparaît sur les thermogrammes, la dénaturation ayant déjà eu lieu, et la mesure DSC n'est pas possible.

Pour contourner ce problème, les préparations des échantillons dans l'eau ont été faites à basse température, dans des espaces réfrigérés (5°C). De plus, nos collègues du CRC ont mis en place un nouveau protocole, basé sur une mesure de DSC à sec, c'est-à-dire sans l'étape de saturation en eau. Toutefois, le taux d'hydratation des échantillons a une influence sur la température de dénaturation mesurée : la DSC saturée en eau permet d'éviter les biais liés à des hydratations variables d'un échantillon à l'autre [122]. Pour obtenir des mesures DSC à sec fiables, un conditionnement préalable des échantillons dans un environnement contrôlé en température et en humidité est donc nécessaire. Les échantillons sont alors stockés pendant 4 jours dans un caisson à 23°C et d'humidité relative 50 %. Le prélèvement, la pesée et l'encapsulation sont effectués dans ce caisson, et la vitesse de chauffe pour les analyses à sec est plus faible (+5°C/min).

1.3 Résultats

1.3.1 Parchemins IDAP : résultats DSC

Des prélèvements sur les parchemins IDAP ont été analysés en DSC par Sylvie Thao-Heu et Laurianne Robinet au CRC. La figure III.8 présente les résultats de DSC saturée en eau (a1-a3) et DSC à sec (b1-b3). Pour les deux types de mesures DSC, nous observons une décroissance de la température de dénaturation T_d vers une valeur seuil lorsque le temps d'exposition à la chaleur augmente. L'exposition des parchemins à la chaleur sur plusieurs jours a donc bien induit une dégradation du collagène. L'enthalpie suit globalement la même tendance mais ce paramètre est plus difficile à interpréter car l'erreur de mesure est assez importante (la surface du pic est mesurée manuellement et la ligne de base délimitant le dessous du pic n'est pas toujours bien définie). En comparant les deux courbes des températures de dénaturation, on constate que la convergence de T_d^{eau} vers sa limite est plus rapide

que celle de T_d^{sec} . En effet, avec la DSC saturée en eau, T_d^{eau} semble atteindre une valeur seuil au bout de 16 jours d'exposition, et les dégradations plus importantes ne sont pas discernables les unes par rapport aux autres. En revanche avec la DSC à sec, on peut faire la distinction entre une dégradation à 16 jours, une dégradation à 40 jours et une dégradation supérieure (80 jours et 122 jours sont presque confondus). La DSC à sec apparaît alors comme un protocole prometteur pour sonder des dégradations importantes, difficilement mesurables par DSC saturée en eau.

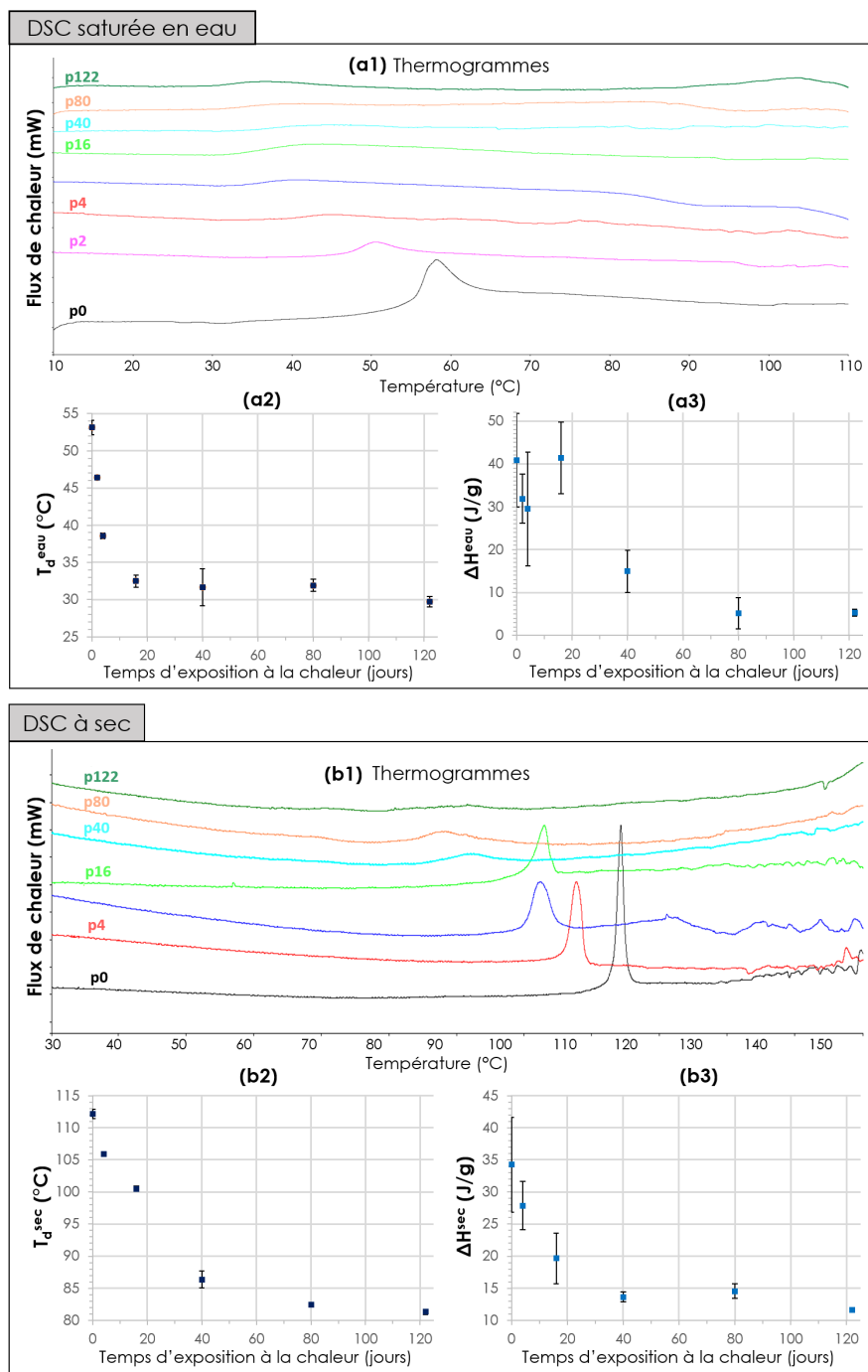


Figure III.8 – Résultats des mesures DSC saturée en eau (a1-a3) et à sec (b1-b3) sur les parchemins IDAP. (a1)(b1) Thermogrammes bruts de l'ensemble des échantillons. (a2)(b2) Température de dénaturation T_d en fonction de temps d'exposition à la chaleur des parchemins. (a3)(b3) Enthalpie ΔH en fonction de temps d'exposition à la chaleur des parchemins.

1.3.2 Parchemins IDAP : résultats en microscopie NL

L'imagerie en microscopie non-linéaire (microscopie NL) des parchemins modèles a tout d'abord confirmé les résultats qualitatifs obtenus par Latour et al. en 2016 [59]. On constate en effet que le signal de fluorescence (2-PEF) augmente avec le temps d'exposition à la chaleur, tandis que le signal de second harmonique diminue, aussi bien sur la face fleur que sur la face chair (des exemples sont donnés en figure III.9). Ainsi, la dégradation causée par une exposition prolongée à 100°C correspond à une gélatinisation d'une partie du collagène dans le parchemin, qui émet alors moins de SHG et davantage de fluorescence.

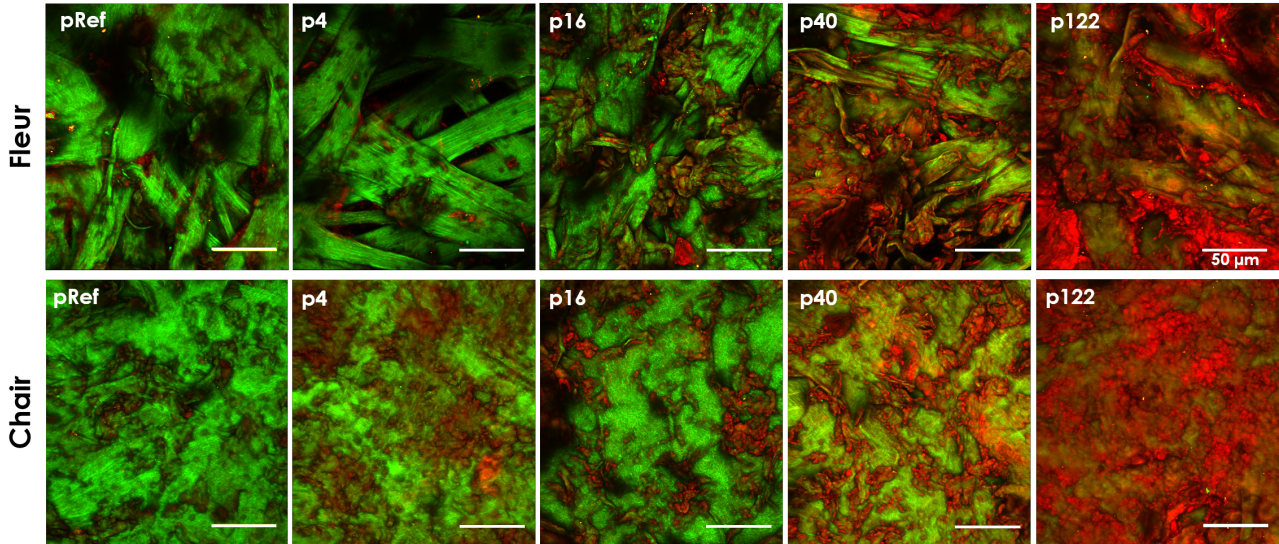


Figure III.9 – Microscopie SHG (en vert) et 2-PEF (en rouge) de différents parchemins modèles (IDAP). Les deux faces des parchemins sont présentées (fleur en haut, chair en bas). Le temps d'exposition à la chaleur augmente graduellement de gauche à droite (0, 4, 16, 40 et 122 jours). Barre d'échelle 50 µm.

Pour quantifier cette divergence des signaux SHG et 2-PEF, nous mesurons pour chaque pixel de nos images le rapport de l'intensité de fluorescence sur l'intensité de second harmonique, $\frac{I_{2PEF}}{I_{SHG}}$. Ensuite, pour obtenir une unique valeur moyenne de ce rapport pour chaque face de parchemin, nous effectuons une série de moyennes dans l'ordre indiqué en figure III.10. Les pixels considérés valides sont ceux qui présentent assez de signal de SHG et de signal de 2-PEF (I_{SHG} et $I_{2PEF} > 2$ photons). Les moyennes de chaque plan en Z sont moyennées sur la profondeur, en éliminant les Z non pertinents qui correspondent à des plans d'imagerie hors du parchemin (au dessus de la surface) ou trop affectés par la diffusion. Les rapports d'intensité moyens obtenus sont tracés en figure III.11 (a1) en fonction du temps d'exposition à la chaleur de chaque parchemin. Comme observé sur les images, ce rapport augmente globalement avec le temps d'exposition, jusqu'à un facteur 5 entre les faibles dégradations et 122 jours d'exposition. La courbe suit une tendance linéaire pour les fortes dégradations. En revanche, le zoom (a2) montre que ce rapport ne permet pas de discriminer les faibles dégradations : il est difficile de distinguer une augmentation du rapport, en particulier face chair, entre 0 et 16 jours d'exposition. Pour ces dégradations, le rapport est confiné en dessous de 1.

Les mesures résolues en polarisation ont ensuite été analysées pour extraire les paramètres de P-SHG mentionnés en section 3.2 du chapitre II. L'orientation moyenne dans le plan des fibrilles, φ , présente peu d'intérêt pour analyser les états de dégradation car, dans tous les cas, nous regardons un matériau où les fibres de collagène sont orientées aléatoirement. L'entropie et l'indice d'orientation, indiquant le degré d'organisation du collagène à l'échelle de l'image, ne suivent pas de tendance d'évolution en fonction de la dégradation. Ainsi, la chaleur dégrade localement le collagène qui se transforme progressivement en gélatine, mais ne semble pas avoir d'influence sur l'orientation des fibres de collagène (tant que ce dernier est encore intact). La désorganisation locale, quant à elle,

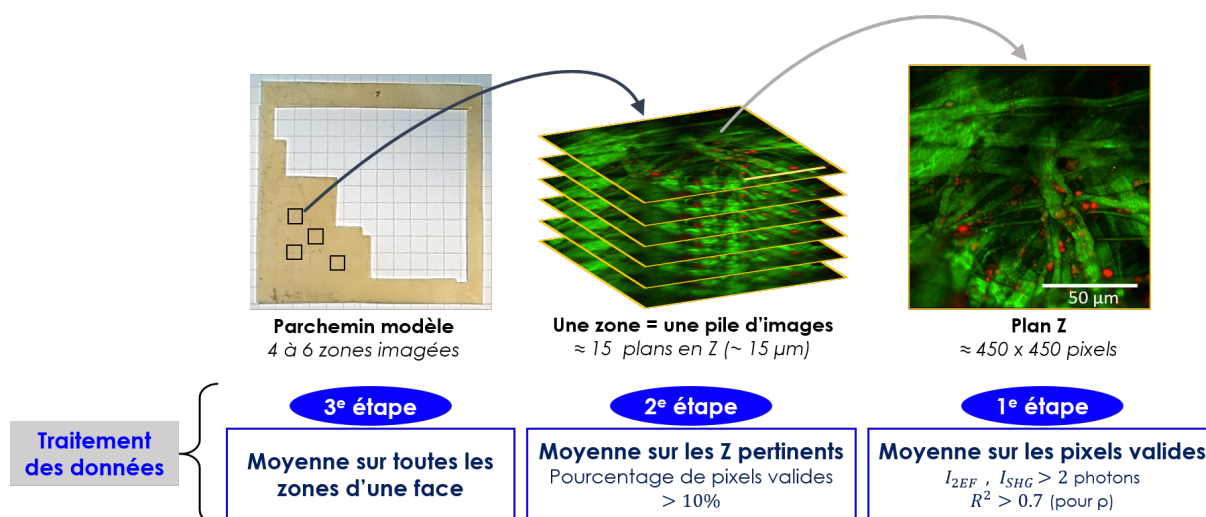


Figure III.10 – Série de moyennes utilisée lors du calcul des paramètres de chaque parchemin. Les moyennes sont effectuées dans l'ordre indiqué des étapes, de droite à gauche.

est visualisée grâce au paramètre d'anisotropie ρ . Nous extrayons ce paramètre pour chaque pixel et procédons à la série de moyennages décrite précédemment en figure III.10, avec comme contrainte supplémentaire pour un pixel d'avoir un coefficient de détermination $R^2 > 0.7$, garantissant une bonne modulation du signal P-SHG. Les paramètres d'anisotropie moyens obtenus sont tracés en

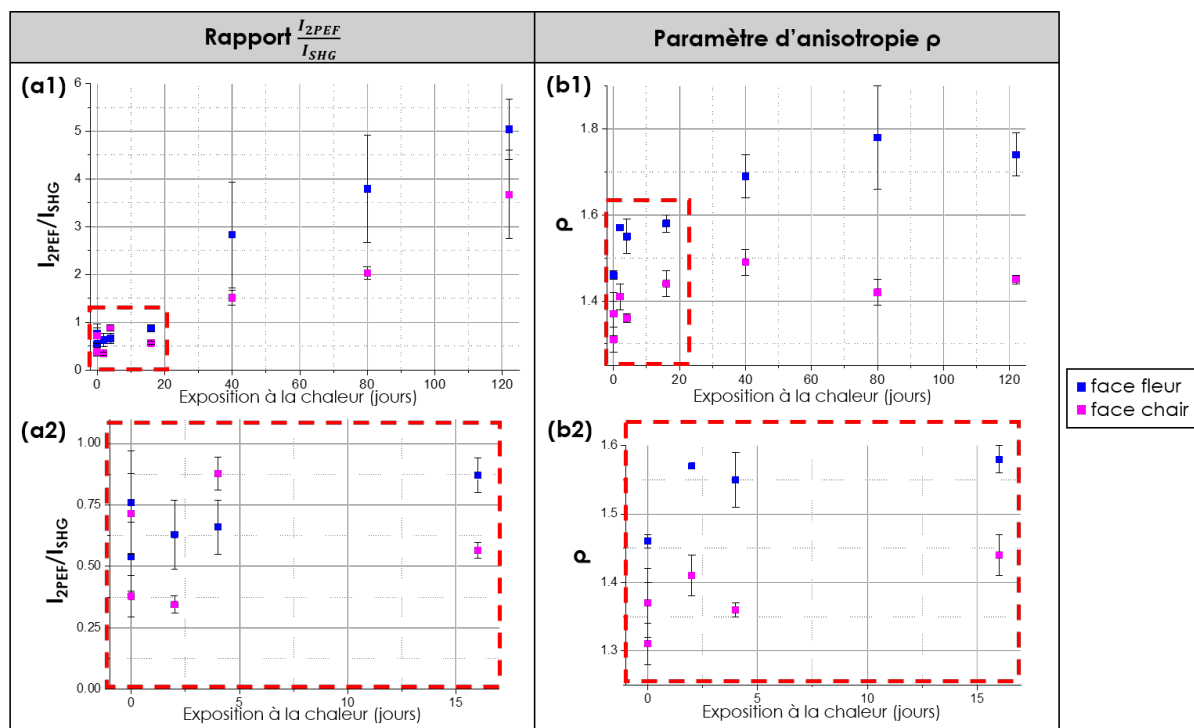


Figure III.11 – Paramètres extraits de chaque parchemin selon le protocole indiquée en figure III.10, tracés en fonction du nombre de jours d'exposition à la chaleur. (a1-a2) Rapport moyen de l'intensité 2-PEF sur l'intensité SHG, tracé (a1) pour tous les échantillons et (a2) pour les échantillons exposés à la chaleur entre 0 et 16 jours. (b1-b2) Paramètre d'anisotropie moyen, tracé (b1) pour tous les échantillons et (b2) pour les échantillons exposés à la chaleur entre 0 et 16 jours.

figure III.11 (b1) en fonction du temps d'exposition à la chaleur de chaque parchemin. Nous constatons une tendance globale d'augmentation de ce paramètre avec le temps d'exposition. Cela montre que la dégradation du collagène par la chaleur s'accompagne d'une désorganisation locale, qui peut être

liée à une désorganisation intra-fibrillaire (changement structurel à l'échelle moléculaire), ou encore à l'augmentation du désordre inter-fibrillaire. Une désorganisation intra-fibrillaire du collagène dans les parchemins se produit en effet, et peut aller jusqu'à la formation de gélatine, matériau amorphe issu de la dénaturation du collagène (débobinage des triples hélices). En amont de la dénaturation, on peut supposer que l'angle du pas des hélices (*helix pitch angle* θ_e) diminue, et $\rho_{fib} = \frac{2}{(\tan \theta_e)^2}$ augmente, induisant également une hausse du paramètre d'anisotropie ρ . La hausse constatée sur le graphe III.11 (b1) n'est pas linéaire comme le rapport des intensités : ρ tend ici exponentiellement vers sa limite. Son augmentation a donc surtout lieu pour les temps moyens d'exposition (zoom (b2) de la figure III.11) et présente un plateau au delà de 40 jours. Ainsi, contrairement au rapport $\frac{I_{2PEEF}}{I_{SHG}}$, le paramètre ρ serait plus sensible aux premiers stades de dégradation du collagène.

Nous notons toutefois que les courbes présentées donnent des tendances d'évolution et non des valeurs exactes. En effet, même si les parchemins sont tous issus d'une même espèce animale et ont été soumis au même protocole de fabrication, leur conservation depuis la fin du projet IDAP (2005) n'est pas connue, et l'hétérogénéité intrinsèque propre à ce type d'échantillons semble irréductible. Ainsi, les mesures effectuées sur les deux parchemins de référence (aucune exposition à la chaleur) ne donnent pas exactement les mêmes résultats. De plus, les valeurs des paramètres apparaissent systématiquement plus élevées sur la face fleur que sur la face chair. Cependant, l'interprétation est rendue plus délicate face chair car les parchemins IDAP présentent tous une couche de quelques microns d'épaisseur qui recouvre leur structure en fibres sur cette face. Une hypothèse pourrait être la présence d'un dépôt calcique lié au traitement des parchemins à la chaux, mais cela n'a pas été clairement identifié et son influence sur les mesures P-SHG n'est pas connue, ce qui ne nous permet pas d'aller plus loin dans l'interprétation des différences des paramètres entre les deux faces.

1.3.3 Parchemins IDAP : corrélation DSC et microscopie NL

Les mesures de DSC et de microscopie non-linéaire ayant été effectuées sur les mêmes parchemins, nous pouvons directement corréler les deux résultats. Pour cela, les paramètres de microscopie non-linéaire (rapport des intensités $\frac{I_{2PEEF}}{I_{SHG}}$ et paramètre d'anisotropie ρ) sont tracés en fonction des températures de dénaturation obtenues en DSC, saturée en eau d'une part et à sec d'autre part (Fig. III.12). Notons que les valeurs des deux parchemins de référence (aucune exposition à la chaleur) ont été moyennées pour ne faire apparaître qu'un seul point.

Le rapport $\frac{I_{2PEEF}}{I_{SHG}}$ en fonction de la température de dénaturation T_d converge rapidement vers une valeur seuil et présente un plateau aux températures de dénaturation élevées (Fig. III.12 (a1)(a2)). Ce comportement confirme que le rapport des intensités peut fortement évoluer aux faibles températures de dénaturation, c'est-à-dire aux dégradations avancées. Pour les mesures de DSC saturée en eau, les faibles T_d^{eau} ($< 35^\circ C$) sont presque toutes identiques (la DSC saturée en eau ne permet pas de séparer les fortes dégradations), alors que les faibles T_d^{sec} ($< 90^\circ C$) montrent une légère variation. Toutefois, pour un même écart de dégradation, la variation de $\frac{I_{2PEEF}}{I_{SHG}}$ est plus importante que la variation de T_d^{sec} , indiquant que le rapport des intensités discrimine mieux les fortes dégradations que la DSC à sec.

Le paramètre d'anisotropie semble décroître linéairement en fonction de la température de dénaturation (Fig. III.12 (b1)(b2)). Nous trouvons en particulier les coefficients de corrélation linéaire suivants (corrélation de Pearson) : -0.85 entre ρ et T_d^{eau} et -0.98 entre ρ et T_d^{sec} sur la face fleur, et -0.77 entre ρ et T_d^{eau} et -0.79 entre ρ et T_d^{sec} sur la face chair. Le comportement linéaire est toutefois mieux vérifié aux fortes valeurs de T_d . Cela fait ressortir la sensibilité du paramètre d'anisotropie ρ pour discriminer des parchemins présentant des températures de dénaturation assez élevées ($T_d^{eau} > 32^\circ C$ et $T_d^{sec} > 82^\circ C$), c'est-à-dire présentant un faible état de dégradation. Cela fait de ρ une sonde des premiers stades de dégradation.

En conclusion, les évolutions du rapport des intensités $\frac{I_{2PEEF}}{I_{SHG}}$ et du paramètre d'anisotropie ρ sont bien corrélées avec les mesures DSC : ces paramètres augmentent lorsque la température de dénaturation diminue, indiquant une dégradation du collagène. Cela permet de valider l'utilisation de la microscopie non-linéaire, et en particulier de la P-SHG, pour caractériser l'état de dégradation de parchemins. Les deux paramètres obtenus par cette technique sont, pris ensemble, sensibles à une large

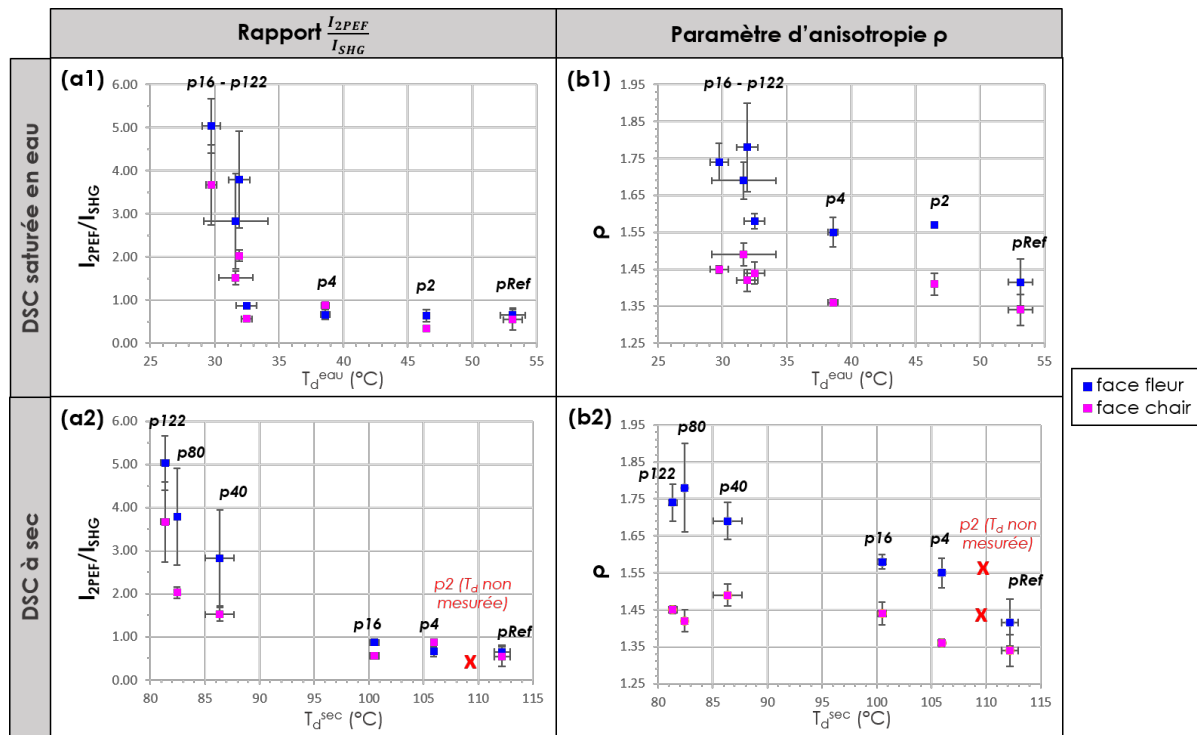


Figure III.12 – Corrélation P-SHG *vs* DSC pour les parchemins IDAP. (a1-a2) Rapports moyens de l’intensité 2-PEF sur l’intensité SHG et (b1-b2) paramètres d’anisotropie moyens, tracés en fonction de leur température de dénaturation obtenue par DSC (a1-b1) saturée en eau et (a2-b2) à sec.

gamme de dégradations, y compris aux premiers stades de dégradation, indispensables à détecter pour un bon diagnostic de l’état de conservation d’un parchemin. Cependant, il est important de noter que les courbes de la figure III.12 ne sont pas des étalonnages quantitatifs, permettant de relier une valeur de ρ ou de $\frac{I_{2PEF}}{I_{SHG}}$ à une valeur de T_d quel que soit le parchemin, mais plutôt des courbes de tendances globales. Nous avons en effet vu que l’ensemble des échantillons est assez hétérogène, les deux références ne donnant par exemple pas les mêmes valeurs de paramètres. Cette hétérogénéité multi-factorielle ne rend donc pas pertinent un ajustement de nos données par des fonctions modèles permettant des mesures de corrélations plus précises.

1.3.4 Parchemins de Chartres : tests comparatifs DSC/MNL sur des fragments

Le projet REMAC auquel a participé le LOB nous a donné l’opportunité de tester notre nouvel outil de diagnostic sur des parchemins historiques. Dans un premier temps, nous avons utilisé des fragments peu précieux détachés de manuscrits chartains pour compléter l’étude corrélative précédente en couplant des mesures de DSC à nos mesures en P-SHG. Visuellement, ces fragments semblent présenter des altérations variables pouvant aller jusqu’à des dégradations très importantes (notamment le PC11, voir figure III.5). C’est donc le protocole de DSC à sec qui a été appliqué pour ces parchemins de dégradation inconnues.

Si les deux techniques s’accordent globalement pour désigner le fragment PC8 comme le moins dégradé et le PC11 comme le plus dégradé (en accord également avec une évaluation visuelle macroscopique des fragments, présentés en figure III.5), la caractérisation des états de dégradation des fragments PC2 et PC3 est plus ambiguë. Une explication pour cela est la grande variabilité de l’état de dégradation du collagène au sein d’un même échantillon. Elle a notamment été constatée sur le fragment PC3, pour lequel les mesures DSC sur des prélèvements pourtant proches sont très dispersées. Les acquisitions P-SHG n’ayant pas été faites sur une région mesurée en DSC (mais comme d’habitude, sur une région proche), les mesures de ce fragment par les deux techniques ne sont probablement pas comparables. La variabilité de dégradation a également été constaté à l’échelle de nos

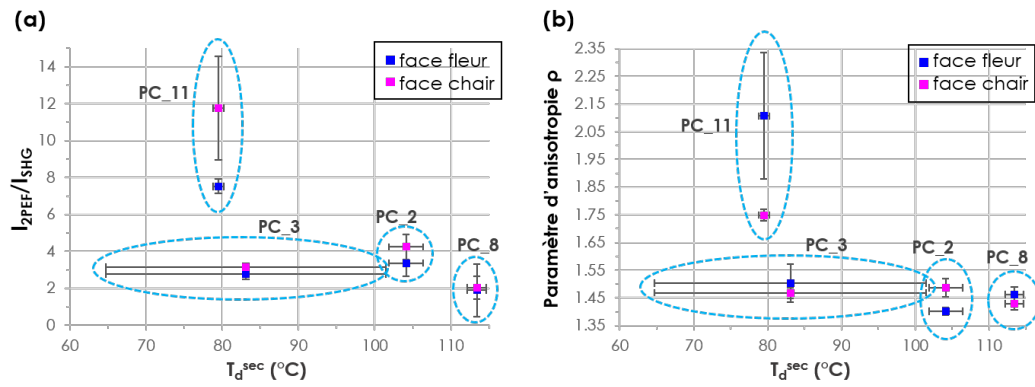


Figure III.13 – Corrélation P-SHG *vs* DSC pour les fragments chartrains. (a) Rapports moyens de l'intensité 2-PEF sur l'intensité SHG et (b) paramètres d'anisotropie moyens, tracés en fonction de leur température de dénaturation obtenue par DSC à sec.

images (207 μm x 207 μm), et n'est pas forcément surprenante au vu des conditions extrêmes subies par les parchemins de Chartres. En effet, la forte chaleur de l'incendie a été soudaine et potentiellement très localisée, ce qui a donné lieu à une forte hétérogénéité des états de dégradation du collagène à l'échelle d'une image : ainsi, des fibres intactes avoisinent du collagène complètement gélatinisé. Une telle hétérogénéité a tout d'abord un impact sur la corrélation des deux paramètres moyens calculés, chacun donnant des informations sur des états d'altération différents du collagène (en particulier ρ est principalement calculé sur les fibres préservées présentant un fort signal de SHG alors que le rapport des intensités est plutôt influencé par les zones gélatinisées). Par exemple, le fragment PC2 présente un ρ relativement faible et un rapport $\frac{I_{2PEF}}{I_{SHG}}$ élevé, tandis que pour les dégradations homogènes étudiées précédemment sur les parchemins modèles, un rapport des intensités élevé est associé à un fort paramètre d'anisotropie. Ensuite, la présence d'états très variables de dégradation sur une petite zone peut biaiser les valeurs moyennes des deux paramètres calculées en moyennant sur toute l'image puis sur l'épaisseur du parchemin. En effet, lorsque l'état du collagène est assez homogène à l'échelle de l'image, les valeurs moyennes des paramètres reflètent l'état principal de dégradation du collagène. Mais s'il est dégradé de manière hétérogène, différents états de dégradations, plus ou moins extrêmes, sont moyennés, conduisant à des valeurs de paramètres peu variables d'un échantillon à l'autre. La corrélation entre ρ et T_d peut ne plus être vérifiée, dans ce cas. Par conséquent, dans la suite, nous limitons l'imagerie à des zones présentant une dégradation globalement homogène au sein de l'image, et moyennons seulement sur les premiers plans en Z (sur 5 μm d'épaisseur en partant de la surface).

1.3.5 Parchemins historiques de Chartres entiers

Tirant parti de la non-invasivité de notre technique, nous avons pu analyser des feuillets entiers du prestigieux fonds des manuscrits de la Bibliothèque de Chartres. Rescapés de l'incendie de 1944 où l'action simultanée du feu et de l'eau les a endommagés de manière inhomogène, ils peuvent présenter sur un même feuillet des zones préservées et des zones fortement dégradées, avec des causes de dégradation variables (flammes, forte chaleur couplée à l'inondation, ou encore dégradation naturelle liée à l'âge). Si la variabilité de l'état de dégradation à l'échelle de l'image a compliqué l'étude des petits fragments, elle peut ici révéler un grand intérêt, à condition d'imager des zones à peu près homogènes et de tirer parti de la variabilité à l'échelle du feuillet entier seulement. Nous pouvons alors analyser différentes zones plus ou moins dégradées (en s'assurant de l'homogénéité de l'altération de la zone) d'un même feuillet en nous affranchissant des variations inter-échantillons liées à des facteurs extérieurs indépendants de la dégradation.

Trois feuillets du manuscrit Ms.205 ont été analysés en P-SHG, dont un restauré durant la campagne de 2005. Pour les deux feuillets non restaurés, plusieurs zones ont été imagées sur des régions d'apparence préservée (au centre entre les deux colonnes de texte) que l'on note régions AP, et sur

des régions d'apparence dégradée (généralement en bordure de parchemin), appelées régions AD. La localisation des zones AP (centre) et AD (périphérie) peut s'expliquer par le stockage des manuscrits en liasse : la périphérie des feuillets se trouve alors plus exposée aux facteurs d'altération. Les résultats recto verso sont résumés en figure III.14. La structure en fibres du parchemin est effectivement bien préservée sur les régions AP, avec un fort signal de SHG dominant le signal de fluorescence, contrairement aux régions AD où l'on ne reconnaît plus les fibres de collagène et où le signal de 2-PEF domine le signal de SHG. Les rapports des intensités $\frac{I_{2PEF}}{I_{SHG}}$ ainsi que les paramètres d'anisotropie moyens sont plus faibles pour les régions AP, confirmant le bon état du collagène dans ces zones. Comme lors de l'étude des parchemins IDAP, on constate des paramètres plus élevés sur la face fleur des parchemins.

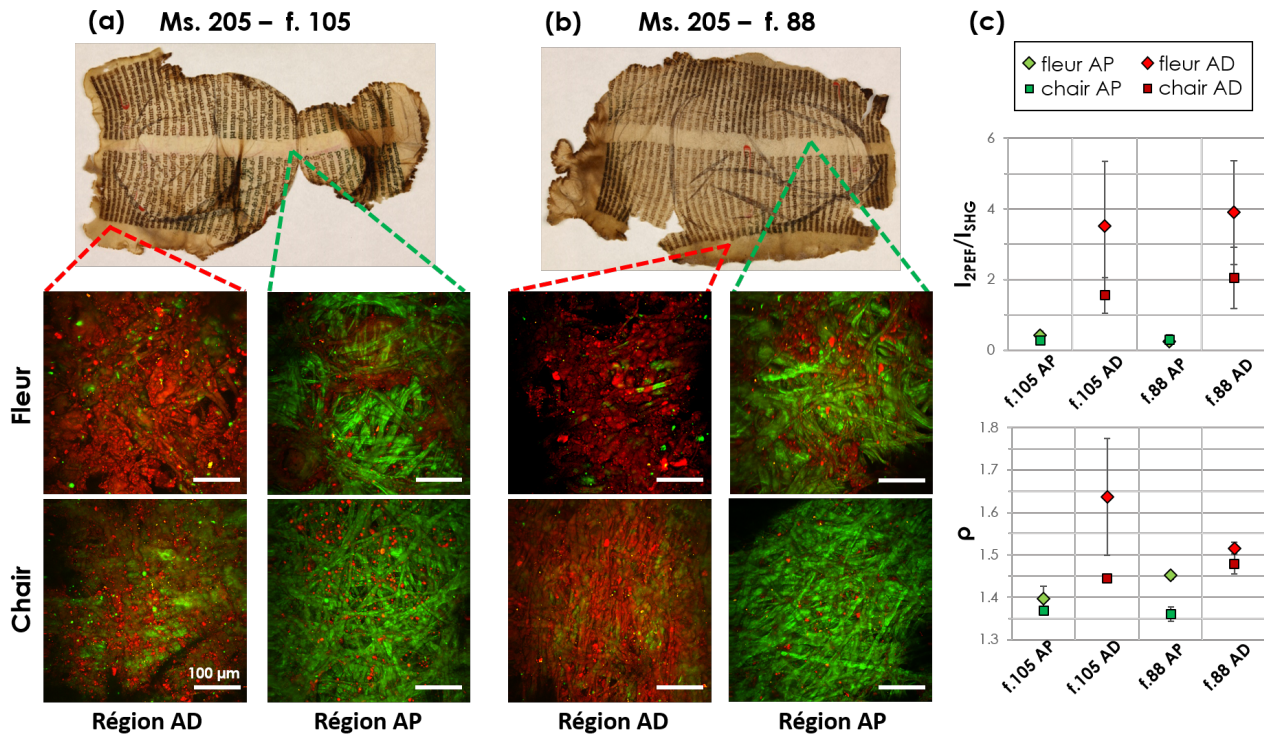


Figure III.14 – Microscopie P-SHG de deux feuillets du manuscrit chartrain Ms.205. (a-b) Photographie de la face fleur du feuillet et signaux de SHG (en vert) et de 2-PEF (en rouge) des deux faces (a) du feuillet Ms.205-f.105 et (b) du feuillet Ms.205-f.88. Les pointillés rouges indiquent la zone imagée côté fleur dans une région d'apparence dégradée (AD) et les pointillés verts la zone imagée côté fleur dans une région d'apparence préservée (AP). (c) Rapports moyens de l'intensité 2-PEF sur l'intensité SHG et paramètres d'anisotropie moyens, tracés pour les régions AP et AD des deux feuillets.

Les premières mesures sur le manuscrit Ms.205 nous donnent un étalonnage des paramètres $\frac{I_{2PEF}}{I_{SHG}}$ et ρ (propre à ce manuscrit) que nous avons utilisé pour déterminer l'état de conservation du feuillet restauré Ms.205-f.301. Ce parchemin a été soumis à la campagne de restauration de la BnF en 2005 : si la technique de restauration par relaxation a donné des résultats spectaculaires sur l'aspect visuel macroscopique des parchemins, l'interrogation demeure quant à leur structure microscopique. En effet, la première étape de relaxation consiste à humidifier les parchemins, et cet apport d'eau pourrait déclencher la dénaturation du collagène (débobinage des triples hélices), déjà altéré par la chaleur. Les mesures P-SHG sur le feuillet Ms.205-f.301 ont été prises au centre, entre les deux colonnes de textes (régions AP). Ainsi, nous regardons si les régions d'apparence préservée, dont la structure microscopique est effectivement bien conservée sur les feuillets Ms.205-f.105 et Ms.205-f.88, ont été affectées par la restauration, ce qui entraînerait une hausse des paramètres. La figure III.15 expose les résultats, rassurants, obtenus sur le feuillet Ms.205-f.301. Tout d'abord, aucune gélatinisation n'est visible sur les zones imagées et le rapport $\frac{I_{2PEF}}{I_{SHG}}$ est faible comme celui des régions AP des feuillets Ms.205-f.105 et

Ms.205-f.88. De plus, aucune désorganisation intra-fibrillaire ne semble avoir été induite, le paramètre d'anisotropie étant similaire à ceux obtenus sur les régions AP des feuillets Ms.205-f.105 et Ms.205-f.88. La restauration a ainsi bien préservé la structure microscopique du collagène dans le parchemin Ms.205-f.301.

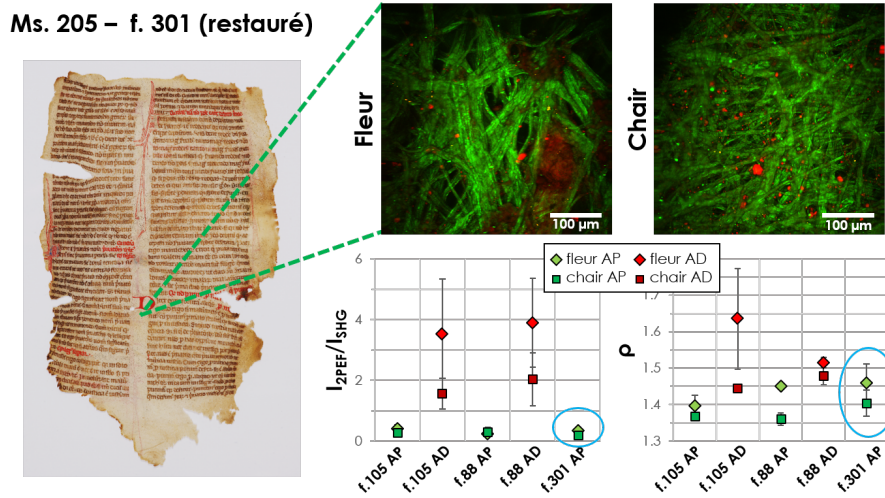


Figure III.15 – Microscopie P-SHG d'un feuillet restauré du manuscrit chartrain Ms.205. La photographie est prise sur la face fleur et les images de microscopie montrent les signaux de SHG (en vert) et de 2-PEF (en rouge) des deux faces du feuillet Ms.205-f.301. Les pointillés verts indiquent la zone approximative d'imagerie côté fleur (région AP). Les graphes permettent de comparer les rapports moyens de l'intensité 2-PEF sur l'intensité SHG et les paramètres d'anisotropie moyens des feuillets non restaurés Ms.205-f.105 et Ms.205-f.88, et ceux du feuillet restauré Ms.205-f.301 (cercles bleus).

Une analyse a également été conduite sur la liasse L.451 qui, comme le manuscrit Ms.205, présente des régions d'aspect plus ou moins dégradé sur un même feuillet. Les dégradations affectant le feuillet étudié L.451-f.13 apparaissent toutefois différentes du manuscrit Ms.205 : la région d'apparence dégradée (région AD), constituant la majeure partie du feuillet, est rigide et translucide, ce qui pourrait indiquer une gélatinisation partielle du parchemin. Les résultats P-SHG sont exposés en figure III.16. De manière très surprenante, on observe que les zones imagées sur la région transparente (et donc supposée gélatinisée) donnent en fait un signal de SHG très important et montrent peu de fluorescence, tout comme les zones imagées dans la région d'aspect moins dégradé (région AP). Ainsi, les rapports d'intensité pour les deux types de région sont similaires. Cela indiquerait que la transparence du parchemin n'est ici pas liée à la gélatinisation du collagène mais à un autre type de dégradation. Les paramètres d'anisotropie obtenus confirment les premières observations car aucune augmentation de ρ n'est constatée sur la région AD, comme si le collagène était resté localement bien préservé sur tout le parchemin. L'examen visuel des images de SHG montre cependant que la morphologie du parchemin change entre la région AP et la région AD. Si des fibres sont bien visibles sur la région AP, elles se distinguent plus difficilement sur la région AD, apparaissant plus denses et écrasées.

1.4 Discussions des résultats et perspectives de l'étude

1.4.1 Diagnostic en P-SHG sur parchemins modèles et comparaison avec la DSC

Notre travail sur les parchemins modèles du projet IDAP a établi la technique de P-SHG comme un outil non destructif et non invasif pour l'évaluation quantitative de la dégradation du collagène dans les parchemins. Elle apparaît comme une alternative à une technique de référence, la DSC, classiquement utilisée mais inadaptée à l'étude d'objets précieux car destructive. Les paramètres de microscopie non-linéaire permettant un diagnostic quantitatif sont d'une part le rapport de l'intensité de fluorescence sur l'intensité de second harmonique $\frac{I_{2PEF}}{I_{SHG}}$ et d'autre part le paramètre d'anisotropie ρ extrait grâce à des mesures résolues en polarisations linéaires (P-SHG).

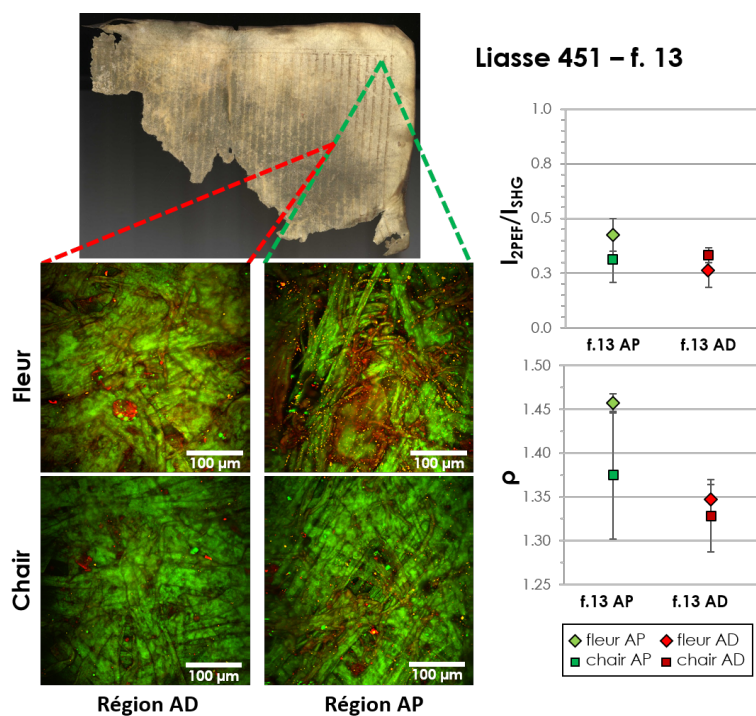


Figure III.16 – Microscopie P-SHG d'un feuillet de la liasse L.451. La photographie est prise sur la face fleur et les images de microscopie montrent les signaux de SHG (en vert) et de 2-PEF (en rouge) des deux faces du feuillet L.451-f.13. Les pointillés rouges indiquent la zone imagée côté fleur dans une région d'apparence dégradée (AD) et les pointillés verts la zone imagée côté fleur dans une région d'apparence préservée (AP). Les graphes montrent les rapports moyens de l'intensité 2-PEF sur l'intensité SHG et les paramètres d'anisotropie moyens pour les régions AP et AD du feuillet.

Nous avons montré que le rapport des intensités augmente avec la dégradation, cette dernière entraînant à la fois une augmentation du signal de fluorescence et une perte du signal de SHG, ce qui confirme les résultats de Latour et al. [59, 116]. Ce rapport semble surtout pertinent pour des dégradations avancées (IDAP : 40 à 122 jours d'exposition à la chaleur), et est confiné entre 0.5 et 1 pour des faibles états de dégradation (IDAP : 0 à 16 jours d'exposition à la chaleur). En effet, la baisse de signal de SHG est liée à la perte de l'organisation fibrillaire du collagène, suivie d'une dénaturation (débobinage des triples hélices) conduisant à la formation de gélatine, *a priori* fluorescente. La hausse du rapport a donc principalement lieu lorsque le processus de gélatinisation, stade ultime de dégradation du collagène, est amorcé.

Le paramètre d'anisotropie augmente également avec la dégradation mais est, quant à lui, plus sensible aux faibles dégradations. La hausse de ce paramètre indique une désorganisation intra-fibrillaire, probablement à l'échelle de la molécule, ou encore une dispersion plus importante des orientations des fibrilles par rapport à l'axe des fibres (désordre inter-fibrillaire qui peut se produire en amont de la perte de l'organisation fibrillaire). Le paramètre ρ serait ainsi un détecteur assez sensible pour diagnostiquer les premiers stades de dégradation, ayant lieu avant l'apparition irréversible de gélatine. En revanche, pour des dégradations plus importantes (IDAP : 40 à 122 jours d'exposition à la chaleur), l'évolution de ce paramètre est moins pertinente. Cela est plutôt dû à une limitation technique et nous ne pouvons pas en déduire que la désorganisation locale du collagène varie moins entre les parchemins présentant de telles dégradations. En effet, dans ces parchemins très dégradés, le collagène émettant des signaux de SHG exploitables est plus rare, et la faible intensité SHG rend la mesure de ρ moins fiable.

Les valeurs relatives de ces paramètres sont cohérentes avec les valeurs DSC, technique de référence pour analyser la dégradation, mais qui nécessite un prélèvement. L'état des parchemins est donc correctement caractérisé par P-SHG. Nous avons présenté en figure III.12 des courbes donnant la tem-

pérature de dénaturation à partir de valeurs de ρ et de $\frac{I_{2PEF}}{I_{SHG}}$, pour des dégradations homogènes par chaleur sèche. Toutefois, ces courbes indiquent plutôt des tendances et non pas des correspondances absolues entre les valeurs, du fait de la grande hétérogénéité rencontrée dans les parchemins. De plus, nous n'avons pas étudié l'impact de l'espèce animale et du traitement appliqué au collagène durant la fabrication sur les mesures de dégradation, et il est possible que ces deux facteurs jouent un rôle dans les valeurs mesurées [123]. La dégradation elle-même peut être induite par différents facteurs (humidité, chaleur, lumière, polluants), chacun affectant le collagène d'une façon particulière [120]. Cela signifie que la caractérisation de la dégradation d'un parchemin inconnu par P-SHG nécessite des mesures de calibration. De ce fait, la P-SHG se prête davantage au suivi de collections, où seules les variations *relatives* des paramètres sont utiles pour caractériser l'évolution de l'état des parchemins (constat du maintien d'un bon état de conservation ou au contraire détection d'une amorce de dégradation). Cela est intéressant pour comparer différentes zones d'un même parchemin, ou suivre au long terme l'état du collagène dans les mêmes parchemins, aidant les conservateurs à ajuster finement les conditions de conservation (ou vérifier l'état du collagène après un prêt, ou après une restauration) et les restaurateurs à juger du traitement le plus adapté. Ce suivi spatial et temporel fiable de l'état du collagène des parchemins est donc rendu possible par P-SHG de manière ni destructive ni invasive.

1.4.2 Applications à des parchemins historiques

Aussitôt dit, aussitôt fait : nous avons suivi l'état du collagène sur des parchemins historiques issus de la précieuse collection de la Bibliothèque de Chartres.

Pour commencer, des fragments peu précieux ont pu être mesurés à la fois en P-SHG et en DSC. La comparaison des deux techniques s'est ici révélée plus difficile du fait de la présence de dégradations hétérogènes, certainement liées aux conditions extrêmes d'altération des fragments. Dans ce cas, les paramètres ne donnent pas les mêmes informations : ρ indique plutôt l'état des structures de collagène émettant encore un signal de SHG (ce qui se rapproche de l'information délivrée par T_d), tandis que le rapport $\frac{I_{2PEF}}{I_{SHG}}$ est fortement amplifié par la présence de gélatine. La corrélation entre ρ et T_d se vérifie moins car, dans ce cas, un biais est introduit dans le calcul du paramètre d'anisotropie, dont la valeur moyenne est prise sur des surfaces extrêmement hétérogènes.

Des feuillets chartrains ont ensuite été analysés (en imageant des zones où la dégradation paraissait relativement homogènes). Nous avons mis en évidence sur deux feuillets d'un même manuscrit chartrain (Ms.205) une variation de ρ et de $\frac{I_{2PEF}}{I_{SHG}}$ entre deux types de régions d'aspect visuel différent : aspect préservé (régions AP) et aspect dégradé (régions AD). Cette variation indique un changement dans la structure du collagène. Les deux paramètres étant plus importants sur les régions AD, cela montre que le collagène y a été davantage dégradé, en accord avec les observations macroscopiques. Nous avons également mesuré un feuillet restauré, pour étudier l'effet de la restauration sur la structure du collagène sur les régions AP, présentant un bon état de conservation avant restauration. Les valeurs des paramètres obtenues ont pu être comparées quantitativement aux valeurs des paramètres obtenues sur les deux feuillets précédents, les trois feuillets étant issus d'un même manuscrit (donc *a priori* d'un même animal, soumis au même protocole de fabrication et aux mêmes conditions de conservation). Les valeurs des paramètres du feuillet restauré sont similaires aux valeurs obtenues pour les feuillets non-restaurés, ce qui indique que la relaxation en milieu humide utilisée lors de la restauration n'a pas eu d'incidence sur l'état du collagène. Autrement dit, l'apport d'eau n'a pas dénaturé le collagène à température ambiante, signifiant que la température de dénaturation qui aurait été obtenue par DSC saturée en eau aurait été supérieure à 25-30°C. Ceci peut se retrouver approximativement sur la courbe III.12 (c), qui donne des températures de dénaturation assez élevées pour les valeurs de ρ des faces fleur et chair du feuillet restauré¹.

Enfin, une découverte surprenante a été faite sur le dernier feuillet de Chartres étudié, issu de la liasse L.451. Des mesures sur une zone macroscopiquement très altérée et d'aspect visuel gélatinisé nous ont donné un fort signal de SHG et très peu de fluorescence, avec des paramètres $\frac{I_{2PEF}}{I_{SHG}}$ et ρ

1. Cette approche est bien sûr imprécise : la courbe utilisée ne s'applique peut-être pas exactement pour ce manuscrit Ms.205 dont nous ne connaissons ni les conditions de fabrication, ni l'espèce animale utilisée.

aussi faibles que ceux d'une région voisine qui apparaît très bien conservée. L'altération visuelle du manuscrit se serait-elle produite uniquement suite à un changement de morphologie macroscopique des fibres de collagène? Nous avons vu que les fibres semblent plus aplaties et denses dans cette région, conduisant potentiellement à moins d'interfaces et donc à un matériau moins diffusant, ce qui expliquerait son aspect plus translucide. Dans ce cas, le collagène lui-même n'est peut-être pas touché localement : il n'est alors pas exclu que ce type d'altération soit réversible. Cela suscite un grand intérêt dans la communauté, et de nouvelles études vont débiter au CRC avec des parchemins placés sous presse pour reproduire des transparisations sans dégradation du collagène.

Une remarque annexe concerne la disparité de mesures en microscopie non-linéaire entre les faces fleur et chair des parchemins. Les deux paramètres de microscopie non-linéaire sont systématiquement plus élevés sur la face fleur. Une dégradation plus importante de cette face pourrait être possible, car elle présente des follicules pileux et des résidus de graisse qui la rendent plus sensible aux altérations. Cette remarque met en évidence une distinction importante entre les mesures P-SHG et DSC : la P-SHG distingue l'état du collagène de chaque face du parchemin, alors que la DSC fournit des informations sur le prélèvement entier et donc sur toute l'épaisseur du parchemin. Plus généralement, il est possible par P-SHG d'effectuer une *cartographie* de l'état du collagène sur tout le parchemin, rendant compte de l'hétérogénéité éventuelle du matériau par des séries de mesures localisées mais réparties sur différentes régions. Avec des analyses destructives en revanche, il n'est pas possible de déterminer l'état de conservation du collagène n'importe où sur le parchemin (en particulier au centre de l'œuvre!).

1.4.3 Perspectives pour la microscopie NL dans le patrimoine

Notre travail a permis d'illustrer la pertinence de la microscopie P-SHG et constitue une preuve de concept pour diagnostiquer l'état du collagène lors du suivi de parchemins. Mais il a également soulevé de nombreuses questions et beaucoup de points restent encore à étudier. Par exemple, quelle serait la variation de nos paramètres avec d'autres causes de dégradation? Dans le cas des parchemins IDAP, nous avons étudié une dégradation par chaleur sèche, mais d'autres causes d'altération sont connues, comme l'exposition à des polluants ou à la lumière [120], qu'il serait intéressant d'étudier. De plus, l'exposition à la chaleur sèche a induit sur les parchemins IDAP une augmentation progressive du signal de fluorescence, que nous avons directement relié à la formation de gélatine. Toutefois, il est souvent rapporté que la dénaturation du collagène en gélatine se fait en présence de chaleur et d'eau, cette dernière interagissant avec les liaisons hydrogènes qui stabilisent les triples hélices du collagène [20]. Est-il possible que, dans notre cas, les liaisons hydrogènes aient tout de même été rompues sans apport d'eau, entraînant la dénaturation? Le cas échéant, s'agit-il de la même gélatine? Une étude corrélative avec la nanoscopie infrarouge permettrait sans doute de répondre à une partie de ces questions [59].

La microscopie SHG a révélé son potentiel pour l'imagerie de parchemins, ces objets historiques étant constitués principalement de collagène fibrillaire, un générateur invétéré de second harmonique. Mais ce ne sont pas les seuls objets du patrimoine à présenter cette spécificité de signaux SHG. Les collections patrimoniales contiennent de nombreux objets provenant de tissus biologiques, et en particulier de peaux animales. On peut notamment penser aux peaux des spécimens naturalisés dans les musées d'histoire naturelle, aux momies ou textiles dans des musées d'histoire, aux tentures murales ou instruments de musique dans des musées d'art, etc. Plus généralement, le collagène étant présent dans la matrice extracellulaire de tous les tissus, la microscopie SHG peut aussi s'étendre à l'étude des os des espèces présentes dans les musées d'histoire naturelle [80, 124]. Ainsi, les applications potentielles de la microscopie SHG sont encore largement à explorer parmi les matériaux présents dans les collections patrimoniales².

2. Et encore, nous n'avons mentionné que des applications sur échantillons collagéniques, mais il y a aussi les plantes, le bois, les pigments non-centrosymétriques...

Dans tous les cas, la microscopie SHG permettrait une analyse sans contact et non destructive des matériaux, avec des résolutions donnant accès à une caractérisation fine de l'organisation du collagène. La résolution en polarisation (P-SHG) ajoute la possibilité d'extraire des paramètres quantitatifs, sondant la désorganisation du collagène, à différentes échelles. Ce sont finalement ces mêmes raisons qui ont rendu la microscopie P-SHG très intéressante pour l'imagerie biomédicale, domaine où elle est en plein essor. C'est un recoin de ce domaine que nous allons maintenant explorer, en nous centrant sur la cornée et une de ses pathologies de plus en plus courante : le kératocône.

2 Caractérisation de pathologies structurales de la cornée

Une cornée humaine fonctionnelle, dont la structure a été détaillée en section 1.1.3 du premier chapitre, doit assurer deux tiers du pouvoir réfractif de l'œil, tout en étant évidemment transparente. Ces propriétés optiques sont intimement liées aux propriétés mécaniques et sont le fruit de l'organisation très spécifique du collagène fibrillaire à différentes échelles, de la fibrille à l'organisation des lamelles et leur agencement tridimensionnel. Toute altération structurale de la matrice extra-cellulaire constituant le stroma a donc un impact sur l'acuité visuelle voire sur la transparence de la cornée. Cela est le plus souvent associé à une désorganisation du collagène, à une échelle plus ou moins locale : nous présentons dans cette partie l'apport de la P-SHG pour étudier un tel tissu. Nous évoquerons tout d'abord les pathologies cornéennes, en détaillant plus particulièrement celle qui sera l'objet de notre étude, le kératocône. Puis, nous présenterons des résultats en P-SHG obtenus sur des coupes transverses de cornées pathologiques humaines, porteuse d'un kératocône, avant d'étudier le développement et la validation d'un modèle animal pour cette pathologie.

2.1 Les pathologies structurales de la cornée

Les pathologies de la cornée sont la deuxième cause de cécité mondiale, après la cataracte [125]. L'OMS recense environ 10 millions de personnes aveugles du fait de pathologies cornéennes. Ces dernières sont caractérisées par des lésions d'origines diverses : génétiques, traumatiques, infectieuses, inflammatoires, etc. Lorsque la lésion n'est pas confinée à la barrière épithéliale et affecte le stroma, elle désorganise la matrice extra-cellulaire et peut entraîner des opacités cornéennes. La greffe de cornée reste la solution la plus efficace pour traiter ce genre de pathologies, mais seul 1 % des patients peuvent en bénéficier, par manque de don de cornées utilisables (moyenne mondiale). Des thérapies alternatives font l'objet de nombreuses recherches, et la découverte récente de cellules souches du stroma cornéen (SSC) ouvre la voie à une approche thérapeutique prometteuse : injectées dans le stroma à un stade précoce de la maladie, les cellules souches permettraient la régénération de la matrice extra-cellulaire avant la constitution de lésions irréversibles [126]. En effet, lors d'agression externe sur le stroma cornéen, les kératocytes se différencient en myofibroblastes pour produire du collagène essentiellement de type III afin de réparer rapidement la lésion : c'est une fibrose du tissu [127]. Ce collagène III désorganise la matrice extra-cellulaire et induit une diminution de la transparence de la cornée. Cette activation importante des myofibroblastes est dû au fait que les cellules souches stromales, stockées au niveau du limbe (jonction entre la cornée et la conjonctive), ne migrent pas vers la zone agressée pour produire du collagène I, contrairement aux cellules souches épithéliales qui peuvent migrer depuis le limbe vers les zones lésées de l'épithélium : les SSC semblent *bloquées* pour une raison qui n'est pas exactement comprise à l'heure actuelle. Injecter des cellules souches stromales directement dans le stroma permettrait donc aux SSC de s'affranchir de la barrière limbique et de migrer plus facilement, facilitant la régénération matricielle.

Dans ce travail, nous nous sommes spécifiquement intéressé·e·s au kératocône, une pathologie du stroma cornéen de prévalence importante au sein de la population mondiale (entre une et quatre personnes sur 2000 sont touchées). Le kératocône se caractérise par une déformation de la cornée : elle s'amincit, perd en rigidité, et sa forme initialement sphérique devient celle d'un cône irrégulier dans les cas avancés (Fig. III.17). Cela se traduit par des troubles de la vision, notamment avec des déformations d'images et une perte de l'acuité visuelle (myopie et astigmatisme irrégulier). Les causes du kératocône, qui survient en général après la puberté et est progressif pendant une vingtaine d'années, ne sont pas exactement connues. Une prédisposition génétique semble exister mais d'autres facteurs de risques sont envisagés, notamment des facteurs environnementaux comme le frottement mécanique des yeux, le port de lentilles de contact ou des allergies. La chirurgie réfractive cornéenne (le laser excimère utilisé pour corriger la myopie par exemple) intègre également le kératocône comme complication possible, ce qui risque d'augmenter la prévalence de cette pathologie dans les années à venir. L'évolution de la maladie est généralement classée en quatre stades allant du simple inconfort visuel au cas de kératocône aigu. Ce dernier stade est atteint dans 3 % des cas, et est associé à une

perte de transparence cornéenne : une opacité diffuse se forme dans la cornée à la suite d'une rupture de la membrane de Descemet, et cet œdème cornéen laisse place à des zones cicatricielles au bout de quelques mois [128]. À ce stade, seule la greffe de cornée peut permettre de restaurer la vue, posant la problématique sus-mentionnée d'indisponibilité des greffons cornéens. Des thérapies par injection de cellules souches seraient alors très intéressantes.

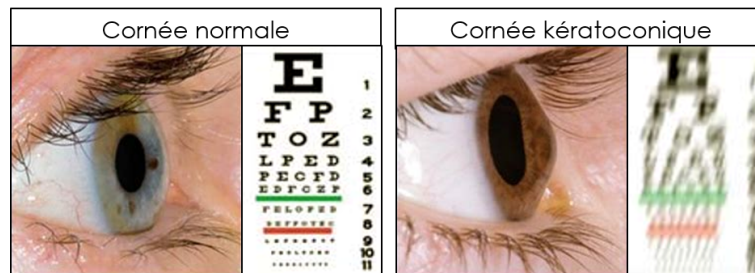


Figure III.17 – Forme de la cornée et exemple de vision chez un-e patient-e sain-e (à gauche) et atteint-e d'un kératocône (à droite).

De nombreuses études se sont penchées sur l'organisation à différentes échelles de la cornée kératoconique. En particulier, le groupe de Meek a utilisé en 2005 la diffraction de rayons X pour déterminer l'orientation privilégiée des fibrilles de collagène sur cornée humaine entière (les mesures ont été prises tous les 250 μm du centre vers la périphérie) [129]. Il a montré que, contrairement aux cornées saines présentant deux directions principales, le kératocône annule toute orientation privilégiée au centre de son cône. En 2007, la microscopie SHG a été utilisée pour la première fois pour étudier le kératocône par Morishige et al [130]. En couplant leurs mesures SHG à des mesures en microscopie électronique sur coupes transverses, ils ont montré qualitativement que les lamelles du stroma antérieur étaient moins entrelacées pour le kératocône, et présentaient moins de points d'ancrage avec la membrane de Bowman, ce qui permet de comprendre la baisse de rigidité d'une cornée kératoconique. Cela a été confirmé par une analyse quantitative en 2014, en ajoutant que les angles d'insertion de ces lamelles d'ancrage dans la membrane de Bowman étaient également plus faibles dans le cas d'un kératocône [131, 132]. Dans ces études, les orientations et les angles sont déterminés manuellement, en mesurant les distances sur les images brutes. Une approche moins fastidieuse a été présentée par le groupe de König en 2018 : un degré d'organisation correspondant à la prédominance de l'orientation principale³, similaire à l'indice d'orientation OI en P-SHG, est extrait par analyse d'images (transformée de Radon de la 2D-FFT filtrée) [133]. Il détermine ce degré d'organisation sur l'imagerie SHG *en-face* de cornées humaines et montre que ce degré d'orientation est significativement plus faible sur 5 cornées kératoconiques que sur les cornées saines. La littérature actuelle indique donc que les symptômes connus du kératocône sont bien liés à une altération de la structure du stroma cornéen. On remarque par ailleurs que le changement d'organisation stromale décrit par ces études touche principalement le stroma antérieur, et peu d'informations sont disponibles sur la partie postérieure de la cornée.

Cependant, aucune étude quantitative sur le kératocône n'a encore été menée en P-SHG. En effet, les seuls travaux en P-SHG sur cornée kératoconique publiés sont une preuve de principe présentant une amélioration technique, mais ne portent pas sur l'aspect biologique et structural de la pathologie [89]. Nous pouvons alors nous demander si la P-SHG, qui permet d'extraire des paramètres d'organisation à différentes échelles, est un bon outil pour diagnostiquer une telle pathologie ou pour apporter des renseignements supplémentaires en vue de mieux la caractériser. Le kératocône impliquant une désorganisation stromale, on peut s'attendre à observer des évolutions dans les paramètres de P-SHG entre un cas sain et un cas pathologique. D'une part, la protrusion conique ou l'inclinaison des lamelles par rapport à la membrane de Bowman pourraient se détecter sur des coupes transverses de cornées. D'autre part, l'imagerie P-SHG de coupes *en-face* devrait aussi donner des informations sur la désorganisation des fibrilles qui perdent leur orientation privilégiée dans le cas d'un kératocône [129, 133]. En effet, cela impliquerait une baisse de l'indice d'orientation OI et une hausse de l'entropie S sur

3. Cela nécessite de supposer une orientation principale en chaque point

les kératocônes. Enfin, si la désorganisation stromale impacte la structure interne des fibrilles ou le désordre local inter-fibrillaire, une évolution du paramètre d'anisotropie ρ peut également se produire.

2.2 Caractérisations sur cornée humaine

La première partie de notre étude s'attache à comparer l'imagerie P-SHG de coupes transverses de cornées humaines saines et pathologiques, présentant un kératocône de stade avancé.

2.2.1 Préparation de la coupe transverse de cornée

Le succès d'une imagerie vient en grande partie de la qualité de l'échantillon imagé. La recherche de la coupe parfaite de cornée pour une imagerie structurale comme la P-SHG a nécessité quelques étapes, car la structure cornéenne complexe doit impérativement être préservée lors de la coupe. Notamment, doit être conservée la structuration en lamelles "orientées" (on ne peut pas distinguer individuellement les fibrilles de collagène mais l'on distingue les lamelles, dont l'orientation traduit celle, identique, de toutes les fibrilles dans cette lamelle). Lors de coupes fines (quelques micromètres), la résistance du tissu seul n'est pas suffisante face à la pression de la lame du microtome, et une inclusion du tissu doit être effectuée préalablement à la coupe, par un milieu qui va se substituer à l'eau tissulaire et augmenter sa résistance. Des premiers tests sur des sections transverses de cornées coupées après inclusion dans de la paraffine n'ont pas été concluants, malgré les différentes épaisseurs de coupes testées pour augmenter la tenue de l'échantillon : la structure en lamelles de la cornée n'est pas préservée (Fig. III.18 (a) et (b)). Au contraire, l'inclusion dans une résine époxy (polymère liquide thermodurcissable, utilisé en microscopie électronique), très rigide, permet de conserver l'organisation lamellaire intacte de la cornée (Fig. III.18 (c)).

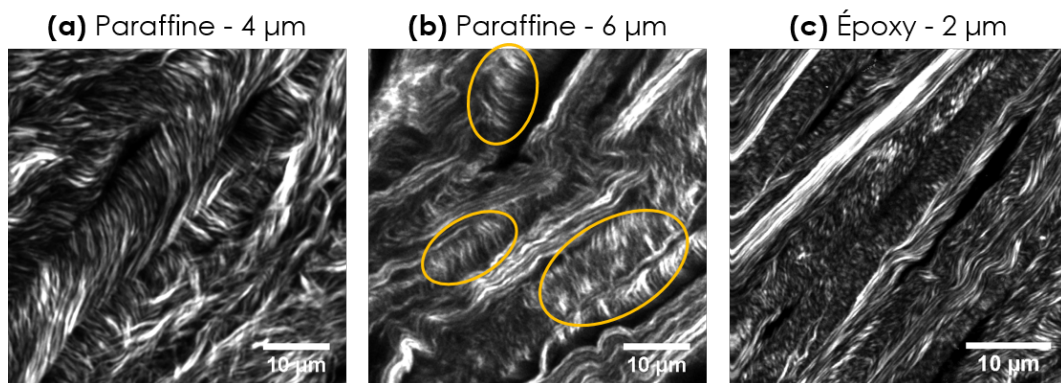


Figure III.18 – Microscopie SHG de coupes transverses de cornées humaines saines, incluses dans différents milieux, et coupées à différentes épaisseurs. (a) Inclusion dans de la paraffine, coupe semi-fine de 4 µm : la structure lamellaire est altérée. (b) Inclusion dans de la paraffine, coupe épaisse de 6 µm : on distingue les lamelles parallèle au plan de la coupe, mais les lamelles perpendiculaires sont pliées (cercles jaunes). (c) Inclusion dans une résine époxy, coupe fine de 2 µm : l'alternance des lamelles est bien visible et les lamelles perpendiculaires au plan de la coupe sont intactes. Barre d'échelle 10 µm.

Nous avons obtenu des coupes transverses de cornées humaines incluses en résine époxy auprès du Dr U. Hansen de l'Université de Münster (Allemagne). Après prélèvement, les cornées ont été fixées puis incluses dans l'époxy, avant d'être coupées à l'ultramicrotome en coupes transverses de l'épithélium à l'endothélium, de 5 µm d'épaisseur. 3 coupes issues de la zone centrale de cornées saines (h602, h603, h679) et 3 coupes issues de la zone conique de 3 cornées kératoconiques (kc649, kc687, kc733) nous ont été envoyées pour cette étude. Les cornées pathologiques ont pu être récupérées à la suite de greffes, par conséquent elles présentent probablement un stade avancé de kératocône. Ces échantillons étant très fins et transparents, et la puissance incidente utilisée assez faible pour éviter toute dégradation (entre 5 et 10 mW), seuls les signaux de SHG vers l'avant (forward) sont suffisamment importants pour l'analyse en polarisation, et ce sont les seuls signaux considérés dans la suite.

2.2.2 Étude d'un stade avancé de kératocône humain

Afin d'étudier aussi bien l'organisation antérieure que postérieure de la cornée, nous imageons plusieurs zones contiguës, recalées ensuite manuellement sous ImageJ de façon à obtenir un champ de vue s'étalant sur toute la hauteur de la coupe transverse (de l'épithélium à l'endothélium, entre 600 et 900 μm suivant les coupes). Pour chaque zone, une pile d'environ 10 images est acquise pour imager la coupe sur toute son épaisseur, à raison d'une image tous les 0.5 ou 1 μm . Pour chaque pixel valide ($R^2 > 0.4$), l'orientation dans le plan φ et le paramètre d'anisotropie sont extraits, ce qui permet de calculer le paramètre d'anisotropie moyen (ρ), l'entropie (S) et l'indice d'orientation (OI) de chaque image. Les 5 plans présentant le maximum de pixels valides après filtrage sont sélectionnés et les trois paramètres sont moyennés sur ces plans, puis sur toutes les zones d'une même cornée. La figure III.19 présente la superposition des cartes d'intensité SHG et des cartes d'orientations, dans le plan contenant le plus de pixels valides, pour les cornées saines (contrôles) et les kératocônes. La membrane

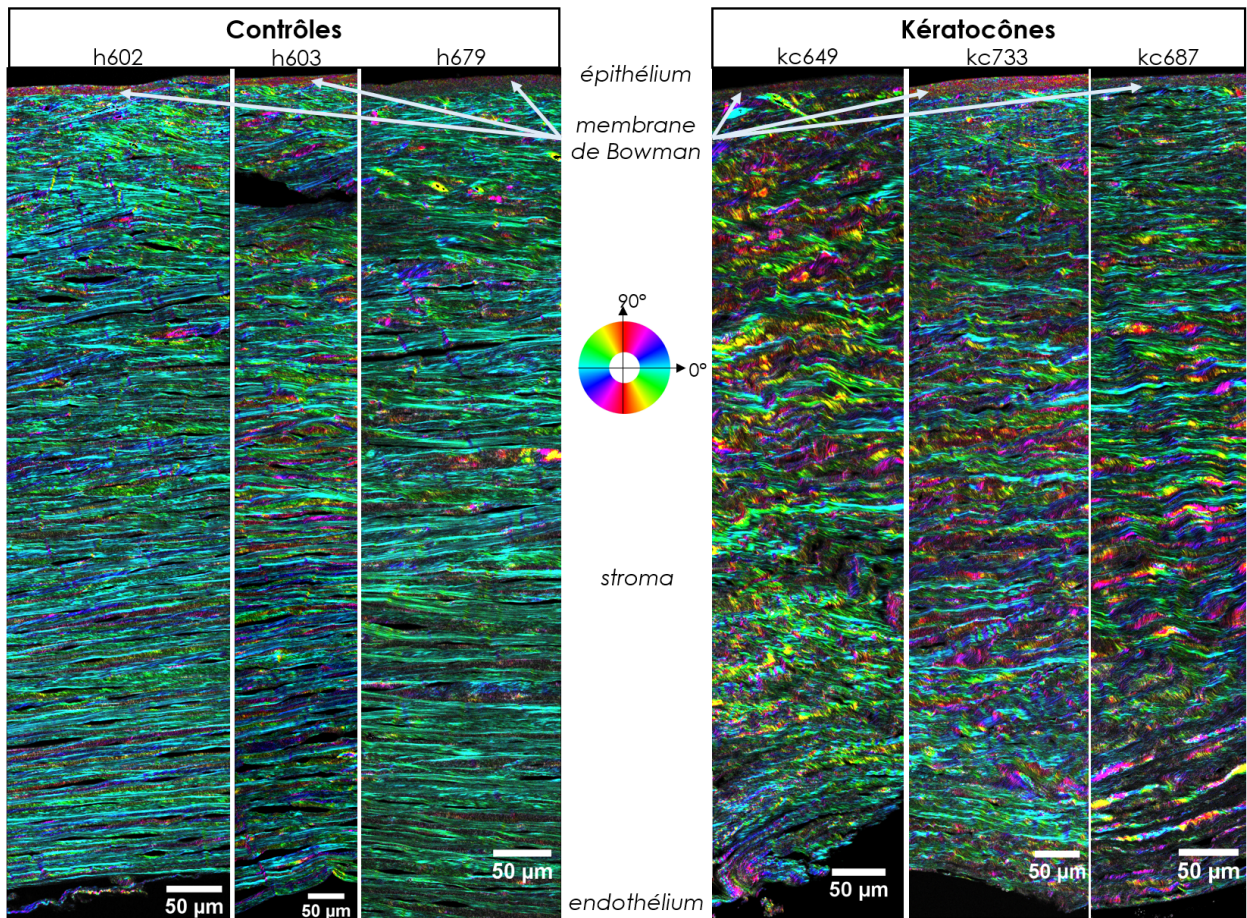


Figure III.19 – Imagerie P-SHG de coupes transverses de cornées humaines (à gauche : les trois cornées contrôles, à droite : les trois cornées kératocôniques). Les images sont présentées dans la table de couleur HSV, où la teinte (Hue) représente l'orientation dans le plan φ et la luminosité (ou valeur) indique l'intensité SHG (moyennée sur toutes les polarisations linéaires). L'équivalence teinte/orientation est donnée par la roue centrale.

de Bowman est bien visible sur chaque coupe (en rose) et permet de repérer le côté de l'épithélium. Les lamelles donnant un signal de SHG exploitables sont surtout les lamelles dont les fibrilles sont parallèles au plan d'imagerie. Nous avons volontairement orienté l'échantillon sous le microscope de façon à ce que ces lamelles soient horizontales, c'est-à-dire selon la direction 0° selon notre convention : elles apparaissent donc en bleu/vert sur les cartes d'orientations pour tous les échantillons. Une remarque frappante est la grande homogénéité d'orientations dans les cas sains, contrairement aux kératocônes qui présentent des distributions d'orientations plus larges. Ceci a des conséquences sur l'indice d'orientation, qui indique la proportion de fibrilles alignées suivant la direction princi-

pale (ici 0°), et sur l'entropie du tissu, quantifiant le désordre inter-lamellaire. Ce dernier paramètre a l'avantage d'être pertinent même lorsqu'aucune orientation majoritaire n'est présente (ici l'orientation horizontale prédomine, et l'OI est donc également pertinent). Pour comparer statistiquement les valeurs des paramètres des cornées contrôles et des cornées pathologiques, nous utilisons un test statistique de Wilcoxon-Mann-Whitney (test non paramétrique s'appliquant sur de petits échantillons avec des observations indépendantes, chaque cornée étant ici indépendante) : une p -value est calculée, indiquant une différence significative lorsqu'elle est inférieure à 0.1. Les résultats comparatifs sur toute la hauteur des coupes de cornées sont données sur la figure III.20, dévoilant une différence "significative" pour S et OI : l'entropie du kératocône augmente tandis que son indice d'orientation diminue, comme attendu. Même si le test statistique indique ici des résultats significatifs, nous parlerons plutôt de tendances au vu du faible nombre d'échantillons étudiés. Le paramètre d'anisotropie quant à lui ne semble pas présenter de tendance particulière entre les cas sains et les cas pathologiques.

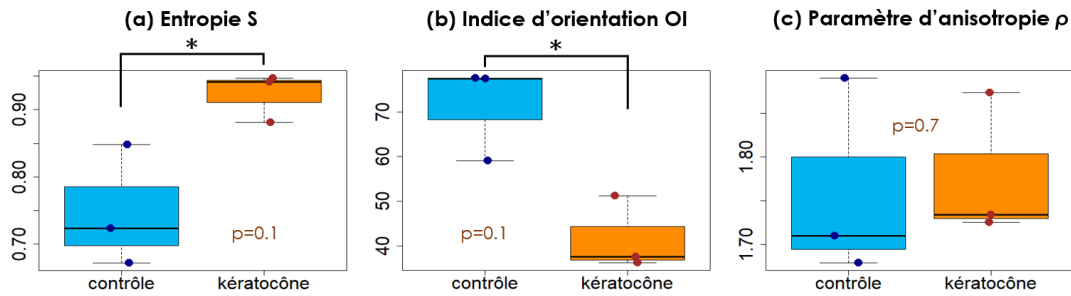


Figure III.20 – Distribution des paramètres de P-SHG, moyennés sur toute la hauteur des coupes de cornée, pour des cornées saines (en bleu) et kératoconiques (en orange). Les p -values ont été calculées sous R avec un test statistique de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Nous avons ensuite regardé l'évolution de ces paramètres sur 3 zones de la cornée : la partie antérieure (côté épithélium), la partie centrale et la partie postérieure (côté endothélium) (Fig. III.21). Les résultats sur les cornées contrôles confirment des travaux publiés en 2016 [83] : la partie antérieure des cornées saines, où les lamelles s'ancrent dans la membrane de Bowman en s'entrelaçant, est plus désorganisée à l'échelle inter-lamellaire (entropie plus forte et indice d'orientation plus faible) que la partie postérieure où les lamelles sont parallèles entre elles et parallèles à l'endothélium. Dans le cas des kératocônes étudiés, l'entropie, resp. l'indice d'orientation, des zones antérieures est plus grande, resp. plus petit, que dans les zones antérieures des cornées saines, et elle augmente, resp. il diminue, davantage en s'éloignant de l'épithélium. Cela montre que la partie postérieure de la cornée serait davantage touchée lors de pathologies de type kératocône, ce qui n'a encore jamais été remarqué dans la littérature.

Le paramètre d'anisotropie ne présente à nouveau pas de tendance intéressante. La faible sensibilité de ce paramètre s'explique ici par le type de coupes étudiées : les coupes transverses de cornée présentent une alternance de lamelles orientées dans le plan d'imagerie et orientées hors du plan d'imagerie. Or le paramètre d'anisotropie est d'une part sensible à l'angle hors-plan ψ (voir section 1.3 du chapitre II), mais également très impacté au niveau des interfaces entre deux lamelles [81, 92]. Une façon d'améliorer la pertinence de ce paramètre est ici de ne considérer que les pixels de forte intensité SHG (appartenant à une lamelle dans le plan) et présentant un fort coefficient de détermination R^2 (pixel à l'intérieur d'une lamelle et non pas sur une interface qui fait chuter le R^2). Nous avons alors légèrement modifié le calcul de ρ : pour chaque pixel (i,j,k) d'une pile d'images, nous cherchons le plan Z sur lequel le coefficient R^2 en (i,j,Z) est maximal, ce qui permet de former, pour ρ et pour $I^{2\omega}$, des cartes 2D correspondant aux pixels (i,j,Z) . Dans un deuxième temps, un filtrage est effectué sur la valeur de l'intensité SHG $I^{2\omega}$. Nous ne gardons que les pixels (i,j,Z) pour lesquels l'intensité est au moins égale à 20 % de l'intensité maximale. Un paramètre d'anisotropie moyen est alors calculé avec les pixels restants, puis les ρ moyens de chaque zone d'une même coupe sont à leur tour moyennés, de façon à obtenir un unique paramètre ρ par cornée. Ces paramètres d'anisotropie "filtrés"

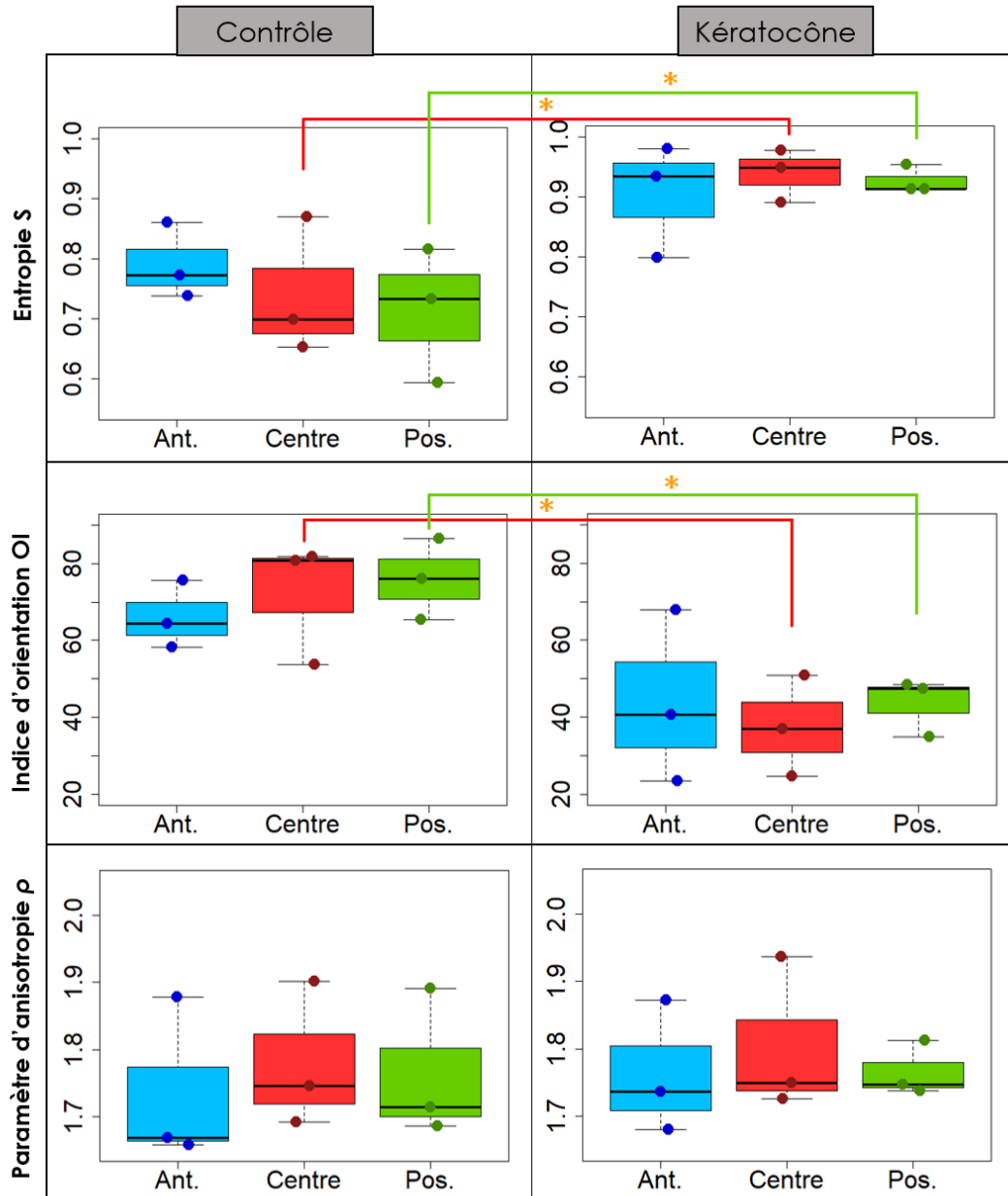


Figure III.21 – Distribution des paramètres de P-SHG, moyennés sur différentes parties de la coupe de cornée : partie antérieure (côté épithélium, en bleu), centrale (en rouge) et postérieure (côté endothélium, en vert), dans le cas de cornées saines (en haut) et kératoconiques (en bas). Une étoile orange indique un cas où le test de Wilcoxon-Mann-Whitney comparant la distribution contrôle et la distribution kératocône donne une p -value < 0.1.

sont visibles en figure III.22. Une tendance du ρ à augmenter dans le cas d'un kératocône semble se distinguer, mais les résultats ne sont pas significatifs, principalement à cause de la cornée contrôlée *h679* qui présente un paramètre d'anisotropie fort. Il n'est pas exclu que cette cornée soit dégradée ou présente une pathologie autre qu'un kératocône, et il faudrait alors répéter cette analyse sur un plus grand nombre d'échantillons.

Nous avons souhaité pour cette étude utiliser de grands champs de vue, impliquant une taille pixel importante (423 μm), de façon à analyser la coupe de cornée sur toute sa hauteur : de l'épithélium à l'endothélium. Nous avons ainsi pu visualiser par P-SHG le fort impact du kératocône sur toute la cornée, et notamment sur sa partie postérieure. Une étude consécutive a été réalisée par Marion Bied

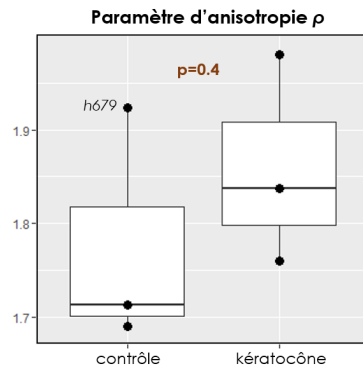


Figure III.22 – Paramètres d’anisotropie des cornées saines (à gauche) et des cornées kératoconiques (à droite), après sélection des R^2 maximaux et filtrage sur des intensités $I^{2\omega} > I_{max}^{2\omega}$. La p -value a été calculée sous R avec un test statistique de Wilcoxon-Mann-Whitney.

lors de son stage au laboratoire en mai-juin 2019, se focalisant sur la partie antérieure de la cornée, avec des champs de vue d’environ 100 μm de largeur [134]. Une différence d’ancrage des lamelles dans la membrane de Bowman n’a pas été confirmée, en contradiction avec la littérature actuelle. Toutefois, une grande hétérogénéité de structures entre les kératocônes a été mise en avant, ce qui peut s’expliquer par la diversité des facteurs induisant un kératocône : différents mécanismes peuvent induire des altérations structurales menant aux mêmes symptômes macroscopiques de kératocône, mais donnant des hétérogénéités d’organisation à l’échelle microscopique.

En conclusion, lors de cette étude, nous avons comparé en P-SHG des coupes transverses de cornées saines et de kératocônes humains. Les paramètres quantifiant le degré d’organisation et le désordre inter et intra-lamellaire, extraits grâce à la P-SHG, présentent des tendances intéressantes entre les deux états de cornée : cette technique semble prometteuse pour caractériser de telles pathologies et explorer l’altération de la structure fine de la cornée. Toutefois, au vu de la grande diversité de kératocônes, il est nécessaire de rassembler un très grand nombre d’échantillons pour chaque étude. Or, les explants opératoires ne sont souvent pas disponibles pour la recherche. De plus, les kératocônes humains étudiés ne concernent que les stades avancés de la pathologie, voire les kératocônes aigus, puisqu’ils sont issus d’une kératoplastie. L’induction volontaire de kératocônes chez l’animal serait une solution à ces problématiques : un nombre plus important d’échantillons peut être analysé, des stades intermédiaires de la maladie sont accessibles à l’étude, et il est possible d’y tester des méthodes thérapeutiques. Cela a incité le développement de modèles de kératocône sur des animaux de laboratoire, notamment sur la souris.

2.3 Modèle murin de pathologie structurale cornéenne

Aucun cas "naturel" de kératocône n’est connu chez la souris, et si cette pathologie est à prédisposition génétique, aucun gène n’a encore été impliqué de façon significative dans l’apparition du kératocône. Il est alors nécessaire de développer un modèle alternatif qui induit des symptômes similaires à ceux connus du kératocône. Nous étudions dans cette partie la pertinence d’un modèle murin de kératocône développé par le groupe du Prof. Borderie à l’Institut de la Vision et l’hôpital des Quinze-Vingt (Paris). Ce modèle sert notamment de support au développement d’une méthode thérapeutique par injection de cellules souches stromales.

2.3.1 Description du modèle animal

Dans ce modèle, une pathologie de type kératocône est simulée chez la souris par induction d’un stress sur la cornée de l’animal. La cornée va alors répondre à ce stress en modifiant sa structure, et il est supposé que cette nouvelle organisation est similaire à celle d’un kératocône. Le stress est induit par un traitement manuel mécanique en deux étapes : dans un premier temps, l’épithélium cornéen

est retiré par grattage, puis un coton-tige imbibé d'azote liquide est appliqué sur la cornée privée de son épithélium pendant 5 secondes (Fig. III.23⁴). Une réaction immédiate de la cornée est constatée avec l'apparition d'un halo blanc en surface juste après l'application d'azote liquide, puis la cornée retourne rapidement à son état visuel normal (disparition du halo blanc). Ce procédé est effectué sur l'œil gauche de la souris (OG) uniquement, que l'on désigne alors par œil traité, l'œil droit (OD) servant de contrôle.

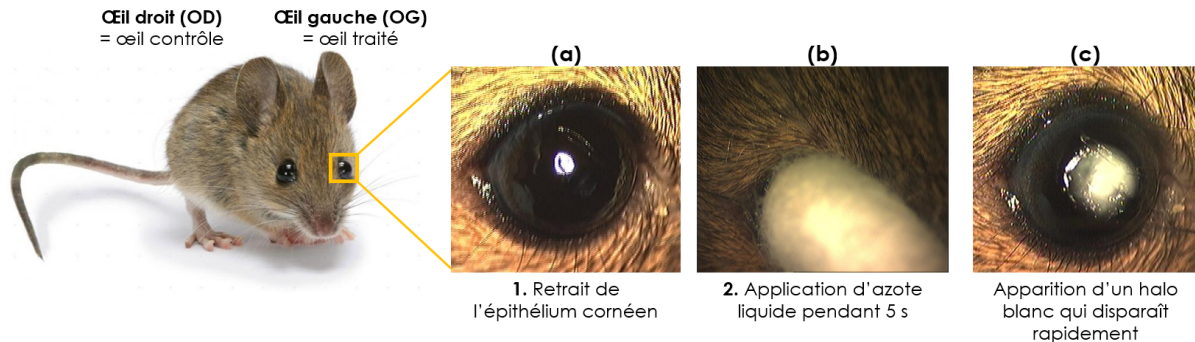


Figure III.23 – Induction d'une pathologie cornéenne sur animal en deux étapes (a) et (b). (c) Réaction immédiate mais temporaire de la cornée. Le traitement est effectué sur l'œil gauche des animaux uniquement, l'œil droit étant le contrôle.

Des tests expérimentaux préliminaires, non quantitatifs, sur des premières souris ont été effectués à l'Institut de la Vision et ont montré des similarités entre ce modèle et des caractéristiques de kératocône, principalement liées aux transformations cellulaires et à un remodelage de la matrice extracellulaire. En particulier, avec ce modèle, on s'attend à une activation importante des myofibroblastes face à l'agression externe, qui se mettent à produire du collagène de type III, induisant ainsi une fibrose stromale. Une fibrose peut être identifiée par une hyper-réflexivité caractéristique en imagerie OCT, ou encore par un désordre local du collagène mesurable en P-SHG. Dans le but de confirmer les premières tendances et, le cas échéant, de valider ce modèle animal comme modèle de kératocône, nous avons mené une étude quantitative en P-SHG sur des cornées entières de souris traitées, en parallèle de mesures d'hyper-réflexivité en OCT fréquentielle (SD-OCT), effectuées *in vivo* par Djida Ghoubay à l'Institut de la Vision.

2.3.2 Implémentation expérimentale spécifique et protocole de mesures

Afin de nous placer dans la même configuration d'imagerie qu'en OCT (imagerie *en-face*), les mesures de P-SHG ont été conduites sur cornées entières fixées de souris, et non pas sur des coupes transverses. Cela a l'avantage d'offrir plus de pixels pour l'analyse quantitative : toute la surface peut être imagée, et une imagerie en profondeur est effectuée à chaque zone, rendant possible une reconstruction en coupes transverses *a posteriori*.

Après prélèvement sur l'animal, les cornées sont fixées dans du PFA 4 % puis conservées dans une solution de PBS. Contrairement aux coupes transverses de cornée découpées dans la résine et déposées sur une lamelle de microscopie, l'imagerie de cornées entières nécessite une étape supplémentaire de préparation de l'échantillon. Lors de mesures préliminaires, 4 incisions ont été effectuées sur chaque cornée de façon à relâcher les contraintes de courbure et pouvoir les aplanir entre deux lamelles. Nous avons constaté que ces incisions, effectuées seulement sur les bords, pouvaient s'étendre spontanément jusqu'au centre de la cornée, atteignant potentiellement des zones imagées. De plus, aplanir la cornée lui fait complètement perdre sa forme physiologique : cela a un impact structurel, ce qui n'est pas compatible avec une étude non biaisée d'une pathologie comme le kératocône qui affecte en partie la structure cornéenne. Un nouveau support d'échantillon a alors été conçu pour pouvoir imagier les

4. Désolée pour les âmes sensibles, ce traitement est cruel. Heureusement, les animaux sont endormis pendant l'opération.

cornées en conservant leur courbure physiologique (Fig. III.24). Nous utilisons pour soutenir les cornées des lentilles demi-billes (Edmund Optics) de 3 mm de diamètre, de courbure similaire à celle d'une cornée de souris (rayon de courbure ≈ 1.4 mm [135]), placées sur une lamelle de verre ronde s'insérant dans un porte-échantillon métallique en deux parties vissables. Entre la lentille, sur laquelle est déposée la cornée, et la partie haute du porte-échantillon, nous ajoutons une rondelle en résine trouée au centre. Le diamètre du trou est équivalent à celui de la lentille, de façon à pouvoir enserrer l'échantillon sur les bords (la cornée est donc maintenue aux bords par la rondelle en résine, s'appuyant en pratique sur la sclère présente à l'issue de la dissection de l'œil).

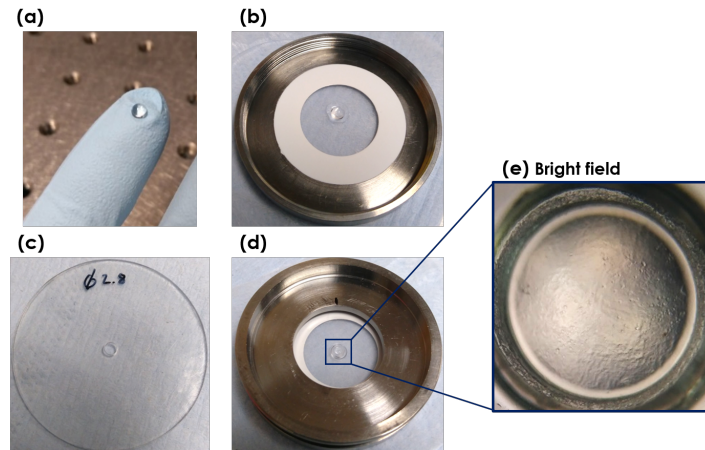


Figure III.24 – Support d'échantillon utilisé pour imaginer des cornées entières de souris en respectant leur forme physiologique. (a) Lentille en forme de demi-bille, de 3 mm de diamètre (*ie* rayon de courbure de 1.5 mm). (b) Cette lentille est placée sur une lamelle de verre ronde d'épaisseur 170 μm , maintenue dans un porte-échantillon métallique. (c) Rondelle en résine, avec un trou de 2.8 mm de diamètre en son centre. (d) La cornée est déposée avec une goutte de PBS sur la lentille, la rondelle est placée au dessus pour la maintenir par la sclère, puis la partie haute du porte-échantillon métallique est vissée par dessus. (e) Imagerie en microscopie *bright-field* pour visualiser toute la cornée (champ de vue d'environ 3 mm x 3 mm).

Trois séries d'expériences en P-SHG ont été réalisées. Les première et deuxième séries comparent les cornées contrôle (OD) aux cornées traitées à l'azote (OG), respectivement 3 semaines et 3 mois après application de l'azote. Une méthode thérapeutique par injection de cellules souches ayant été conçue par les mêmes collaborateurs, nous avons inclus à notre étude une troisième série d'expériences pour analyser l'effet de ces injections sur des cornées de souris traitées à l'azote. Pour chaque série, six souris ont été sacrifiées, soit 6 yeux traités et 6 yeux contrôles imagés en SHG. Pour chaque œil, une imagerie SHG standard (en polarisation circulaire pour ne favoriser aucune direction) est effectuée au centre de la cornée sur toute son épaisseur avec un grand champ de vue (540 μm x 540 μm , taille pixel 560 nm), puis 4 zones avec un plus petit champ de vue (152 μm x 152 μm , taille pixel 400 nm), dont une centrale et 3 légèrement en périphérie, sont imagées en P-SHG sur toute l'épaisseur de la cornée, avec des pas en Z de 2 à 3 μm . Les mesures de SHG utilisées sont celles vers l'avant (signaux *forward*), car l'échantillon étant assez fin (environ 50 μm) et transparent, son signal *backward* est inexploitable. Enfin, l'imagerie par SD-OCT a été réalisée *in vivo* sur les souris de chaque série par Djida Ghoubay, à plusieurs dates et également juste avant le sacrifice de l'animal.

2.3.3 Résultats

Nous présentons ici les résultats obtenus pour les trois séries d'expériences. Les mesures de P-SHG sur chaque zone imagée nous donnent accès au paramètre d'anisotropie ρ de chaque pixel, que nous moyennons sur l'ensemble de l'image et sur différentes profondeurs (moyenne sur toute l'épaisseur de la cornée ou seulement sur les parties antérieure ou postérieure du stroma), après avoir filtré les pixels pour garder ceux dont le coefficient de détermination R^2 est supérieur à 0.7. Nous obtenons aussi une

entropie S que nous moyennons sur les profondeurs considérées⁵. À chaque zone imagée correspond donc un paramètre d'anisotropie moyenné ρ et une entropie moyennée S . Enfin, comme plusieurs zones sont imagées sur une même cornée, nous effectuons à nouveau un moyennage des paramètres sur l'ensemble des zones pour obtenir 2 paramètres moyens, ρ et S , par cornée. Nous utilisons ensuite un test statistique de Wilcoxon apparié (ou test des rangs signés de Wilcoxon, test non paramétrique s'appliquant sur de petits échantillons avec des observations non indépendantes) pour comparer les paramètres moyens des cornées contrôles avec les paramètres moyens des cornées traitées, en prenant en compte que l'œil droit et l'œil gauche d'une même souris ne sont pas indépendants. Une différence significative entre les deux états est alors actée lorsque la p -value du test donnée par R est inférieure à 0.1.

Série 1 : stade précoce (3 semaines)

La première série d'expériences en P-SHG se concentre sur des souris dont l'œil gauche a été traité à l'azote 3 semaines auparavant. La figure III.25 présente des images *en-face* typiques en intensité SHG pour l'œil contrôle (OD) et l'œil traité (OG), accompagnées des cartes de φ correspondantes, à différentes profondeurs.

On remarque premièrement que l'intensité SHG moyenne par plan diminue avec la profondeur d'imagerie (attendu à cause de la diffusion dans le tissu), mais ré-augmente légèrement sur les 10 derniers micromètres. Cette légère amplification du signal de SHG du côté de l'endothélium pourrait être due à la membrane de Descemet. Ce comportement de l'intensité SHG nous incite à considérer trois tranches d'épaisseurs distinctes de la cornée pour moyennner les paramètres (en plus des moyennes sur l'épaisseur totale) : la partie antérieure proche de l'épithélium, la partie postérieure proche de l'endothélium, et une partie centrale présentant une intensité SHG et un coefficient de détermination R^2 moyens plus faibles, la rendant sans doute moins pertinente que les deux autres zones.

Une deuxième remarque concerne l'organisation générale du collagène dans les cornées de souris, très différente de l'organisation en lamelles connue chez l'Homme. Pour chaque plan en Z , le collagène est orienté de manière quasi-isotrope, alors qu'il présente une orientation majoritaire chez l'Homme (ou deux si l'on focalise sur une interface) [81, 83]. Cette organisation isotrope se retrouve aussi bien sur l'œil droit que sur l'œil gauche des souris : le traitement à l'azote ne semble affecter directement ni la structure globale visible sur les images de SHG, ni la distribution des angles φ sur les cartes d'orientations dans le plan, autrement dit, le traitement ne semble pas induire de désordre à l'échelle de l'image. Ceci est confirmé par l'absence de variation significative de l'entropie moyenne S entre les cornées contrôles et les cornées traitées, quel que soit l'intervalle d'épaisseurs considéré (Fig. III.26 (a)). Pour étudier le désordre local, à l'échelle des fibrilles, potentiellement induit par l'application d'azote, nous regardons la variation du paramètre d'anisotropie (Fig. III.26 (b)). Là encore, pour tous les intervalles d'épaisseurs considérés, aucune différence significative n'est repérée entre les cornées contrôles et les cornées traitées, traduisant des micro-organisations de fibrilles similaires pour les deux états.

Par ailleurs, nous avons comparé les reconstructions transverses des piles d'images *en-face*, équivalentes à des coupes transverses, des cornées contrôles et des cornées traitées (Fig. III.27). Bien que nos pas en Z soient relativement grands (entre 2 et 3 μm) et dégradent la résolution, on ne constate pas de différences caractéristiques, comme celles observées chez l'homme en section 2.2.2, entre une cornée saine et un cas kératoconique de stade avancé.

Par conséquent, soit aucun kératocône n'a été induit par l'application de l'azote, soit le kératocône n'est pas assez évolué au bout de 3 semaines pour être détecté par P-SHG. Ce dernier cas impliquerait que la technique de P-SHG n'est pas suffisamment sensible pour diagnostiquer des stades de pathologies cornéennes très précoces. Cette absence de pathologie détectable a été confirmé par les résultats en OCT, présentés en figure III.28, qui donnent des intensités (niveaux de gris) similaires pour l'OD et l'OG, sans présence d'hyper-réflexivité. Autrement dit les cornées traitées n'ont en moyenne pas

5. L'indice d'orientation OI, qui a le défaut de considérer une seule orientation majoritaire, a également été calculé mais n'est pas présenté ici, car non significatif.

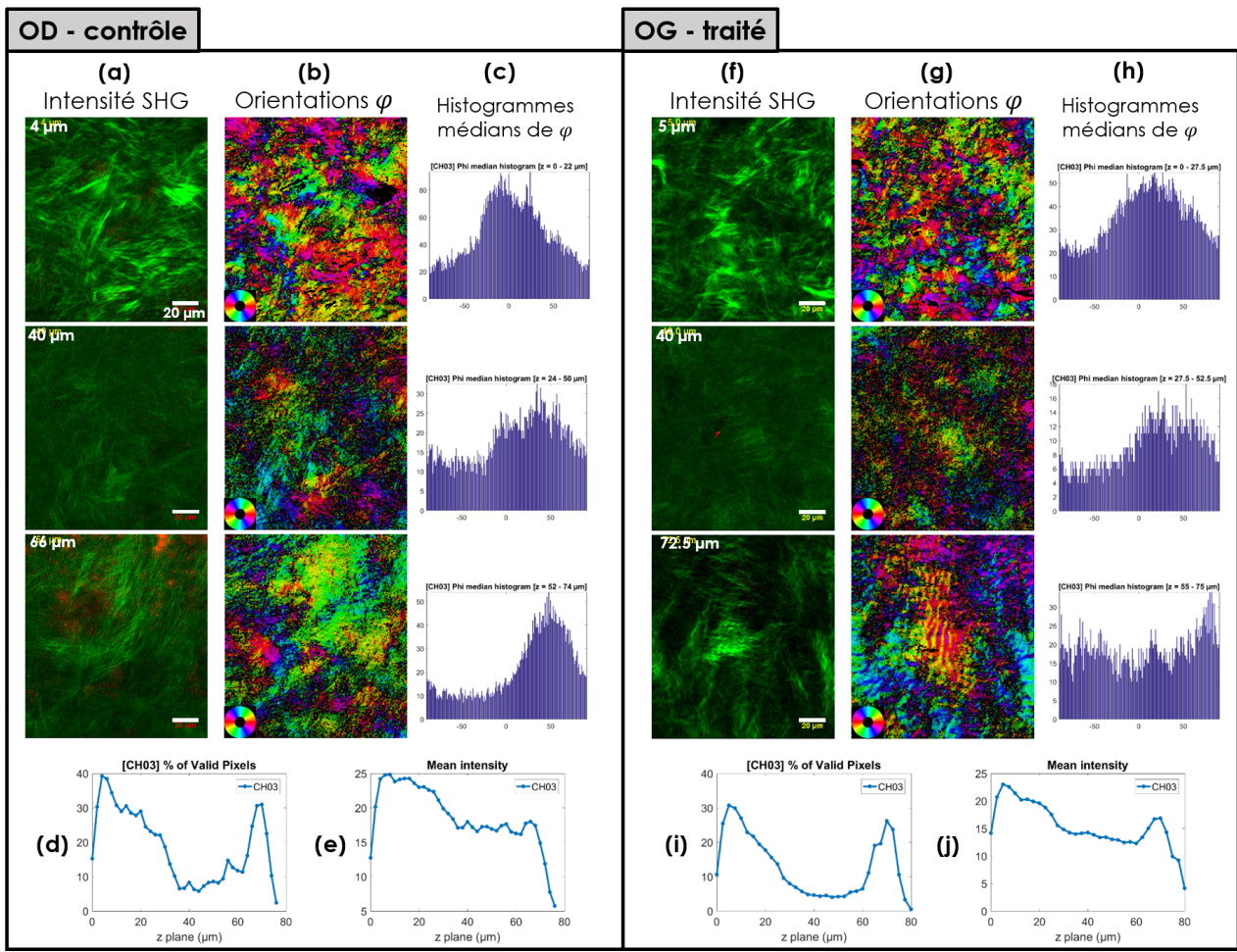


Figure III.25 – Résultats des mesures en P-SHG sur la souris #195 de la série 1. À gauche (a-e) : résultats de la zone centrale de la cornée contrôlée (OD), à droite : résultats de la zone centrale de la cornée traitée (OG). (a)(f) Images en intensité SHG (en vert) et 2-PEF (en rouge et (b)(g) cartes des φ correspondantes, à différentes profondeurs. Chaque couleur indique une orientation dans le plan donnée par la roue dans l'angle sud-ouest. (c)(h) Histogrammes représentant la distribution médiane des orientations φ sur plusieurs profondeurs d'imagerie ($\sim 25 \mu\text{m}$). De haut en bas : distribution d'orientations sur la partie antérieure ($\sim 0 - 25 \mu\text{m}$), la partie centrale ($\sim 25 - 50 \mu\text{m}$) et la partie postérieure ($\sim 50 - 75 \mu\text{m}$) de l'épaisseur de la cornée. (d)(i) Pourcentage de pixels valides (après filtrage sur l'intensité et sur R^2) au sein de l'image en fonction de la profondeur d'imagerie. (e)(j) Intensité moyenne sur l'image en fonction de la profondeur d'imagerie.

(encore ?) développé de fibrose.

Série 2 : stade évolué (3 mois)

La deuxième série d'expériences implique des souris dont l'œil gauche a été traité à l'azote 3 mois avant sacrifice. Ainsi, si le modèle testé est valide, un kératocône à un stade évolué, ainsi que la fibrose attendue, devraient cette fois être détectables, levant l'ambiguïté de la série 1.

Mais contre toute attente, les entropies et les paramètres d'anisotropie des cornées contrôlées et des cornées traitées ne présentent pas de différence significative sur toute l'épaisseur de la cornée (Fig. III.29). On constate en fait une grande variabilité d'un individu à l'autre : certaines souris présentent un OG traité dont ρ et S augmentent par rapport à l'OD, d'autres, à l'inverse, voient le ρ et le S de leur OG diminuer, et enfin pour certaines souris, ρ et S ont des évolutions opposées. Mais globalement, le désordre local donné par le paramètre d'anisotropie ρ n'augmente pas pour les cornées OG, indiquant que la micro-organisation des fibrilles des cornées traitées ne diffère pas de celle des cornées contrôlées. L'augmentation de l'entropie S des cornées traitées est quant à elle plus importante

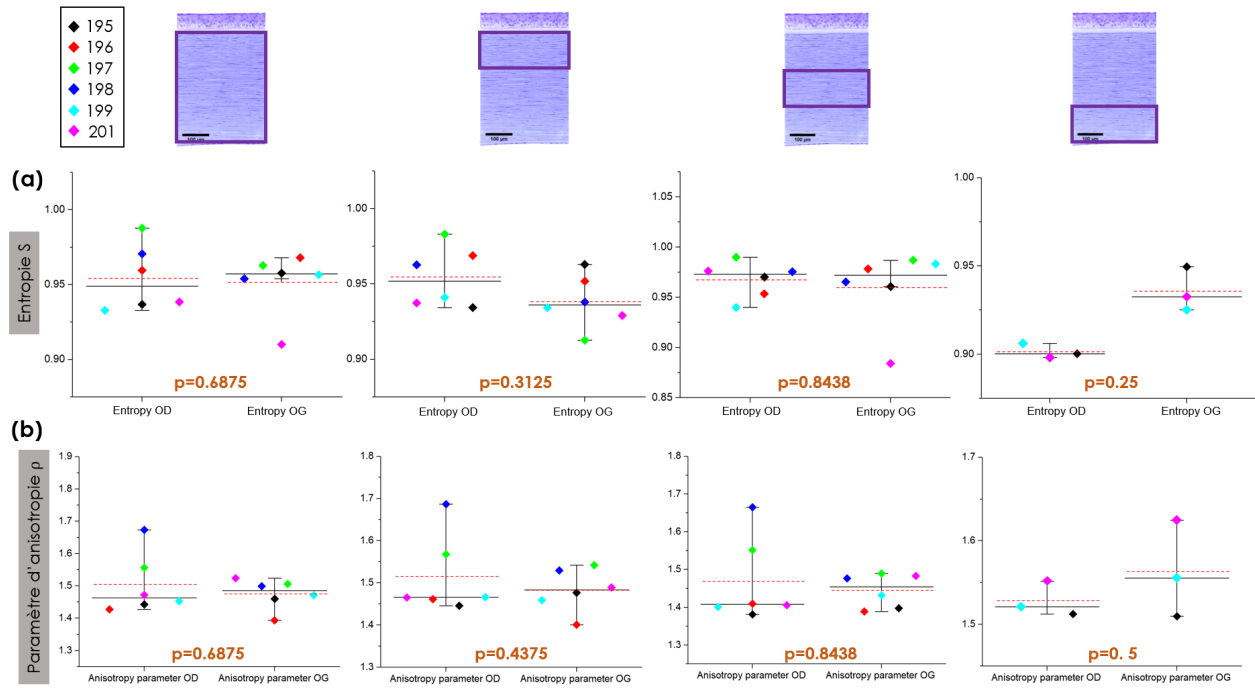


Figure III.26 – Distribution des paramètres de P-SHG sur cornées contrôles (OD, à gauche) et cornées traitées (OG, à droite) de la série 1 : (a) l'entropie S et (b) le paramètre d'anisotropie ρ , moyennés sur différentes tranches d'épaisseurs de la cornée (de gauche à droite : cornée entière, partie antérieure, partie centrale et partie postérieure). Chaque losange a une couleur correspondant au numéro de souris, donné dans la légende. Les traits noirs horizontaux indiquent la médiane des distributions, les traits rouges en pointillés la moyenne. Les p -values ont été calculées sous R avec un test des rangs signés de Wilcoxon.

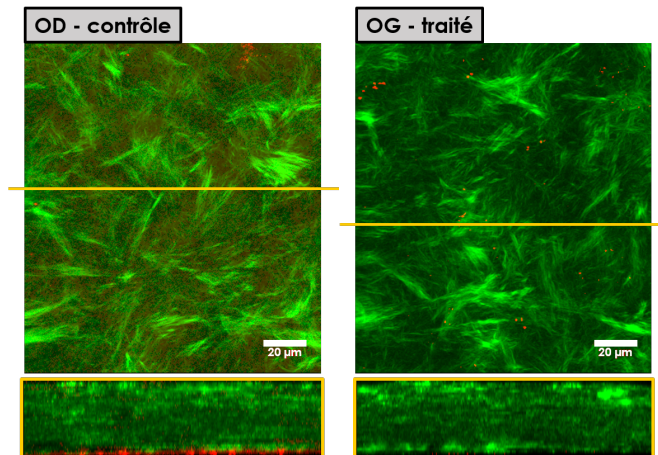


Figure III.27 – Vues *en-face* XY des cornées OD et OG de la souris #195 (série 1), obtenues par *Maximum Intensity Projection* sous ImageJ, et vues transverses XZ reconstruites le long du trait jaune. L'intensité SHG du collagène est en vert et l'intensité 2-PEF provenant des cellules (notamment de l'endothélium) est en rouge. Barre d'échelle 20 μm .

que lors de la série 1, et l'entropie des OG est même significativement supérieures à l'entropie des OD pour la partie postérieure des cornées. Malheureusement, cette faible tendance n'est pas reproduite de manière significative sur les autres tranches d'épaisseur de la cornée. De plus, les reconstructions orthogonales des piles d'images *en-face* ne présentent visuellement aucune différence d'angle ou de désordre caractéristique (Fig. III.30). Ces résultats ne nous permettent donc pas de valider le modèle animal proposé comme un modèle de kératocône.

Pourrait-il alors s'agir uniquement d'un modèle de fibrose, entraînant une activation des myofibro-

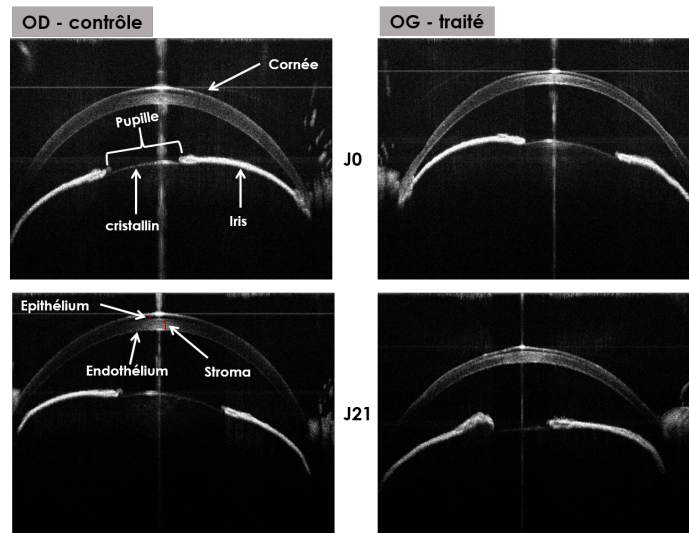


Figure III.28 – Coupes transverses des yeux contrôles (OD) et traités (OG) de la souris #195 (série 1) obtenues par SD-OCT, avant l'application de l'azote (J0) et trois semaines après l'application (J21). Source : Djida Ghoubay, Institut de la Vision.

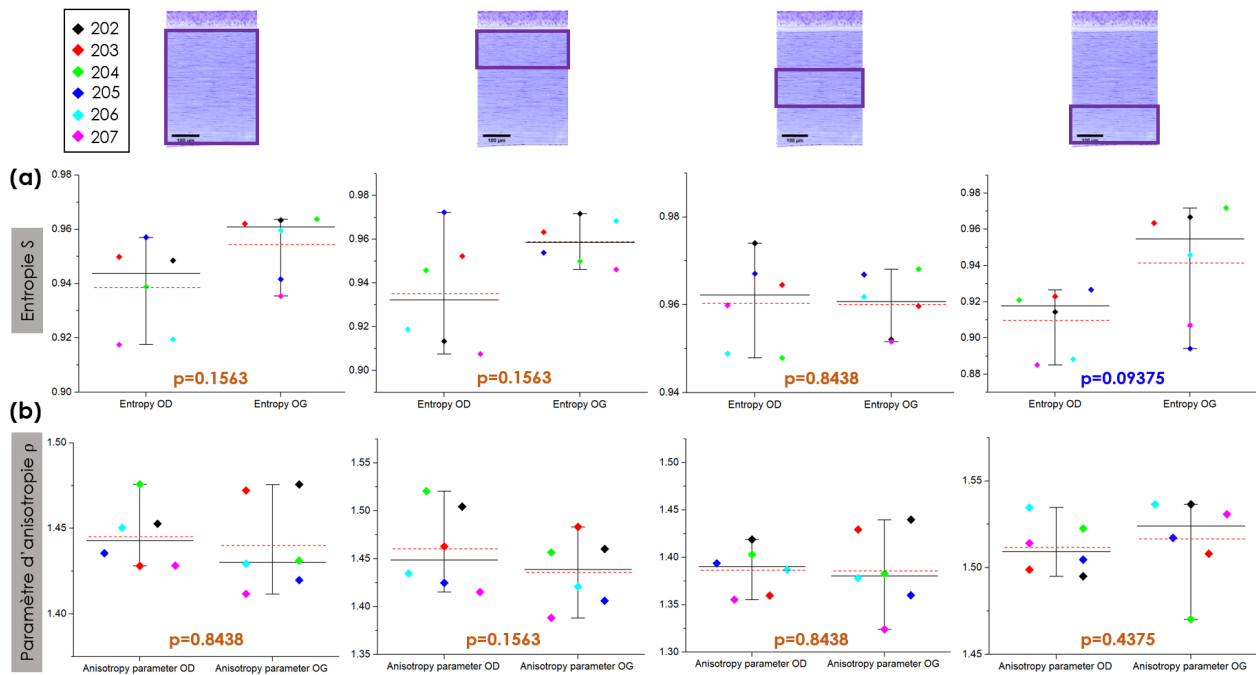


Figure III.29 – Distribution des paramètres de P-SHG sur cornées contrôles (OD, à gauche) et cornées traitées (OG, à droite) de la série 2 : (a) l'entropie S et (b) le paramètre d'anisotropie ρ , moyennés sur différentes tranches d'épaisseurs de la cornée (de gauche à droite : cornée entière, partie antérieure, partie centrale et partie postérieure). Chaque losange a une couleur correspondant au numéro de souris, donné dans la légende. Les traits noirs horizontaux indiquent la médiane des distributions, les traits rouges en pointillés la moyenne. Les p -values ont été calculées sous R avec un test des rangs signés de Wilcoxon.

blastes et une légère désorganisation du stroma postérieur indiquée par la faible augmentation de S ? Si l'on s'intéresse non pas aux paramètres de P-SHG mais à l'intensité SHG obtenue en polarisation circulaire sur les grands champs de vue (avec des puissances incidentes similaires pour toutes les images, entre 5 et 10 mW), nous constatons que la moyenne sur tous les pixels des intensités SHG maximales en Z est significativement plus grande pour l'œil traité que pour l'œil contrôle (Fig. III.31). Ces moyennes sont obtenues en projetant les images de toute l'épaisseur de la cornée suivant une projection d'inten-

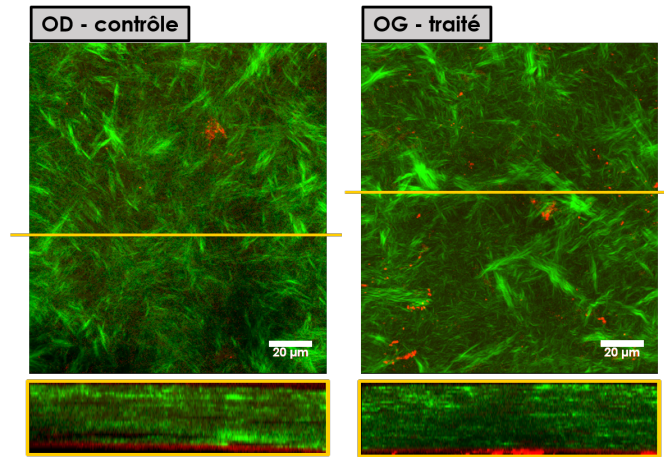


Figure III.30 – Vues *en-face* XY des cornées OD et OG de la souris #203 (série 2), obtenues par *Maximum Intensity Projection* sous ImageJ, et vues transverses XZ reconstruites le long du trait jaune. L'intensité SHG du collagène est en vert et l'intensité 2-PEF provenant des cellules (notamment de l'endothélium) est en rouge.

sité maximale : pour chaque point du champ de vue, seul le pixel le plus brillant de la pile d'images en Z est conservé, ce qui donne une image avec les intensités maximales dont nous prenons la moyenne. Qu'une telle moyenne soit plus importante pour l'OG que pour l'OD peut indiquer un nombre plus important de points chauds (zones où l'intensité SHG est plus forte) sur la cornée traitée, qui pourrait être lié à un excès de collagène III produit lors de la fibrose. Toutefois, cette étude des intensités SHG est critiquable et peut présenter des biais d'analyse. Tout d'abord, même si les puissances incidentes du laser utilisées pour les imageries de chaque cornée sont toutes du même ordre de grandeur, elles sont à chaque fois optimisées spécifiquement pour la P-SHG de l'échantillon et varient entre 5 et 10 mW. Les moyennes présentées en figure III.31 sont en fait pondérées par le carré de la puissance incidente utilisée à chaque expérience pour compenser ce premier biais. Ensuite, les propriétés optiques linéaires sont différentes d'un échantillon à l'autre, car les cornées peuvent être plus ou moins épaisses et plus ou moins œdémateuses, donc plus ou moins diffusantes, modifiant l'intensité détectée.

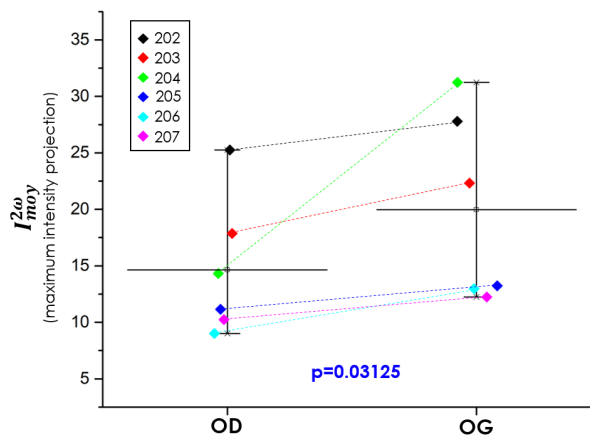


Figure III.31 – Intensités SHG moyennes de la *Maximum Intensity Projection* effectuée sous ImageJ sur les piles d'images en grands champs de vue, pour les cornées contrôles (OD, à gauche), et les cornées traitées (OG, à droite) de la série 2. Chaque losange a une couleur correspondant au numéro de souris, donné dans la légende. Les traits noirs horizontaux indiquent la médiane des distributions. La *p-value* a été calculée sous *R* avec un test des rangs signés de Wilcoxon.

Nous avons alors regardé les résultats de l'imagerie OCT pour confirmer ou infirmer cette fibrose potentielle. Les mesures ont été effectuées à J0, avant l'application de l'azote, puis juste avant le sacrifice des souris, trois mois après l'application (3M). Si une augmentation significative de l'intensité (niveau

de gris) est constatée sur l'OG entre J0 et 3M, l'intensité de l'OD augmente également (Fig. III.32). Ainsi, les taux d'hyper-réflexivité sont similaires pour les deux cornées au bout de 3 mois, semblant indiquer qu'aucune fibrose ou lésion ne s'est spécifiquement développée sur la cornée gauche à la suite du traitement à l'azote.

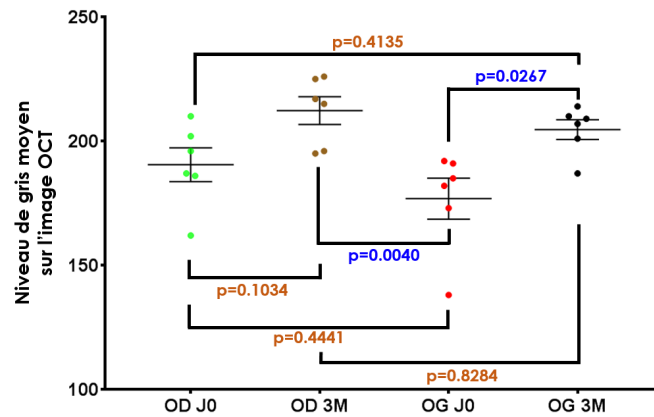


Figure III.32 – Distribution des niveaux de gris moyens mesurés sur les images OCT, de cornées contrôles (OD) ou traitées (OG) de la série 2, à différents temps t : avant l'application de l'azote (J0) et 3 mois après l'application (3M). Les *p-values* ont été calculées sous GraphPad en utilisant un test de Tukey.

En conclusion de cette deuxième série d'expériences, seules l'entropie S sur la partie postérieure du stroma et la moyenne des intensités maximales en Z sont significativement supérieures pour les cornées traitées OG par rapport aux cornées contrôles OD. Un kératocône impliquant une désorganisation du stroma aurait du entraîner une hausse plus franche de l'entropie, sur toutes les tranches d'épaisseurs de la cornée, et impacter également le désordre local avec un paramètre d'anisotropie plus important. Le modèle animal développé n'induit donc pas de pathologie cornéenne de type kératocône, mais semble plus proche d'une lésion cornéenne ou d'une fibrose. Toutefois, l'effet sur la cornée reste très faible au point de n'être pas détectable en SD-OCT.

On pourrait également formuler l'hypothèse d'une régénération cornéenne spontanée de la lésion induite par ce modèle chez la souris : une pathologie se serait peut-être révélée au delà de trois semaines, suivie par une rémission naturelle avant trois mois. Pour vérifier cela, il faudrait rajouter une série d'observations à un point temporel intermédiaire. Toutefois, un tel modèle ne serait pas très pertinent et ne permettrait pas de tester des approches thérapeutiques, qui doivent être observées sur une certaine durée pour constater leurs effets.

Série 3 : injection de cellules souches

Le développement du modèle animal avait notamment pour but de tester une méthode thérapeutique par injection de cellules souches stromales, pour traiter des kératocônes ainsi que des opacités cornéennes liées à des fibroses (l'idée d'une thérapie par cellules souches est détaillée en section 2.1). Si la série 2 n'a pas indiqué de lésion franche induite par le modèle, il est tout de même intéressant d'étudier des cornées de souris injectées par ces cellules souches pour visualiser leur migration.

Le protocole de la série 3 a suivi 3 étapes :

- J0 : traitement à l'azote liquide sur les deux yeux (OG et OD).
- J21 : 3 semaines après application de l'azote, injection de cellules souches stromales (SSC) murines et du milieu véhicule (nécessaire à l'injection des SSC) dans la cornée droite (OD) et injection du simple véhicule dans la cornée gauche (OG).
- J21+3M : 3 mois après l'injection des SSC dans l'OD, les souris sont sacrifiées et leurs cornées sont imagées en P-SHG.

Les mesures OCT ont été effectuées à chaque étape de ce protocole, et sont résumées sur la figure III.33. L'œil droit présente une hausse de l'hyper-réflexivité cornéenne 3 semaines après l'application de

l'azote, puis 3 mois après l'injection de cellules souches stromales, cette hyper-réflexivité baisse et atteint une valeur similaire au cas non traité (J0). L'hyper-réflexivité cornéenne de l'œil gauche quant à elle ne présente aucune augmentation au bout de 3 semaines, et diminue comme chez l'OD 3 mois après l'injection du véhicule seul. Cela montre que la variabilité biologique n'existe pas seulement entre individus mais aussi entre les deux yeux d'une même souris.

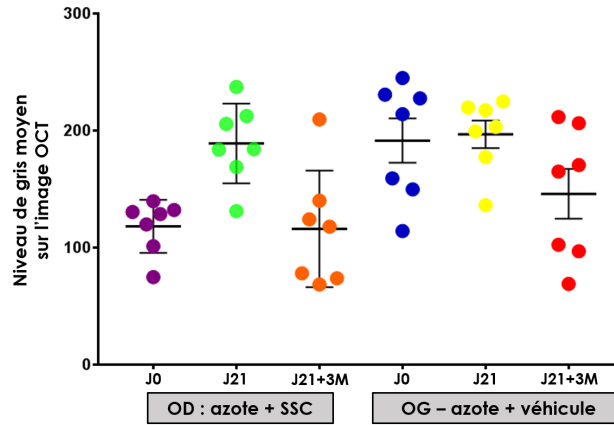


Figure III.33 – Distribution des niveaux de gris moyens mesurés sur les images OCT, des cornées OD et OG de la série 3, à différents temps t : avant l'application de l'azote (J0), 3 semaines après application d'azote sur les deux yeux (J21) et 3 mois après injection de SSC dans l'OD et de véhicule dans l'OG (J21+3M).

Conformément aux mesures OCT, et comme attendu au vu des résultats de la série 2, les paramètres de P-SHG ne présentent aucune différence significative entre l'OD et l'OG (Fig. III.34).

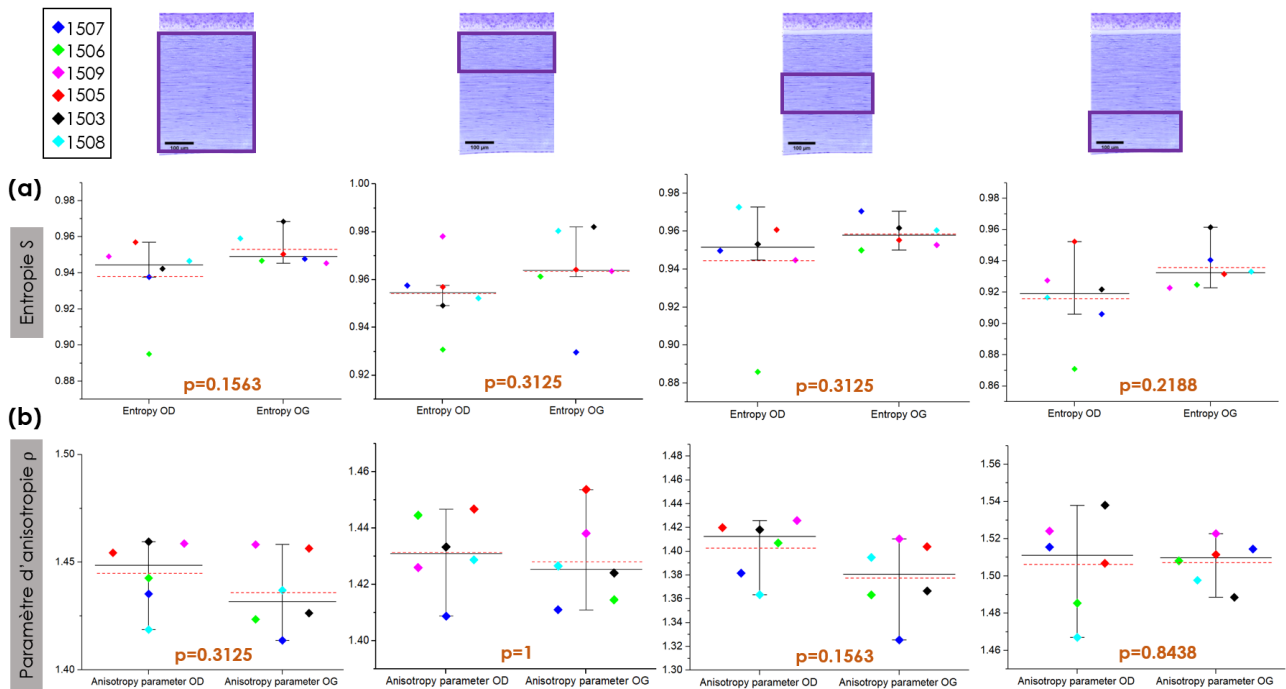


Figure III.34 – Distribution des paramètres de P-SHG sur cornées OD (à gauche) et cornées OG (à droite) de la série 3 : (a) l'entropie S et (b) le paramètre d'anisotropie ρ , moyennés sur différentes tranches d'épaisseurs de la cornée (de gauche à droite : cornée entière, partie antérieure, partie centrale et partie postérieure). Chaque losange a une couleur correspondant au numéro de souris, donné dans la légende. Les traits noirs horizontaux indiquent la médiane des distributions, les traits rouges en pointillés la moyenne. Les p -value ont été calculées sous R avec un test des rangs signés de Wilcoxon.

Un point intéressant de cette série est cependant la visualisation de l'emplacement des cellules souches stromales, à l'aide des reconstructions transverses des piles d'images *en-face* des cornées droites (OD) (Fig. III.35). Les cellules souches sont visibles en fluorescence à 2 photons (en rouge sur les images), car elles ont été marquées avant l'injection, et également en SHG : elles (ou les produits de leur activité) forment une barrière diffusante au delà de laquelle l'intensité SHG détectée est soudainement plus faible. Nous remarquons qu'elles sont majoritairement alignées sur une seule ligne parallèle aux lamelles de collagène. Cela pourrait indiquer qu'un mouvement horizontal entre les lamelles est possible mais que tout mouvement vertical nécessitant de traverser les lamelles perpendiculairement aux fibrilles est proscrit : l'organisation en réseau hexagonal des fibrilles de collagène au sein des lamelles dans le stroma cornéen pourrait être une source de blocage possible des cellules souches stromales.

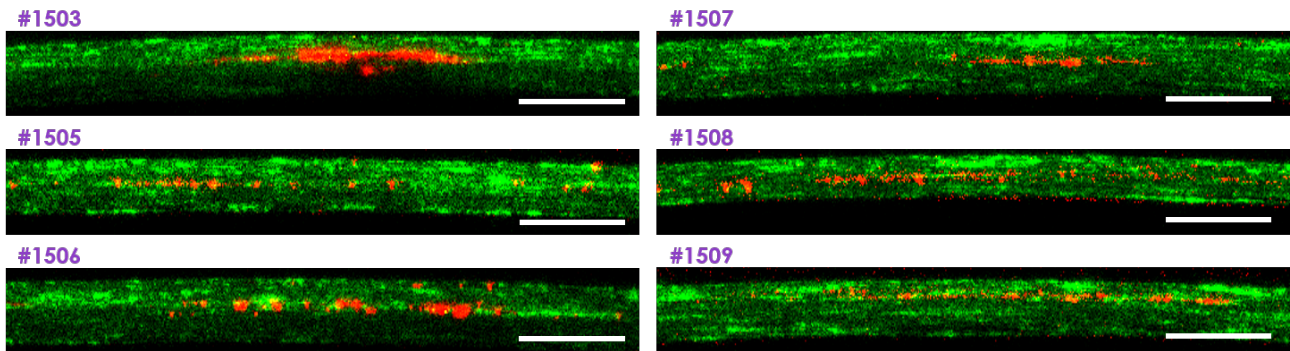


Figure III.35 – Vues orthogonales XZ des cornées OD de la série 3, qui ont subi une injection de cellules souches. L'intensité SHG du collagène est en vert et l'intensité 2-PEF provenant des cellules est en rouge. Barre d'échelle 50 μm .

Remarque supplémentaire : comparaison de l'OCT et de la P-SHG

Le dispositif expérimental développé pour cette étude nous a permis d'imager les cornées entières, et ainsi de comparer les images de P-SHG avec les mesures OCT. Sur quelques cornées individuelles, les mesures OCT donnent des informations similaires aux résultats de P-SHG. Ainsi, la cornée droite de la souris #198 de la première série présente un fort paramètre d'anisotropie ρ (Fig. III.26 (b) et Fig. III.36 (a)), et l'on voit en OCT que cette cornée présente une lésion sur l'apex (probablement une trace de griffure), entraînant une hyper-réflexivité (Fig. III.36 (b)).

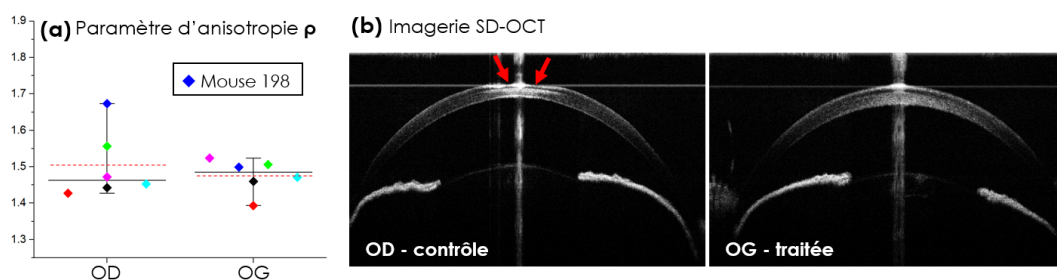


Figure III.36 – (a) Paramètre d'anisotropie (losange bleu) et (b) images en SD-OCT de l'OD et l'OG de la souris #198. Les flèches rouges indiquent une blessure superficielle sur la cornée contrôlée.

Mais la plupart du temps, aucune corrélation directe ne peut être effectuée entre la valeur de ρ et le taux d'hyper-réflexivité (la figure III.37 illustre ce point, avec un coefficient de corrélation très faible). Cela confirme que les échelles sondées par l'une et l'autre des techniques sont différentes, la P-SHG étant restreinte à des champs de vue plus petits mais pouvant caractériser la structure locale. De plus, les origines des signaux sont aussi différentes : la SHG provient des fibrilles de collagène tandis que la présence d'une hyper-réflexivité en OCT traduit une hétérogénéité optique. Ainsi, chaque technique renseigne sur la dégradation de la cornée à son échelle propre, et leurs résultats sont complémentaires.

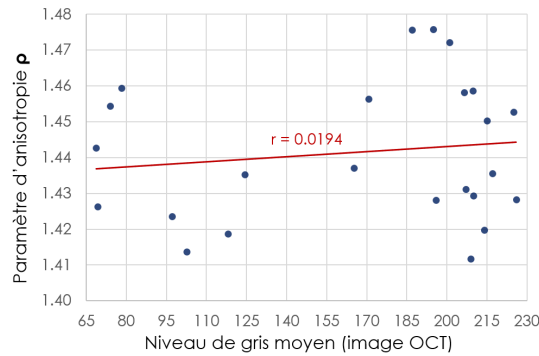


Figure III.37 – Paramètre d’anisotropie en fonction de l’intensité OCT, pour toutes les cornées des séries 2 et 3 (OD et OG). Une droite de régression linéaire apparaît en rouge, avec son coefficient de corrélation r .

2.4 Discussions sur l’outil et sur les modèles

L’intérêt de la microscopie SHG pour étudier l’organisation du collagène dans un tissu transparent comme la cornée a été démontré par de nombreuses études. Nous nous sommes ici spécifiquement intéressé-e-s à la pertinence de la microscopie SHG résolue en polarisation (P-SHG) pour caractériser des pathologies structurales cornéennes. Cet outil permet le calcul de paramètres quantitatifs pour caractériser le désordre local, à l’échelle des fibrilles de collagène, et l’organisation à l’échelle de l’image, correspondant dans la cornée au désordre inter-lamellaire. Ces paramètres semblent effectivement prendre des valeurs caractéristiques dans le cas d’un kératocône avancé humain, permettant de discriminer une cornée saine d’une cornée pathologique. Notre étude sur le kératocône humain a toutefois été limitée par l’hétérogénéité présentée par les cas pathologiques et par le faible nombre d’échantillons disponibles.

Pour contourner les problèmes de disponibilité d’échantillon et pouvoir étudier le kératocône à différents stades, un modèle de kératocône sur souris a été développé à l’Institut de la Vision et l’hôpital des Quinze-Vingt. L’étude par P-SHG de ce modèle a malheureusement montré que les cornées traitées ne présentaient pas les caractéristiques structurales d’un kératocône, et qu’aucune lésion n’était visible aux temps t étudiés (3 semaines et 3 mois après application du traitement). En effet, un kératocône aurait dû induire une modification des angles hors-plan formés par les fibrilles de collagène et une fibrose ou une évolution cicatricielle aurait changé la micro-organisation fibrillaire. Dans tous les cas, une modification du paramètre d’anisotropie ρ était attendue, mais cela n’a pas été détectée. L’entropie S , qui, lorsqu’elle est calculée à partir de l’imagerie *en-face* de cornées, indique l’entrelacement des lamelles et est *a priori* impacté lors d’un kératocône [130–132], n’a pas non plus présenté d’évolution franche. Dans ce cas, il peut toutefois s’agir d’une sensibilité insuffisante de notre technique. En effet, nous avons remarqué que la cornée murine saine est déjà très désorganisée à l’échelle des lamelles : une variation de S correspondrait à un changement de désordre dans un milieu déjà désordonné, non détectable significativement en P-SHG. Nous avons toutefois observé une légère augmentation de S du côté postérieur des cornées traitées ainsi qu’une hausse de l’intensité SHG maximale, 3 mois après l’application du traitement. Ceci pourrait indiquer la présence d’une lésion que la P-SHG n’est pas capable de mettre en évidence par faute de sensibilité, mais une telle lésion n’a pas non plus été confirmée par les mesures en SD-OCT, réalisées sur les mêmes cornées en parallèle de notre étude. Nous n’excluons pas que le modèle induise effectivement une lésion de la cornée, mais nous pouvons seulement constater qu’aucune pathologie cornéenne n’est détectable aux temps t étudiés. Par exemple, le développement d’une fibrose a pu avoir lieu au delà de trois semaines après le traitement à l’azote, suivie d’une régénération spontanée du tissu murin cornéen avant les trois mois attendus pour la série 2.

Une observation majeure est toutefois la grande variabilité inter-individu, mettant en cause la reproductibilité du modèle. L’imagerie OCT a révélé une difficulté dans l’utilisation des animaux, qui pourrait expliquer cette variabilité : des traces de griffures, infligées entre souris, ont été notées sur

une grande partie des cornées étudiées. Un exemple est montré en figure III.38 : la moitié des cornées contrôles de la série 2 présentent des blessures superficielles. Cela a donc pu biaiser l'analyse en introduisant un autre type d'agression externe, en plus de l'application d'azote, les zones griffées ayant toutefois été évitées lors des mesures en P-SHG. La variabilité pourrait également être expliquée par le traitement induisant la pathologie cornéenne : si l'application de l'azote suit un protocole précis, le grattage de l'épithélium n'est en revanche pas standardisé et pourrait être plus ou moins efficace d'une souris à l'autre. Ainsi, l'azote n'affecterait chez certaines souris que la surface de la cornée, sans traverser la membrane de Bowman. Ce type de dommages superficiels cicatrise sans laisser de séquelles. Il faudrait alors standardiser toutes les étapes du traitement et étudier un nombre beaucoup plus important d'échantillons pour vérifier la reproductibilité du modèle. Cependant, un autre modèle murin de kératocône, basé sur une modification génétique, a été étudié au laboratoire et a également montré une grande variabilité inter-individu [134] : un modèle murin reproductible est peut-être difficilement atteignable.

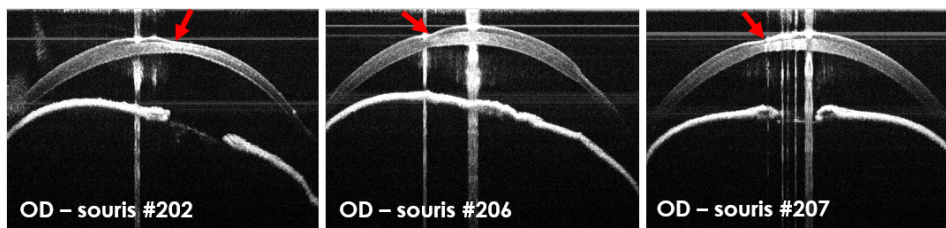


Figure III.38 – Images en SD-OCT sur 3 cornées contrôles de la série 2. Les flèches rouges indiquent des blessures superficielles.

Il nous semble finalement qu'une conclusion majeure de cette étude est la grande différence de structure entre les cornées de souris et les cornées humaines. Bien entendu, d'un point de vue macroscopique, les différences sont connues : la cornée de souris est 3 fois plus petite, 10 fois moins épaisse (entre 50 et 100 μm) et de courbure 5.6 fois plus grande que la cornée humaine [135, 136]. Mais la cornée de souris n'est pas un modèle miniature de la cornée humaine, et la structure microscopique semble malheureusement différer beaucoup. Tout d'abord, le groupe de MEEK a montré en 2007 que l'organisation des fibrilles de collagène dans la cornée de souris visualisée par diffraction de rayons X était radiale, contrairement à celle de l'homme qui suit deux directions majoritaires [137]. Au cours de l'étude présentée ici, avons également constaté que les fibrilles de collagène dans les cornées murines semblaient très désorganisées et ne s'agençaient pas en lamelles orientées, contrairement à l'homme. La figure III.39 met en regard deux images *en-face* en intensité SHG typiques chez la souris (a) et chez l'humain (b), qui illustre ce point.

Cela amène à reconsidérer l'utilisation fréquente de modèles murins pour étudier des pathologies cornéennes humaines : si nous voyons des différences de structure chez l'homme aussi bien en coupes transverses (section 2.2) qu'en observations *en-face* [133] entre les cas sains et kératocônes, il n'est pas garanti que cela soit détectable chez la souris, même avec un modèle adéquat. De plus, tester des approches thérapeutiques pour soigner des pathologies humaines structurales sur un tissu murin présentant une grande différence de structure n'est peut-être pas pertinent : des résultats positifs sur un tel modèle ne seront pas nécessairement transposables à la cornée humaine. Se pose alors la question du modèle à utiliser. Existe-t-il un animal dont la cornée est plus proche de l'humaine que la souris ? On trouve dans la littérature des études originales portant sur la structure cornéenne d'une quarantaine d'espèces, oiseaux, mammifères ou autre animal aquatique nocturne⁶, certaines se rapprochant plus de l'humain [137–139]. Le modèle murin a cependant ceci d'inégalable qu'il est très accessible et utilisé dans de nombreux laboratoires, avec de nombreux outils génétiques à disposition. L'idéal serait sans doute de s'affranchir des expérimentations animales controversées en concentrant les recherches sur le développement d'un *organ-on-a-chip* : des équipes ont mis au point des matrices de collagène reproduisant la structure du stroma cornéen et supportant le développement de cellules

6. Le Wqt n'est pas mentionné.

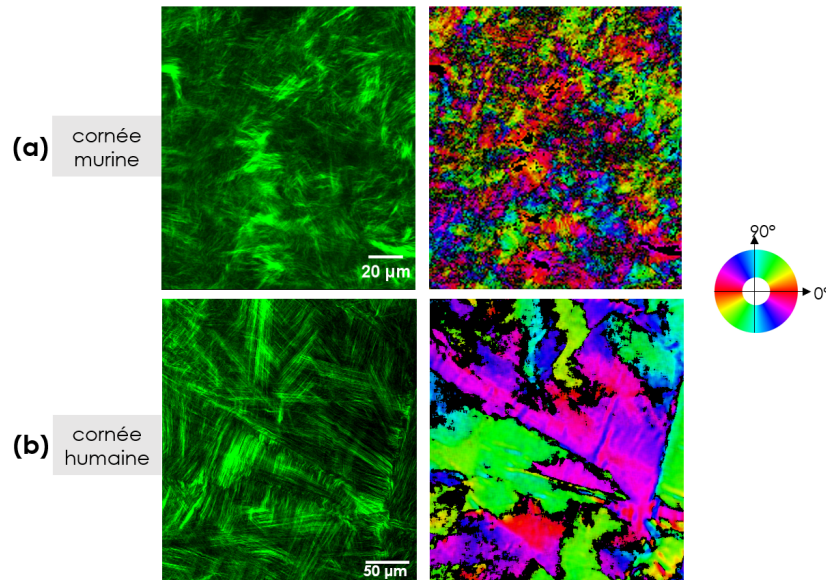


Figure III.39 – Images P-SHG *en-face* de cornées murine (a) et humaine (b). Les images sont présentées dans le modèle de couleur HSV, où la teinte (Hue) représente l'orientation dans le plan φ et la luminosité (ou valeur) indique l'intensité SHG moyenne (sur toutes les polarisations linéaires). Chaque teinte correspond à une orientation donnée par la roue. Source de l'image de cornée humaine : Clothilde Raoux, LOB.

épithéliales [140]. Des études sont en cours pour encapsuler des kératocytes (des kératocytes ont déjà pu être encapsulé dans des structures collagénique pour cultiver des cellules souches limbiques [141]) et tendre vers une cornée artificielle [142], qu'il faudrait alors réussir à innover.

Sur une note plus positive, notre étude présente deux intérêts annexes mais importants. Tout d'abord, nous avons implémenté un dispositif permettant l'imagerie de cornées de souris entières et intactes, dans leur forme physiologique. Ce dispositif expérimental s'est révélé efficace et a récemment été adapté à l'imagerie de cornées humaines (thèse de Clothilde Raoux). Enfin, la confrontation des résultats en P-SHG et en SD-OCT a montré que la P-SHG, sensible à l'organisation locale du collagène et sondant une petite échelle, apportait d'autres renseignements que ceux obtenus par l'OCT, détectant des lésions et autre hétérogénéité optique dans la cornée à une échelle plus large. Il est donc intéressant de combiner ces deux techniques qui offrent des informations complémentaires sur les pathologies, de la désorganisation structurelle locale aux dommages globaux.

Conclusions et perspectives

Ce chapitre a présenté deux études s'inscrivant dans des domaines différents, mais liés par le besoin de développement de techniques d'imagerie non-invasives, suffisamment résolues pour distinguer les fibres ou les lamelles de collagène, et quantitatives pour permettre une caractérisation du collagène, en termes d'organisation 3D à différentes échelles et de dégradation. La microscopie P-SHG répond favorablement à ces attentes, et nous avons ici démontré son potentiel pour les deux applications visées, patrimoniale et biomédicale.

Tout d'abord, la P-SHG s'est révélée utile pour quantifier l'état de dégradation du collagène dans les parchemins. En particulier, le paramètre d'anisotropie ρ , indicateur du désordre inter- ou intra-fibrillaire, semble pouvoir sonder les premiers stades de dégradation du collagène avant même que l'évolution des intensités des signaux SHG ou 2-PEF ne soit observable, donc notamment avant que des dégradations irréversibles du collagène ne viennent altérer le parchemin et empêcher sa lisibilité. Cela

permet un suivi dans le temps du parchemin, aidant les conservateurs, restaurateurs ou scientifiques du patrimoine à contrôler, adapter ou tester des méthodes de conservation et de restauration.

Plus largement, ce travail s'inscrit dans une volonté, de plus en plus partagée⁷, de développer la microscopie non-linéaire dans le domaine du patrimoine, où elle reste encore marginale. Les nombreuses avancées techniques qu'elle a récemment connues rendent la microscopie non-linéaire très compétente pour ce genre d'applications, mais deux verrous technologiques persistent : le coût des systèmes d'imagerie qui reste élevé (entre 150 et 400 k€), et la non-portabilité du système (encombrement du laser et difficulté de stabiliser un système portable). Ces deux limitations sont critiques pour le domaine du patrimoine mais parviennent à être progressivement repoussées, avec le développement de systèmes fibrés [143] ou de systèmes compacts à bras articulés (systèmes *DermaInspect* et *MPT flex* de la société *Jenlab*).

Ensuite, tirant parti de précédentes études en P-SHG sur cornée saine [81, 83], nous avons poussé l'utilisation de cette technique sur des cornées présentant une pathologie structurale. Nos résultats préliminaires sur cornées humaines ont été concluants et ont permis une première caractérisation de kératocônes humains avancés, notamment par la désorganisation des lamelles caractérisée par l'entropie. L'étude d'un modèle de kératocône sur souris n'a en revanche pas abouti à des résultats positifs. Nos mesures n'ont en effet pas permis de valider ce modèle, soulevant peut-être un manque de sensibilité de nos paramètres sur des échantillons aussi hétérogènes. Mais plus globalement, cela nous a interrogé sur la pertinence des modèles murins pour l'étude de pathologies cornéennes humaines, du fait de la divergence importante de structuration entre une cornée humaine et une cornée de souris, visualisée en P-SHG. Cette étude a toutefois soulevé d'autres points intéressants, comme la combinaison de notre technique à des mesures en SD-OCT, technique de référence en ophtalmologie. Si les signaux OCT et P-SHG renseignent sur des désorganisations à des échelles différentes, il serait tout de même intéressant d'étudier les correspondances qu'il peut exister entre ces deux informations. Des travaux vont débiter au LOB pour extraire des corrélations entre les deux signaux, grâce à des méthodes d'apprentissage automatique.

Ce dernier point peut d'ailleurs être souligné plus avant. La microscopie non-linéaire, et ses diverses modalités comme la P-SHG, sont d'autant plus pertinentes si elles sont envisagées en complément d'autres techniques d'analyse. En effet, les objets étudiés étant très complexes, seule cette complémentarité garantit l'accès à une connaissance qui se veut la plus exhaustive possible des tissus ou des matériaux (nature, protocole de fabrication, stratigraphie ou état de conservation des matériaux dans le domaine du patrimoine ou types de pathologie, désorganisation à différentes échelles, propriétés mécaniques du tissu dans le domaine biomédical). Ainsi, au laboratoire, des travaux visant à corréler des mesures P-SHG avec la nanoscopie infrarouge, l'OCT ou encore des essais mécaniques sont en cours.

Si la P-SHG est techniquement assez bien maîtrisée, ce qui nous a permis de l'utiliser pour de belles applications, la microscopie SHG possède également d'autres modalités. Notamment, l'une de ses possibilités que nous avons jusqu'à maintenant gardé sous le coude, est l'utilisation du dichroïsme circulaire en SHG (CD-SHG). Des études sur le CD-SHG ont déjà été amorcées au laboratoire par Claire Teulon, qui l'a en particulier utilisée pour imager des cornées⁸ [2]. Les travaux présentés dans les chapitres suivants se placent dans la continuité sa thèse.

7. Le Muséum envisage de s'équiper d'un microscope multiphoton, yeah !

8. Quel chouette tissu !

Chapitre IV

Dichroïsme circulaire en microscopie SHG : état de l'art et implémentation expérimentale

Francis POULENC

DÉPLORATION

OBOE

PIANO

Sommaire

1	Le phénomène de dichroïsme circulaire (CD)	103
1.1	La chiralité du collagène.....	103
1.2	Le CD en optique conventionnelle.....	104
1.3	Le CD en optique non-linéaire.....	105
2	Identification et correction des artéfacts expérimentaux	107
2.1	Résumé en français.....	107
2.2	Article publié dans Optics Express (2019).....	108
3	Procédures expérimentales et numériques adoptées	124
3.1	Paramètres d'acquisition optimaux.....	124
3.2	Mise en place du <i>time-lapse</i> et contrôle de la dérive.....	124
	Conclusion	126

En optique linéaire, le dichroïsme circulaire (CD) est une manifestation de l'activité optique des molécules, qui peuvent être optiquement actives du fait de leur chiralité. Dans ce cas, les molécules absorbent différemment une onde polarisée circulairement à gauche et à droite. Ce phénomène est relativement bien connu de nos jours et la spectroscopie CD est largement utilisée pour des mesures de routine en biochimie. Au début des années 90, cette technique a été transposée en optique non-linéaire et notamment en SHG de surface (CD-SHG), pour étudier des échantillons minces et isotropes. Vingt ans plus tard, la technique évolue vers des applications en microscopie focalisée sur des tissus biolo-

giques de collagène ou d'amidon. Si les origines du signal de CD-SHG proposées dans la littérature sont multiples, et si les signaux ne semblent pas encore très bien compris, plusieurs groupes de recherche mentionnent un lien entre le signal de CD-SHG détecté et la polarité hors du plan d'imagerie des structures formant les tissus étudiés. Ainsi, cette nouvelle modalité permettrait de résoudre l'architecture 3D du collagène dans les tissus directement à l'échelle du volume focal, et non pas en faisant des piles d'images en fonction de la profondeur comme pour l'imagerie SHG classique. Toutefois, le signal de CD-SHG ne semble pas trivial à obtenir (il nécessite en particulier des polarisations circulaires parfaites) et est encore mal caractérisé expérimentalement.

Dans ce chapitre, nous allons donc regarder de tout près le dichroïsme circulaire en microscopie SHG. Nous commencerons par nous intéresser à la propriété responsable de ce signal, la chiralité du collagène. Nous enquêterons ensuite sur l'utilisation du CD, d'abord en optique conventionnelle, puis plus récemment en optique non-linéaire et en particulier en SHG. Nous verrons enfin comment implémenter expérimentalement le CD-SHG pour obtenir des signaux fiables, exploitables et significatifs.

1 Le phénomène de dichroïsme circulaire (CD)

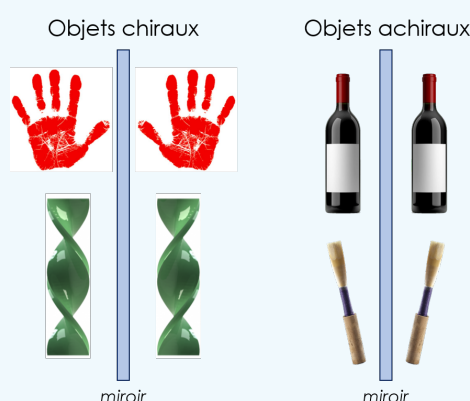
1.1 La chiralité du collagène

1.1.1 Qu'est-ce que la chiralité ?

Le concept de chiralité est important dans beaucoup de domaines : en mathématiques, électromagnétisme, physique des particules ou encore en chimie. Formellement, un objet est dit chiral lorsqu'il n'est pas superposable à son image par réflexion. Cela correspond à un objet qui ne possède aucun axe de rotation impropre d'ordre n (rotation de la molécule de $\frac{2\pi}{n}$ autour de l'axe, suivie d'une réflexion par rapport à un plan perpendiculaire à cet axe), c'est-à-dire qui est dépourvu de tout élément de symétrie S_n . En particulier, un objet chiral ne possède aucun plan de symétrie (symétrie S_1) et aucun centre de symétrie (symétrie S_2). L'objet chiral macroscopique par excellence est la main (voir l'encadré IV.1).

Encadré IV.1. - Des objets chiraux connus...

Un objet chiral n'est pas superposable à son image par un miroir plan, et peut donc exister sous deux formes, images l'une de l'autre dans un miroir. C'est le cas de nos mains, objets chiraux par excellence (*chiralité* vient du grec *chir*, la main) : notre main gauche se transforme en main droite par réflexion, et nos deux mains superposées l'une sur l'autre ne sont pas confondues. Cela est vrai également pour tout objet en forme d'hélice (comme la chaîne α du collagène).



Toute molécule ou cristal possédant une structure chirale présente de **l'activité optique**, c'est-à-dire a notamment la capacité de faire tourner le plan de polarisation d'une lumière polarisée linéairement (on parle de *pouvoir rotatoire*). Si l'activité optique a été observée en premier par Arago en 1811 sur des cristaux de quartz, c'est Pasteur qui, en 1847, dans une étude sur les acides tartrique, a relié pour la première fois la chiralité d'une molécule à son activité optique [144]. L'activité optique ne se résume pas au pouvoir rotatoire (qui dépend de la longueur d'onde) mais se manifeste également par du dichroïsme circulaire (le *CD*, voir section 1.2). Tous ces phénomènes ont une origine commune : la réponse différente du matériau à une lumière polarisée circulairement à droite ou à gauche.

1.1.2 Énantiomérie et homochiralité du vivant

Un objet chiral n'est pas superposable à son image dans un miroir plan : l'objet et son image forment un couple d'énantiomères. En chimie, les deux molécules énantiomères lévogyre L (de *laevus*, gauche) et dextrogyre D (de *dexter*, droite) se différencient par des configurations absolues opposées, les distances interatomiques restant égales par ailleurs. Elles ont alors les mêmes réactivités chimiques avec des molécules non chirales, ainsi que des propriétés physiques identiques (température de fusion, solubilité,...). En revanche, elles ont des propriétés optiques différentes et notamment un pouvoir rotatoire spécifique opposé. Au niveau biologique, elle peuvent avoir des effets physiologiques différents voire antagoniques, c'est pourquoi il est important de maîtriser la chiralité de molécules synthétisées. Par exemple, les deux énantiomères L et D du limonène donnent respectivement les arômes de citron et d'orange [145]. De manière plus dramatique, le thalidomide, connu pour ses qualités sédatives, a été commercialisé dans les années 1950 sous forme racémique (mélange des deux énantiomères en proportions égales), mais s'est révélé avoir des effets tératogènes (induction de malformations congénitales) sous sa forme D.

Dans la nature, on ne trouve souvent qu'une seule des deux formes d'une molécule chirale. Notamment, on ne trouve qu'un seul des deux énantiomères à l'état naturel pour les glucides ou les acides aminés qui constituent les êtres vivants. Pourtant, des expériences de synthèse d'acides aminés dans des conditions symétriques (expériences du type de Miller-Urey) ont abouti à un mélange racémique des formes L et D [146]. Cela signifie que les deux formes peuvent bien exister, mais que la vie a systématiquement privilégié une des deux formes. C'est ce que l'on appelle l'*homochiralité du vivant*. La raison et la manière dont elle s'est produite demeure à ce jour une question non résolue.

1.1.3 Et le collagène ?

Le collagène possède une organisation hiérarchique et structurale particulière qui lui confère la propriété de chiralité. En effet, la molécule qui constitue sa structure primaire à tertiaire, la chaîne α , est de forme hélicoïdale et composée d'acides aminés L : c'est donc une molécule chirale. Elle est homochirale et seule la forme organisée en hélice gauche est présente dans la nature. Trois chaînes α forment ensuite la structure quaternaire du collagène (triple hélice), elle aussi chirale de super-hélicité droite. La chiralité du collagène à ces deux échelles peut aussi être complétée pour certains tissus par un agencement chiral des triples hélices, conférant une légère chiralité gauche aux fibrilles de collagène [12, 14].

Cette chiralité donne donc au collagène des propriétés optiques particulières : on y mesure notamment du dichroïsme circulaire (CD), propriété qui va nous intéresser dans la suite.

1.2 Le CD en optique conventionnelle

Le dichroïsme circulaire (CD) est une des manifestations de l'activité optique d'un matériau. Il est défini comme la différence d'absorption du matériau pour une lumière incidente polarisée circulairement à gauche et à droite. Plus précisément, lorsqu'un faisceau lumineux traverse un milieu absorbant, l'amplitude du faisceau est atténuée selon la loi de Beer-Lambert :

$$I_{R,L} = I_{R_0,L_0} 10^{-A_{R,L}} = I_{R_0,L_0} e^{-\alpha_{R,L} l} \quad (\text{IV.1})$$

où l est l'épaisseur du milieu traversé, et $A_{R,L}$ et $\alpha_{R,L}$ sont respectivement l'absorbance et le coefficient d'absorption du milieu, pour une lumière incidente polarisée circulairement à droite (indice R) ou à gauche (indice L). Le CD est alors simplement défini par la différence $(\alpha_L(\lambda) - \alpha_R(\lambda)) l$.

La mesure du signal de CD pour différentes longueurs d'onde est une technique de spectroscopie largement utilisée pour étudier la conformation des protéines et des polypeptides [147, 148]. En effet, les absorptions détectées dépendent des transitions électroniques en jeu, elles-mêmes dépendantes de la structure secondaire des protéines, c'est-à-dire de l'arrangement spatial des liaisons carbonyles entre les acides aminés. Plus précisément, l'absorption d'un photon excite des transitions dipolaires électrique μ et magnétique m dans la molécule et ce sont les interactions entre ces dipôles électriques et magnétiques qui contribuent au signal de CD. Ces interactions n'existent que pour les molécules chirales (voir Fig. IV.1), mais sont faibles. Ainsi la technique de CD est confrontée à un problème de faible contraste, de l'ordre de 0.1 %. On notera que deux énantiomères présentent une activité optique (y compris un dichroïsme circulaire) de même amplitude mais de signe opposé.

La spectroscopie CD permet en particulier de reconnaître des structures du type hélice α ou feuillet β pour les protéines, double hélice des acides nucléiques ou encore la triple hélice du collagène. Ainsi, le collagène I non dénaturé présente un spectre CD caractéristique, avec un pic négatif à 196.5 nm et un pic positif à 220 nm, proche de celui de la polyproline II (Fig. IV.2).

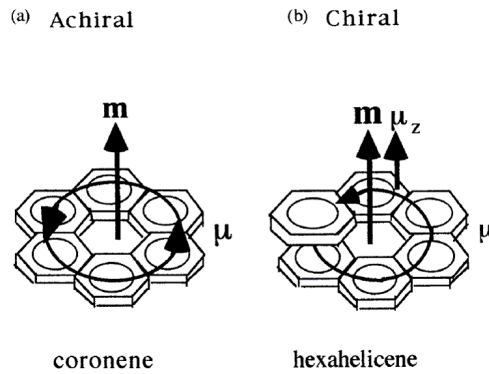


Figure IV.1 – Schéma des moments de transition dipolaires électriques μ et magnétique m dans le cas d'une molécule achirale (a) et chirale (b). Dans le cas de la molécule chirale, le dipôle électrique a une composante en Z, parallèle au dipôle magnétique, rendant non nulle la force rotatoire $R = Im(\mu \cdot m)$ qui intervient dans l'expression du signal CD. Deux énantiomères présentent une force rotatoire opposée (m reste m mais μ devient $-\mu$). Tiré de [149].

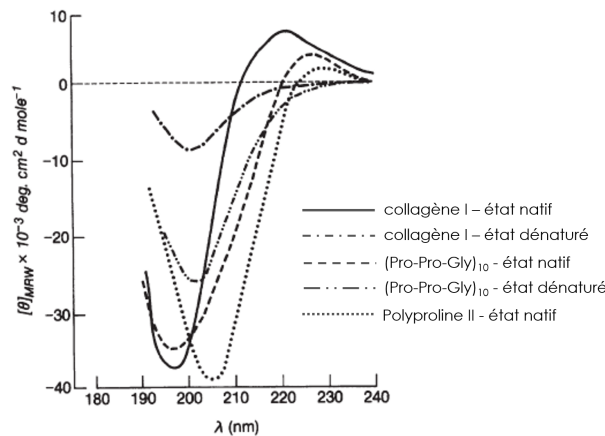


Figure IV.2 – Spectres CD du collagène de type I (trait plein) vs polyproline II (courbe en pointillés). Adapté de [147].

1.3 Le CD en optique non-linéaire

1.3.1 CD-SHG sur des surfaces chirales

Le mariage entre les phénomènes de dichroïsme circulaire et de génération de second harmonique a eu lieu dans les groupes de J. M. Hicks en 1993¹ [150] et d'A. Persoons en 1994 [151]. Il s'agissait alors de SHG de surface, où la non-centrosymétrie nécessaire à l'obtention du signal SHG est obtenue à l'interface entre deux milieux centrosymétriques. Ils ont constaté sur une couche de molécules chirales (binaphthol) que l'efficacité de génération de second harmonique dépendait du sens de la polarisation circulaire du faisceau incident, rendant alors possible le calcul de la différence d'intensité SHG normalisée :

$$I_{\text{CD-SHG}} = \frac{I_L^{\text{SHG}} - I_R^{\text{SHG}}}{(I_L^{\text{SHG}} + I_R^{\text{SHG}})/2} \quad (\text{IV.2})$$

Le contraste alors obtenu pour ce dichroïsme circulaire en SHG² est 10^3 fois plus fort que le contraste pour le CD conventionnel. L'origine physique de cette forme d'activité optique non-linéaire a longtemps

1. Le CD-SHG et moi sommes donc venus au monde la même année... Il n'y a pas de hasard, il n'y a que des rendez-vous.

2. Un terme plus approprié serait en fait *différence circulaire*. On utilise *dichroïsme circulaire* par abus de langage.

été discutée dans la littérature, J. M. Hicks et coll. évoquant une origine dipolaire électrique dans certaines conditions de résonances [152, 153], tandis que A. Persoons et coll. mettaient également en avant la nécessité des contributions dipolaires magnétiques [151, 154]. Les travaux de M.-C. Schanne-Klein et F. Hache ont permis de lever la controverse : en étendant à la réponse non-linéaire deux modèles classiques d'origine de l'activité optique, ils ont distingué expérimentalement les contributions électrique et magnétique au CD-SHG et ont montré qu'elles venaient chacune d'un type de chiralité différent [155, 156], les deux chiralités étant par ailleurs présentes de manière égale dans le collagène [75] (se reporter à la section 3.1.1 du chapitre V pour plus de détails).

Ces travaux pionniers ont montré la nécessité d'avoir des composantes tensorielles chirales complexes (déphasées par rapport aux achirales) pour obtenir un signal de CD-SHG et ont mis en évidence la grande sensibilité des mesures de CD-SHG pour détecter la chiralité. Toutefois, ces expériences se faisaient dans des configurations surfaciques pour un échantillon isotrope dans le plan d'imagerie. En effet, Persoons et coll. ont soulevé en 1996 qu'une anisotropie de l'échantillon dans le plan d'imagerie pouvait donner lieu à une signature de CD-SHG artéfactuelle, présente même pour des surfaces achirales [157]. Pour contourner ce problème, Huttunen et al. ont proposé en 2010 une nouvelle géométrie pour les expériences de CD-SHG : il ne s'agit plus d'une géométrie en réflexion mais d'une géométrie de microscopie, avec un faisceau focalisé sur l'échantillon en incidence normale [158]. S'ils l'ont appliquée à des couches minces de Langmuir-Blodgett, cette géométrie sera reprise 2 ans plus tard par Campagnola et coll. sur des tissus biologiques [85].

1.3.2 Microscopie CD-SHG sur échantillons biologiques

En 2012, les mesures de CD-SHG sur des échantillons surfaciques en réflexion ont été étendues pour la première fois à des mesures de microscopie CD-SHG en transmission dans des tissus biologiques (peau humaine et tendon de souris), par le groupe de P. J. Campagnola [85]. Des mesures de la valeur absolue du CD-SHG ont permis de discriminer de manière significative des tissus de peau sains de tissus pathologiques issus de personnes présentant une ostéogenèse imparfaite ("maladie des os de verre"). Campagnola rapportait à cette époque un contraste de 5 % pour le signal CD-SHG. En 2013, une collaboration entre le groupe de S. W. Chu à Taïwan et le groupe de M. Kauranen en Finlande a présenté des mesures de CD-SHG sur du collagène I de ligament de porc avec un contraste atteignant les 100 % [86]. Cette étude montre également des simulations numériques du signal de CD-SHG en fonction de l'angle hors-plan des fibrilles de collagène (l'angle ψ défini en section 1.1.1). C'est alors la première fois qu'une relation entre le CD-SHG et l'angle hors-plan est exprimée et utilisée pour l'interprétation des images. Les hypothèses utilisées pour la simulation ne sont en revanche ni détaillées ni justifiées et les images expérimentales à elles-seules ne suffisent pas à assurer la validité de la relation entre le CD-SHG et ψ . La même collaboration présente en 2014 des mesures de CD-SHG sur des granules d'amidon, toujours avec un contraste de 100 % [159]. Contrairement à la conclusion qu'ils avancent, l'interprétation de leurs résultats ne semble pas immédiate : ils maintiennent que le CD-SHG est lié à l'angle hors-plan des structures, mais leurs valeurs de CD-SHG ne sont pas en accord avec la géométrie connue des granules d'amidon (distribution radiale des polymères d'amylopectine à partir de l'hilum). L'année suivante, ils présentent de nouvelles simulations numériques plus détaillées du signal de CD-SHG sur une fibre homogène de symétrie cylindrique, inclinée par rapport au plan d'imagerie, en se plaçant dans l'approximation dipolaire électrique [160]. Ces simulations montrent l'apparition d'un signal de CD-SHG pour une fibre isolée dont le tenseur ne présente pourtant que des composantes réelles achirales. Mais l'étude de cette géométrie est peu pertinente pour comprendre le signal de tissus biologiques où une configuration en fibres isolées plus petites que le volume focal n'existe pas. En 2017, Zhuo et al. proposent une analyse tensorielle de la réponse du collagène en incluant les composantes chirales, également sous l'approximation dipolaire électrique [87]. Ils retrouvent la même conclusion qualitative que Lee et al. en 2013 [86], à savoir la relation entre le CD-SHG et l'angle hors-plan, et quantifient ici le signal CD-SHG, entre -1.28 et +1.28 (négatif pour une structure hors-plan pointant vers le bas et positif pour une structure pointant vers le haut). Toutefois, les résultats expérimentaux qu'ils présentent ne vont pas tous dans le sens de leur théorie. Une telle analyse

tensorielle a également été réalisée par Claire Teulon, ancienne doctorante de l'équipe, et les calculs analytiques ont été détaillés dans sa thèse soutenue en octobre 2016 [2] (ils seront repris et commentés au chapitre suivant en section 1.1). En 2017, le groupe de Campagnola étudie à nouveau la microscopie CD-SHG sur du tendon de queue de souris et des gels de collagène, cette fois-ci en faisant varier la longueur d'onde d'excitation [161]. Il présente alors un contraste amélioré par rapport à 2012, jusqu'à 45 %, qui est d'autant plus grand que la longueur d'onde utilisée est petite (une différence significative dans l'amplitude du signal est notée pour des longueurs d'onde de 890 nm et de 780 nm). Ceci est surprenant au vu du très bon contraste obtenu par Chu et Kauranen avec une longueur d'onde incidente de 1040 nm.

Ainsi, l'utilisation du CD-SHG comme modalité de microscopie dans des tissus biologiques est assez récente, et semble apporter des informations importantes quant à l'architecture 3D des tissus, notamment sur la polarité hors-plan des structures. Mais le signal obtenu varie beaucoup selon les équipes et selon le tissu étudié. Il n'est pas encore très clair quel contraste et quelle précision il est possible d'obtenir en CD-SHG, ni quelle est la véritable origine du signal. Il nous a alors semblé primordial durant ma thèse de mettre au point une caractérisation précise du signal de CD-SHG obtenu expérimentalement, avant d'aller plus loin dans l'interprétation et la compréhension des images. En particulier, comme les mesures de CD-SHG dans la littérature ne sont pas complètement en accord avec les approches théoriques proposées, nous avons souhaité étudier la précision des signaux mesurés : il a fallu pour cela mettre en place des expériences de CD-SHG très rigoureuses, permettant de discriminer les signaux significatifs des signaux artéfactuels. Ces points sont l'objet de la suite du chapitre.

2 Identification et correction des artéfacts expérimentaux

2.1 Résumé en français

L'imagerie SHG en dichroïsme circulaire (CD-SHG) est très délicate, et nécessite une procédure expérimentale rigoureuse pour mener à bien les expériences. Cette procédure est requise pour obtenir un signal de CD-SHG assez contrasté et peu bruité. Mais elle est d'autant plus nécessaire pour avoir un signal fiable qui ne soit pas artéfactuel. En effet, en examinant attentivement tous les signaux de CD-SHG obtenus, nous avons pu détecter des conditions expérimentales donnant des signaux artéfactuels, c'est-à-dire des faux signaux provenant de dérèglements expérimentaux courants dans des systèmes de microscopie. Ces signaux peuvent facilement être assimilés à de véritables signaux induisant ainsi des interprétations incorrectes de la structure des tissus étudiés, et il est donc crucial de s'en affranchir. Plusieurs artéfacts expérimentaux empêchant une mesure correcte du signal de CD-SHG ont alors été identifiés et des protocoles de correction ou de minimisation de ces artéfacts ont été proposés. L'article présenté dans la section suivante les détaille.

Tout d'abord, le CD-SHG nécessite des polarisations incidentes circulaires, qui sont facilement dégradées durant la propagation à travers les optiques. Des polarisations circulaires imparfaites (d'ellipticité $e < 1$) faussent la mesure du CD-SHG : des ellipticités de 0.9 peuvent induire jusqu'à 28% de distorsion du signal de CD-SHG (en pourcentage du signal parfait avec $e(\text{RCP}) = e(\text{LCP}) = 1$). Et même si l'ellipticité des deux polarisations LCP et RCP est bien contrôlée et supérieure à 0.95 (limite de qualité pour la polarisation circulaire utilisée par le groupe de S.-W. Chu [86, 159]), on trouve des distorsions de signal de l'ordre de 12% si les axes des polarisations elliptiques ont des directions différentes. De plus, les polarisations ne sont pas identiques dans tout le champ de vue du microscope et nous avons montré que des mesures de CD-SHG effectuées au centre ou au bord du champ de vue donnaient des signaux très différents.

Ensuite, le CD-SHG est obtenu par la différence de deux signaux qui peuvent être assez faibles, il est donc sensible aux bruits affectant ces faibles signaux. Une quantification de la précision des mesures en CD-SHG a été effectuée pour conclure à la nécessité de mettre en place un mode d'acquisition en *time-lapse* : il s'agit d'accumuler plusieurs images de la même zone avec des temps de pause de quelques dizaines de secondes entre chaque image. Ce mode d'acquisition a mis en évidence une dérive mécanique

du système expérimental, et nous avons montré que ce mouvement, même très léger (quelques dizaines de nanomètres), entraînait des motifs artéfactuels en "bandes" dans l'image CD-SHG (potentiellement présents dans des données déjà publiées dans la littérature).

Afin de nous affranchir de ces artéfacts, les polarisations circulaires incidentes ont été optimisées au centre du champ de vue pour obtenir des ellipticités $e > 0.99$ et nous avons sélectionné de petites régions d'imagerie (entre 40 et 100 μm de côté) contenant des ellipticités $e > 0.98$ dans tout le champ de vue. Ensuite, des essais de stabilisation mécanique ont été conduits pour trouver la configuration expérimentale optimale minimisant toute dérive, comprenant un support d'échantillon massif, des poids sous et sur le porte-échantillon ainsi qu'un temps d'attente d'au moins 15 minutes avant chaque acquisition en time-lapse. Les algorithmes de traitement de données ont aussi été améliorés pour nous affranchir de la dérive latérale (dans le plan focal), lorsqu'elle persiste. Cela nous a finalement permis de mesurer le CD-SHG de manière fiable sur des coupes transverses de cornée humaine, un échantillon riche en collagène présentant une architecture 3D complexe dont la compréhension est actuellement un enjeu biomédical majeur.

Grâce à ces expériences fiables, nous avons identifié que les mesures de CD-SHG sont anti-corrélées spatialement avec les mesures classiques d'intensité SHG. Cela signifie que des fibrilles orientées hors du plan focal et qui génèrent donc une intensité SHG plus faible ont un signal de CD-SHG important : le CD-SHG permet bien de visualiser les structures hors-plan, ouvrant la voie à la visualisation complète de l'architecture 3D des tissus, même lorsque ces derniers sont denses et présentent de nombreuses structures imbriquées, impossibles à distinguer par une simple reconstruction 3D des piles d'images SHG.

2.2 Article publié dans Optics Express (2019)

Les travaux résumés précédemment ont été publiés en août 2019 dans Optics Express [162]. L'article, sélectionné par l'éditeur en tant que *Editor's Pick* du numéro 16, est ici reproduit intégralement.

Margaux SCHMELTZ, Claire TEULON, Gaël LATOUR, Djida GHOUBAY,
Vincent BORDERIE, Carole AIMÉ et Marie-Claire SCHANNE-KLEIN
Implementation of artifact-free circular dichroism SHG imaging of collagen
OPTICS EXPRESS / Vol. 27, No. 16, p. 22685–22699 / Août 2019

Implementation of artifact-free circular dichroism SHG imaging of collagen

MARGAUX SCHMELTZ,¹ CLAIRE TEULON,¹ GAËL LATOUR,² DJIDA GHOUBAY,³ VINCENT BORDERIE,³ CAROLE AIMÉ,⁴ AND MARIE-CLAIRE SCHANNE-KLEIN^{1,*}

¹LOB, École polytechnique, CNRS, Inserm, IP Paris, F-91128 Palaiseau, France

²Laboratoire IMNC, Université Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, F-91405 Orsay, France

³Sorbonne Université, CHNO des Quinze Vingts, INSERM, Institut de la Vision, GRC32, CIC1423, F-75012 Paris, France

⁴Sorbonne Université, CNRS, LCMCP, Paris, F-75005, France

*marie-claire.schanne-klein@polytechnique.edu

Abstract: Second harmonic generation (SHG) enables *in situ* imaging of fibrillar collagen architecture in connective tissues. Recently, Circular Dichroism SHG (CD-SHG) microscopy has been implemented to take advantage of collagen chirality to improve 3D visualization. It measures the normalized difference in the SHG signal obtained upon excitation by left versus right circular polarizations. However, CD-SHG signal is not well characterized yet, and quite different CD-SHG values are reported in the literature. Here, we identify two major artifacts that may occur in CD-SHG experiments and we demonstrate that thorough optimization and calibration of the experimental setup are required for CD-SHG imaging. Notably it requires a careful calibration of the incident circular polarizations and a perfect mechanical stabilization of the microscope stage. Finally, we successfully record CD-SHG images in human cornea sections and confirm that this technique efficiently reveals collagen fibrils oriented out of the focal plane.

© 2019 Optical Society of America under the terms of the [OSA Open Access Publishing Agreement](#)

1. Introduction

Collagen is a major structural protein in vertebrates, as it is the main component of connective tissues, such as arteries, tendons, skin, bones or cornea. In fibrillar collagen types, collagen triple helices self-assemble into fibrils that exhibit various sizes and form various 3D structures depending on the observed tissue [1]. For example in cornea, type I collagen 30 nm-thick fibrils align in ~ 2 μm -thick lamellae that are stacked with different en-face orientations along the stroma depth, while fibrils in tendon assemble to form few μm -diameter fibers that further assemble into larger fascicles. These 3D structures provide physical and mechanical properties to the observed connective tissues [2]: transparency and rigidity to cornea, mechanical strength to tendon. A change of collagen 3D organization or a defect in collagen synthesis can lead to pathologies or tissue dysfunctions [3]. *In situ* imaging of these 3D structures is therefore a major biomedical concern, in particular to characterize pathological remodeling of connective tissues and to guide tissue bio-engineering.

Nowadays, the gold standard technique for *in situ* 3D visualization of collagen fibrils in intact tissues is second harmonic generation (SHG) microscopy [4, 5]. This technique can be completed by additional modalities as Polarization-resolved (P-SHG) or interferometric (I-SHG) measurements. P-SHG provides information about the hierarchical organization of collagen: mainly the mean orientation of collagen fibrils and their degree of alignment within the focal volume, and the triple helix molecular structure in tissues with well-aligned fibrils [6–13]. I-SHG provides the relative phase of the SHG signal and gives information about the polarity of collagen fibrils in the focal plane [14–16]. However, P-SHG and I-SHG only provide information about orientation and polarity within the focal plane. Together with regular SHG imaging, P-SHG and

I-SHG are thus powerful techniques to probe in-plane collagen architecture, but they are poorly sensitive to structures lying out of the focal plane. This may impede the determination of the collagen 3D organization in dense collagen tissues, where 3D or transverse reconstructions are often ambiguous.

Recently, circular dichroism SHG microscopy (CD-SHG) was reported to highlight out-of-plane collagen structures [17, 18]. CD-SHG measures the normalized difference in the SHG signal obtained upon excitation by left versus right circular polarizations and is related to the chirality of collagen at molecular and tissular scales. It was first implemented in surface SHG experiments on various chiral molecules [19, 20], including collagen [21], and has expanded to microscopy measurements on biological samples since 2012 [17, 18, 22–24]. However, the CD-SHG signal is not well characterized yet. First, CD-SHG measurements reported in the literature show highly different values: between 5 % to nearly 100 % depending on the studied tissue [17, 22]. Then, as the SHG signal is known to decrease while the out-of-plane angle increases, CD-SHG involves the difference between two low SHG signals. It is therefore quite sensitive to noise and deserves proper computation of the measurement accuracy. In addition, CD-SHG imaging requires perfect circular incident polarizations, which are difficult to obtain and are easily affected along propagation.

In this study, different artifacts affecting CD-SHG imaging are identified and reported. We first show that imperfect circular incident polarizations lead to linear dichroism contribution to the CD-SHG signal and result in a misinterpretation of CD-SHG images. We then assess the accuracy of CD-SHG signal and show that time-lapse acquisitions are required to improve the measurement accuracy. We also demonstrate that a slight movement in the microscope stage or in the sample during these acquisitions leads to artifactual features in the CD-SHG images. Finally, an artifact-free circular dichroism SHG imaging of human cornea transverse sections is presented, highlighting the out-of-plane collagen structures of this tissue.

2. Materials and methods

2.1. Sample preparation

Three sample types were used for this study: tendons as a standard easy-to-handle collagen sample, corneas because of their complex 3D architecture and collagen membranes that provided large homogeneously structured areas. No distortion of polarization was expected upon propagation in all these thin samples.

The study was carried out according to the tenets of the Declaration of Helsinki and followed ethical requirements for human tissues. We obtained human corneas ($n=4$) from the French Eye Bank (Banque Française des Yeux, Paris), which were unsuitable for transplantation and assigned to scientific use. They were fixed in 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4), postfixed in 1 % osmium tetroxide in 0.2 M cacodylate buffer (pH 7.4), included in epoxy resin and cut with an ultramicrotome. Other human corneas ($n=4$) featuring the same qualification criteria were obtained from another eye bank (Établissement Français du Sang, Paris). They were fixed in 4 % PFA, immersed in a 30 % sucrose solution, embedded in Tissue-Tex O.C.T. compound and cooled to -20°C , before cryostat sectioning. All sections were semi-thin transverse sections (3 - 6 μm -thick).

Series of tendons were dissected from 2 rat tails. The fascicles were rinsed and stored at 4° in phosphate-buffered saline (PBS), and used within a few days for the experiments. They were deposited and flattened on a coverslip with PBS and covered with another coverslip.

Fibrillar collagen membranes were made from type I collagen that was extracted and purified from rat tail tendons by substituting 500 mM acetic acid by 3 mM hydrochloric acid as previously described in [25]. Collagen purity was assessed by electrophoresis and its concentration estimated by hydroxyproline titration [26]. Then, 1.2 mL of collagen solution at a concentration of 1.7 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ in 30 mM HCl and 75 % vol. ethanol, or alternatively in 30 mM HCl only, was poured in

a silicon mold to obtain casted collagen membranes after an overnight solvent evaporation under ambient conditions. These ~ 50 μm -thick membranes were imaged between two 170 μm -thick glass coverslips.

2.2. SHG microscopy

A custom-built laser scanning upright microscope was used to perform SHG imaging [27]. The excitation source was a femtosecond titanium:sapphire laser (MaiTai, SpectraPhysics) tuned to 860 nm and delivering pulses around 100 fs with a 80 MHz repetition rate. Laser power was controlled by the orientation of an achromatic half waveplate before a Glan prism, and was less than 10 mW at the sample, with 10 to 20 μs /pixel dwell time and 0.1 to 0.2 μm pixel size. A high numerical aperture objective with water immersion (25x, NA 1.05, Plan-Apochromat, Olympus) was used to achieve approximately 0.4 μm lateral by 1.2 μm axial resolutions near the sample surface. These experimental resolutions were measured from the two-photon excitation PSF obtained from 100 nm-diameter fluorescent micro-beads (Carboxylate-modified FluoSpheres beads, ThermoFisher Scientific) [28]. SHG signals were detected in the forward direction through a condenser (effective NA ≈ 1) using a photon-counting photomultiplier tube (P25PC, SensTech) and suitable spectral filters to reject the excitation laser beam (FF01-720/SP and FF01-680/SP, Semrock) and select SHG signals (FF01-427/10 interferential filter, Semrock).

2.3. Circular dichroism SHG measurements (CD-SHG)

The circular dichroism in SHG (CD-SHG) is measured as the normalized intensity difference between two SHG signals $I_R^{2\omega}$ and $I_L^{2\omega}$ obtained upon excitation with a right or left circular polarization respectively:

$$\text{CD-SHG} = \frac{I_L^{2\omega} - I_R^{2\omega}}{(I_L^{2\omega} + I_R^{2\omega})/2} \quad (1)$$

By definition [19, 20], this parameter belongs to the interval $[-2, 2]$, while CD in linear optics is in the interval $[-1, 1]$. All CD-SHG images are presented with their scales specified, using a blue-white-red color chart. Experimentally, two images were recorded sequentially, using an incident right (RCP) or left (LCP) circular polarization respectively. Then the CD-SHG (normalized difference of the two images) and the average SHG intensity (average of the two images) were computed pixel-by-pixel. The mean background noise was around 0.1 photon in areas devoid of collagen, so the SHG signal was processed directly without any background subtraction.

The incident beam polarization was controlled by two motorized achromatic waveplates (Fichou, France) inserted at the back pupil of the objective. A first quarter waveplate improved the incoming beam linear polarization affected by galvanometric and dichroic mirrors to achieve a well-defined linear polarization. A second quarter waveplate was then positioned to achieve either right or left circular polarizations. A thorough protocol was used to measure and optimize the ellipticity of polarizations (defined as the ratio of the minimum to the maximum magnitudes of the incoming field vector) in the whole field of view. To that purpose, we used a powermeter (Nova II, Ophir) placed after a rotating analyzer (LPVIS100 and PRM1Z8, Thorlabs) to measure the incoming intensity at different angles α of the analyzer. The Malus's law allows us to fit the data by $I(\alpha) = y_0 + A * \cos^2(\alpha)$ and to calculate the ellipticity as:

$$e = \frac{E_{min}}{E_{max}} = \sqrt{\frac{I_{min}}{I_{max}}} = \sqrt{\frac{y_0}{y_0 + A}} \quad (2)$$

The position of the waveplates was then optimized by an iterative procedure so that the ellipticity tends to 1 (perfect circular polarization) for both right and left circular polarizations. This optimization was performed at the center of the field of view, and the ellipticity was then carefully measured at different pixels throughout the field of view.

3. Results and discussion

3.1. Elliptical incident polarizations lead to artifactual CD-SHG measurements

Right and left circular polarizations of the incident beam must be used to perform CD-SHG imaging. Nevertheless, perfect circular polarizations are rapidly distorted upon propagation. Most of the time, one ends up with a non perfect circular (elliptical) polarization, whose ellipticity is $e < 1$ (e is defined in Eq. 2). In this case, the electric field vector describes an ellipse. Setting \vec{u}_1 and \vec{u}_2 the unit vectors along respectively the major and the minor axes of the ellipse, the elliptically polarized incident beam is written as:

$$\vec{E}_{ell} = E_1 e^{i\phi} \vec{u}_1 + E_2 e^{i(\phi + \frac{\pi}{2})} \vec{u}_2 \quad (3)$$

with $E_2 \leq E_1$. This field can be seen as the sum of a circularly polarized field and a linearly polarized one:

$$\begin{aligned} \vec{E}_{ell} &= \sqrt{2} E_2 e^{i\phi} \times \left(\frac{1}{\sqrt{2}} \vec{u}_1 + \frac{i}{\sqrt{2}} \vec{u}_2 \right) + (E_1 - E_2) e^{i\phi} \times \vec{u}_1 \\ &= \sqrt{E_1^2 + E_2^2} \times (p_1 \vec{e}_{circ} + p_2 \vec{e}_{lin}) \end{aligned} \quad (4)$$

where $p_1 = \frac{\sqrt{2} E_2}{\sqrt{E_1^2 + E_2^2}}$ and $p_2 = \frac{E_1 - E_2}{\sqrt{E_1^2 + E_2^2}}$ are the weights of circular and linear polarizations in the overall elliptical polarization respectively, \vec{e}_{circ} is a circularly polarized field and \vec{e}_{lin} a linearly polarized field along \vec{u}_1 . These two fields have their intensities normalized to 1. The weights p_1 and p_2 can be expressed in terms of the ellipticity $e = \frac{E_2}{E_1}$:

$$\begin{aligned} p_1 &= \frac{\sqrt{2} e}{\sqrt{1 + e^2}} \\ p_2 &= \frac{1 - e}{\sqrt{1 + e^2}} \end{aligned} \quad (5)$$

A perfectly circular polarization corresponds to an ellipticity $e = 1$, $p_1 = 1$ and $p_2 = 0$. However, a non-zero amount of linear polarization ($p_2 > 0$), either in the right or in the left incident polarization, affects the SHG measurement, because of linear incident field contribution. More precisely, as the second harmonic response scales as the square of the incident field, it involves here the squares of the circular and linear components of the incident field as well as cross-term between its linear and circular components. Consequently, the signal measured as "CD-SHG" is actually a combination of circular dichroism, linear dichroism (normalized difference in SHG signal upon an excitation linearly polarized along 2 perpendicular directions) and cross-terms mixing linear and circular contributions.

To characterize the effect of such a mix in CD-SHG signal, experiments were conducted with elliptical incident polarizations ($e \approx 0.2$) and quasi-perfect circular incident polarizations ($e \approx 0.97$) respectively, on samples rotated in the plane of the image (Fig. 1). For each case, CD-SHG images of a human cornea transverse section were measured before and after a 90°-in-plane rotation of the sample. In the case of elliptical incident polarizations, CD-SHG image of the cornea before rotation shows mainly a strong and positive signal (in red) within collagen fibrils oriented at 45° from the y-axis (Fig. 1(c)), whereas it shows a strong negative signal (in blue) after the 90°-in-plane rotation of the sample, where the fibrils are mainly at 135° from the y-axis (Fig. 1(d)). In contrast, in the case of quasi-perfect circular polarizations, no difference is observed in the CD-SHG signal before and after the in-plane rotation of the sample (Figs. 1(f) and 1(g)).

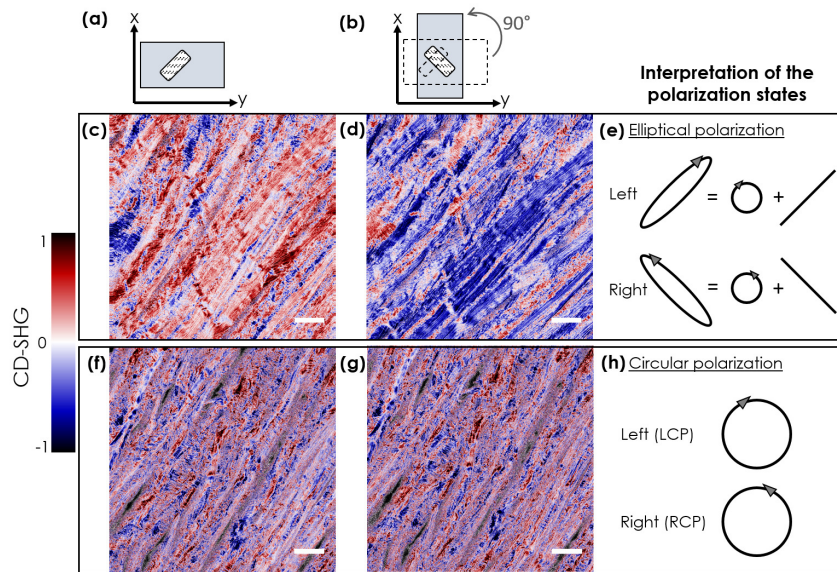


Fig. 1. Effect of the incident polarization ellipticity on CD-SHG measurements. (a) Top-view of the sample configuration for experiments depicted in (c) and (f). (b) Top-view of the sample in-plane rotation by $+90^\circ$ and new configuration for experiments depicted in (d) and (g). (c-d) CD-SHG images of the same area in a human cornea transverse sections obtained with elliptically polarized excitations. (e) These elliptical polarizations can be split into circular and linear parts. Collagen structures oriented along the linear part are highlighted in SHG images. (f-g) CD-SHG images of the same area in a human cornea transverse sections obtained with circularly polarized excitations. (h) Perfect circular polarizations: there is no anisotropy in the excitation so no structure is enhanced due to its orientation. The images (d) and (g) were shifted back to -90° in post-processing so that the structures are displayed in the same directions as in (c) and (f) respectively. Scale bar = $20 \mu\text{m}$.

This indicates that imperfect circular polarizations of the incident field lead to strong artifacts in the CD-SHG signal: it becomes artificially dependent on the in-plane angle of collagen fibrils, whereas actual CD-SHG signal (with perfect circular polarizations) is expected not to depend on the in-plane orientation. Note that this effect is also observed in conventional optics: linear dichroism can affect the measure of circular dichroism in anisotropic samples.

Similarly, the sensitivity of SHG to sample anisotropy explains the in-plane dependence of actual CD-SHG : SHG signal is stronger (resp. smaller) when excited by a linear polarization aligned along (resp. perpendicular to) collagen fibrils, as it has been largely shown with P-SHG [6–13]. Therefore, an elliptical LCP (resp. RCP) field oriented along collagen fibrils will result in an artifactual positive (resp. negative) CD-SHG signal, since CD-SHG is proportional to $I_L^{2\omega} - I_R^{2\omega}$. In the measurements depicted in Fig. 1(c), the elliptical LCP presumably has its linear part oriented at 45° from the y-axis, *ie* along the collagen fibrils within the lamellae. When the sample is rotated by 90° , the collagen lamellae lie perpendicularly to the LCP axis, minimizing the linear contribution of LCP to the SHG signal, so minimizing $I_L^{2\omega}$ that becomes smaller than $I_R^{2\omega}$. $I_R^{2\omega}$ may moreover be maximized after rotation if the axis of the RCP ellipse is also at 135° from y-axis.

Numerical simulations were performed (see Appendix 1) in order to quantify the distortion of the CD-SHG signal as a function of the ellipticity. The main results are shown in Table 1 and Table 2. They show that RCP and LCP ellipticities must be first very close to 1 and secondly

very similar to each other either in terms of ellipticity or axis orientation, in order to measure the "true" CD-SHG signal (undistorted signal obtained with perfect circular polarization RCP and LCP).

We therefore assessed possible distortions in our setup by characterizing the incident polarizations at different pixels in the field of view. Our measurements reveal the inhomogeneity of the ellipticity throughout the field of view (see Fig. 2(a)), both for RCP and LCP. The polarizations are almost perfectly circular at the center of the field of view ($e > 0.99$), as expected since they are optimized at this position. However, they become more and more imperfect away from the center, where the incident angles on galvanometric and dichroic mirrors are slightly modified. This would not lead to any dramatic effect in the CD-SHG measurement if the elliptical RCP and LCP had exactly the same ellipticity and same axis. But we notice that the RCP and LCP ellipticities differ for a given pixel in the field of view, and that they present two different ellipse orientations, leading to a non zero axis gap (Fig. 2(b)). Experimentally, we took advantage of the quite homogeneous response from collagen membranes on the whole field of view to highlight this phenomenon: artifactual CD-SHG signal was measured at the edges of the field of view (see Appendix 2).

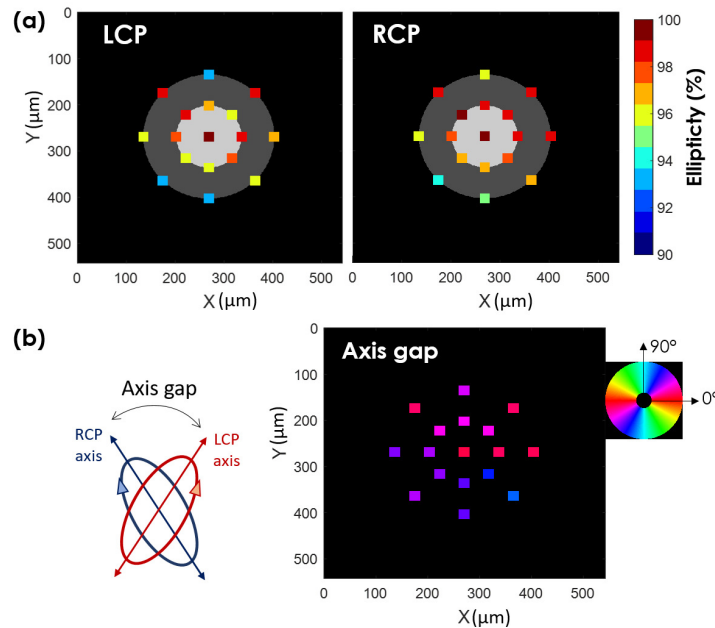


Fig. 2. Polarization characterization in the field of view. (a) Ellipticity (expressed here as a percentage) of the left circular polarization (LCP, left) and the right circular polarization (RCP, right), after optimization. The measurements are taken on 17 pixels throughout the total field of view ($540 \mu\text{m} \times 540 \mu\text{m}$): at the center, on a $135 \mu\text{m}$ diameter circle (light grey) and on a $270 \mu\text{m}$ diameter circle (dark grey). (b) Axis gap between the RCP ellipse orientation and LCP ellipse orientation, computed at the same 17 pixels. The gaps lie between 0° and 90° .

In order to limit the distortion of the CD-SHG signal and to avoid artifactual CD-SHG images affected by linear dichroism, imaging was restricted to central Regions Of Interest (ROIs) with quasi perfect circular polarizations in every pixel. The widest imaging area for our CD-SHG measurements was then $100 \mu\text{m}$ by $100 \mu\text{m}$ ($e > 0.96$ for RCP and LCP), and we even performed the majority of measurements in areas of $40 \mu\text{m}$ by $40 \mu\text{m}$ ($e > 0.98$ for RCP and LCP).

3.2. CD-SHG is highly sensitive to noise

In linear optics, circular dichroism (CD) originates in interactions between electric and magnetic dipole moments, which results in a weak signal [29]. In nonlinear optics, CD-SHG may also involve electric and magnetic contributions or purely electric interactions depending on the material [21, 30, 31]. Nevertheless, CD-SHG signal can reach higher values than conventional CD, and published CD-SHG data on collagen span a wide range of values: between 5 % to nearly 100 % depending on the studied tissue [17, 18, 22, 23]. CD-SHG signal is also reported to be non zero only for collagen fibrils lying out of the focal plane [17, 18, 24]. Yet, the SH intensity $I^{2\omega}$ scales as $\cos^2(\psi)$, where ψ is the out-of-plane orientation of the collagen fibrils, so it decreases while ψ increases [32]. As a consequence, the CD-SHG signal corresponds to the normalized difference between two low signals, $I_R^{2\omega}(\psi \neq 0)$ and $I_L^{2\omega}(\psi \neq 0)$, and is therefore quite sensitive to the noise. As photon counting is used, a photon noise (shot noise) affects $I_R^{2\omega}$ and $I_L^{2\omega}$: these two intensities are two random variables following Poisson distributions whose parameters $\lambda_{R,L}$ are their respective mean values. The probability to count $I_{R,L}^{2\omega} = n$ photons knowing $\lambda_{R,L} = I_{R,mean}^{2\omega}$ or $I_{L,mean}^{2\omega}$ is written:

$$P(I_{R,L}^{2\omega} = n) = \frac{e^{-\lambda_{R,L}} \lambda_{R,L}^n}{n!} \quad (6)$$

The CD-SHG is thus a combination of such variables. The sum of two Poisson variables with parameters λ_1 and λ_2 follows as well a Poisson distribution with parameter $(\lambda_1 + \lambda_2)$. The CD-SHG is then written as ratios of Poisson variables and consequently its distribution does not have an easy expression [33, 34]. Therefore, we performed numerical simulations to calculate the dispersion of CD-SHG values measured when a Poisson noise affects $I_L^{2\omega}$ and $I_R^{2\omega}$. Theoretical values for the average intensity, $N_{av,th}^{2\omega} = \frac{I_{L,mean}^{2\omega} + I_{R,mean}^{2\omega}}{2}$, and for the CD-SHG, $CD_{th} = \frac{I_{L,mean}^{2\omega} - I_{R,mean}^{2\omega}}{N_{av,th}^{2\omega}}$, that should be measured at one pixel without Poisson noise are set for each simulation. We then derive the Poisson distribution (Eq. 6) of $I_R^{2\omega}$ and $I_L^{2\omega}$ whose parameters are respectively:

$$\begin{aligned} I_{R,mean}^{2\omega} &= N_{av,th}^{2\omega} * \left(1 - \frac{CD_{th}}{2}\right) \\ I_{L,mean}^{2\omega} &= N_{av,th}^{2\omega} * \left(1 + \frac{CD_{th}}{2}\right) \end{aligned} \quad (7)$$

According to these distributions, we generate several pairs $(I_R^{2\omega}, I_L^{2\omega})$ taking Poisson noise into account and calculate the corresponding CD-SHG value and average SH intensity $N_{av}^{2\omega}$. The dispersion of CD-SHG values is shown in Fig. 3. Here, CD_{th} is always set to 0.5 and 100 pairs $(I_R^{2\omega}, I_L^{2\omega})$ are generated for each value of $N_{av,th}^{2\omega}$ ranging from 1 to 100 photons. With these pairs, 10 000 CD-SHG values are computed and plotted against the computed $N_{av}^{2\omega}$ (Fig. 3(a)). Simulations performed with other values of CD_{th} ranging from 0 to 1 gave similar results, indicating that the CD-SHG dispersion does not depend on its central value. We note that CD-SHG dispersion is higher at low average SH intensity $N_{av}^{2\omega}$, and decreases as $\frac{1}{\sqrt{K}}$ when $N_{av}^{2\omega}$ is multiplied by K . In other words, the CD-SHG accuracy increases in the same way as the Signal to Noise Ratio of $(I_L^{2\omega} - I_R^{2\omega})$.

Most importantly, at typical SH intensities obtained during CD-SHG experiments, that is between 10 to 50 photons, the standard deviation of CD-SHG measurements is still quite important, between 0.45 to 0.20 respectively. A higher SH intensity is therefore required to sufficiently improve the accuracy of CD-SHG measurements. Since illuminating the sample with

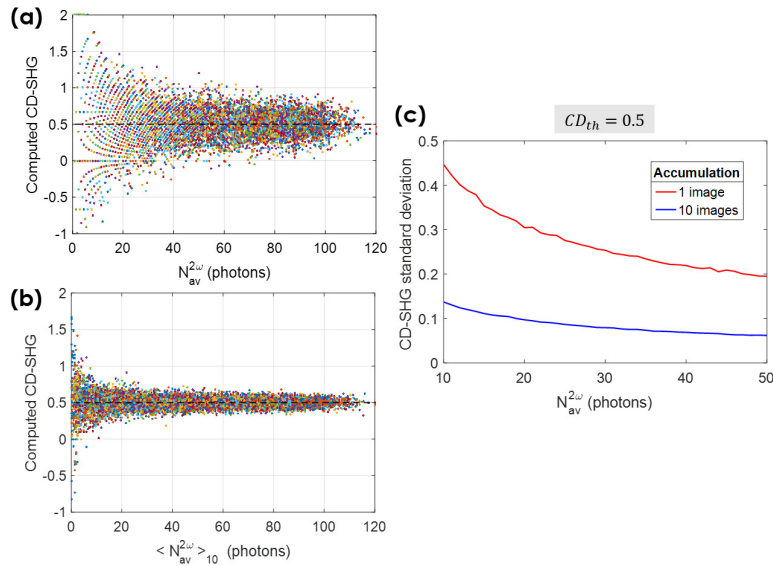


Fig. 3. Dispersion of the CD-SHG values due to Poisson noise affecting $I_R^{2\omega}$ and $I_L^{2\omega}$, as a function of the average SHG signal with or without accumulation. (a) Dispersion scatterplot without accumulation: every point of the scatterplot corresponds to a simulated measure ($N_{av}^{2\omega}$, CD-SHG). (b) Same scatterplot for 10 accumulated values: the measure ($N_{av}^{2\omega}$, CD-SHG) is computed from the average of 10 values of $I_R^{2\omega}$ and $I_L^{2\omega}$ taking Poisson noise into account. (c) Standard deviations of CD-SHG values generated from the theoretical values $CD_{th} = 0.5$ and $N_{av,th}^{2\omega}$ ranging from 10 to 50 photons, without accumulation (in red) and with 10 accumulated values (in blue).

more laser power is not an option due to the damage that high power could cause to biological samples, a way to increase the SH intensity at one point while keeping the sample safe is to accumulate measurements, that is to record the same image several times. Indeed, measurements with accumulation avoid any damage to the sample if they are done in a "time-lapse" mode (with several second breaks between each image) so that the sample can relax between two images. In practice, K RCP (resp. LCP) images are accumulated and average together to obtain a single image with better SNR. The computed CD-SHG is then less dispersed: its dispersion equals the one obtained with an average SH intensity multiplied by K , *ie* it is divided by \sqrt{K} . The scatterplot in Fig. 3(b) illustrates the case when 10 images are accumulated: the CD-SHG values are indeed $\sim \sqrt{10}$ times closer to the expected CD_{th} than CD-SHG without accumulation (Fig. 3(a)). The accuracy improvement with time-lapse acquisitions is emphasized in Fig. 3(c) that shows the standard deviation of CD-SHG values obtained with an average SH intensity $N_{av,th}^{2\omega}$ ranging from 10 to 50 photons, when only one image is taken (in red) and when 10 images are accumulated (in blue). The standard deviations drops from [0.20 ; 0.45] in the first case to [0.06 ; 0.14] with 10 accumulated images, which is then sufficient to perform accurate CD-SHG measurements.

3.3. Time-lapse CD-SHG measurements are sensitive to slight movements

Time-lapse CD-SHG imaging (*ie* CD-SHG imaging with image accumulation) was used to study collagen fibrils from rat tail tendons, in order to improve the accuracy of the CD-SHG signal. Indeed, a very weak signal is expected from these thin collagen fibrils as the tendon is made quite flat during sample preparation and lies within the focal plane ($\psi \approx 0$).

When accumulating 4 images as shown in Fig. 4, a horizontal drift (toward $x > 0$) of 300

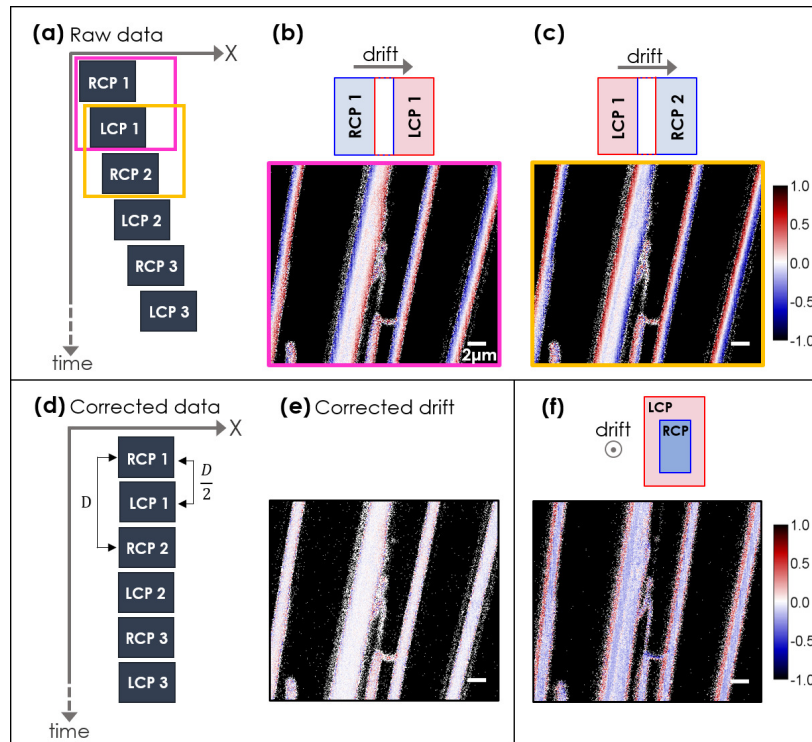


Fig. 4. Effects of lateral (a-c) and axial (f) drifts on CD-SHG signal of collagen fibrils from rat tail tendon. A lateral drift as shown in (a) leads to artifactual strip patterns orthogonal to the drift. The pattern orientation depends on the image chosen as reference for registration: in (b) RCP1 and LCP1 are chosen as references, while in (c) RCP2 and LCP1 are references. A post-processing algorithm is needed to correct for the lateral drift (d) and recover the true CD-SHG signal (e). (f) Axial drift also leads to artifactual CD-SHG signal, and cannot be corrected with simple post-processing. Scale bar = 2 μm .

nm was identified in the RCP image stack as well as in the LCP image stack between the first and the last image, corresponding to a slight drift of approximately 75 nm between each image, *ie* approximately 1 nm/s. Such a small drift is not surprising and is commonly observed in super-resolution imaging. Image registration was thus required before averaging together the RCP, resp. LCP, images. As the 75 nm-drift was not visible between the first two images, two different image registration protocols were performed to verify whether this small lateral drift could affect the CD-SHG signal. The two data processing procedures differed only by the choice of the "reference" image on which the other images were registered before averaging (one has to note that the image acquisition was done in the order illustrated by Fig. 4(a), so that RCP1 and LCP1 were taken successively). First, we chose the first RCP image (referred to as RCP1) and the first LCP image (LCP1) as reference images (Fig. 4(b)). Secondly, we used RCP2 and LCP1 as reference images (Fig. 4(c)). If the lateral drift had no effect on the CD-SHG signal, the two resulting CD-SHG images would have displayed the same patterns. However, we saw that the "blue-white-red" strip pattern from the first processing turned into a "red-white-blue" strip pattern with the second processing. This indicates that the CD-SHG signal was purely artifactual in this case, and that the slight 75 nm-drift created an artificial pattern that could have been misinterpreted as a structural information on collagen fibrils.

To understand this artifact, one should remember that CD-SHG has the sign of $I_L^{2\omega} - I_R^{2\omega}$ and that the images were sequentially taken in this order: RCP1, then LCP1, then RCP2, and so on. In the case of Fig. 4(b), LCP1 drifted 75 nm to the right from RCP1, so the right part of the strip pattern has a positive CD-SHG signal (red) simply because $I_L^{2\omega} - I_R^{2\omega} = I_L^{2\omega} - 0$ is positive. Similarly, the left part of the strip pattern has a negative CD-SHG signal (blue) as $I_L^{2\omega} - I_R^{2\omega} = 0 - I_R^{2\omega}$ is negative. Similar considerations apply to explain the patterns in Fig. 4(c), considering that RCP2 drifted 75 nm to the right compared to LCP1.

To correct for this lateral drift and measure a non-artifactual CD-SHG signal, our data post-processing was improved, assuming the drift to be linear during the whole acquisition, which is a reasonable approximation given the small amplitude of the drift. A basic registration of LCP images on RCP images cannot be used here, as it makes the LCP and RCP structures fully overlaid even though they are truly different, so the CD-SHG signal is artifactually canceled. In contrast, it is possible to register directly the RCP2 image on the RCP1 image, as these two images are expected to show the exact same structures. Thereby, we extracted the drift D that transformed RCP2 image back into RCP1 image. Because LCP1 image was acquired between RCP1 and RCP2, applying half the transformation $\frac{D}{2}$ to LCP1 shifted it back to RCP1 image. Once RCP1 and LCP1 were properly aligned with each other, they could be chosen as reference images to register all the data (Fig. 4(d)). In this case, the true CD-SHG signal appears to be almost zero everywhere (Fig. 4(e)).

To avoid a time-consuming data post-processing, a simple way to minimize the lateral drift is to mechanically stabilize the sample by adding weights on the holder. In our case, the weights consist in a 50 g metal washer. However any addition of weights has to be followed by a sufficient rest period (typically 15 minutes) in order to completely stabilize the stage and avoid any drift in the axial direction that occurs before the holder reaches its equilibrium position. Such an axial drift causes a slight defocus during the acquisition, making the images more and more blurred, so with darker and larger structures. Fig. 4(f) shows the artifactual CD-SHG signal obtained with an axial drift, where the LCP image, acquired after the RCP one, is defocused. The negative (blue) CD-SHG signal in the middle of the fibrils is the consequence of LCP image being less bright than RCP image, and the positive CD-SHG signal (red) at the edges of the fibrils are due to LCP image blurring (leading to image enlargement). An axial drift can also be caused by a capillary attraction between the sample and the objective with water immersion, but addition of weights on the sample holder also addresses this issue.

In practice, this "weight and wait" protocol enables to mechanically stabilize the sample and to perform time-lapse CD-SHG measurements without any mechanical drift.

3.4. Optimized CD-SHG imaging of cornea

Thanks to rigorous artifact controls and corrections (optimization of polarizations and drift minimization), reliable CD-SHG imaging could be done to study collagen structures in human corneas, which present a more complex 3D architecture than tendons. Collagen fibrils in cornea are aligned into stacked lamellae in different en-face orientations, providing a great range of out-of-plane angles when a transverse corneal section is imaged. Single measurements (with no image accumulation) were first performed on a human cornea transverse section and a CD-SHG signal as high as 100 % was extracted (Fig. 5(a)). Time-lapse measurements with 12 accumulated images were then done on the same area (Fig. 5(b)). As expected, a better accuracy in CD-SHG is reached with time-lapse measurements. In this CD-SHG image, the alternation of in-plane and out-of-plane lamellae is clearly visualized: the whitest stripes correspond to almost in-plane lamellae while stronger CD-SHG signal corresponds to out-of-plane structures. This is the opposite of the average SH intensity image (\sim conventional SHG image), where the in-plane structures are the only ones that provide a fairly good signal. The anti-correlation of the two signals is highlighted in Fig. 5(c) where the average SH intensity image (in green) and the

absolute value of the CD-SHG image (in magenta) are overlapped. The profile plotted in Fig. 5(d) displays more clearly the signal anti-correlation in the area delimited by the white rectangle in Fig. 5(c). It confirms that CD-SHG signal is weak when SH intensity is maximum (for in-plane collagen structures), and is higher (in absolute value) for structures with a low SH intensity. As a consequence, combining the two modalities allows a great visualization of all the structures constituting the tissue, regardless of their in-plane or out-of-plane orientations.

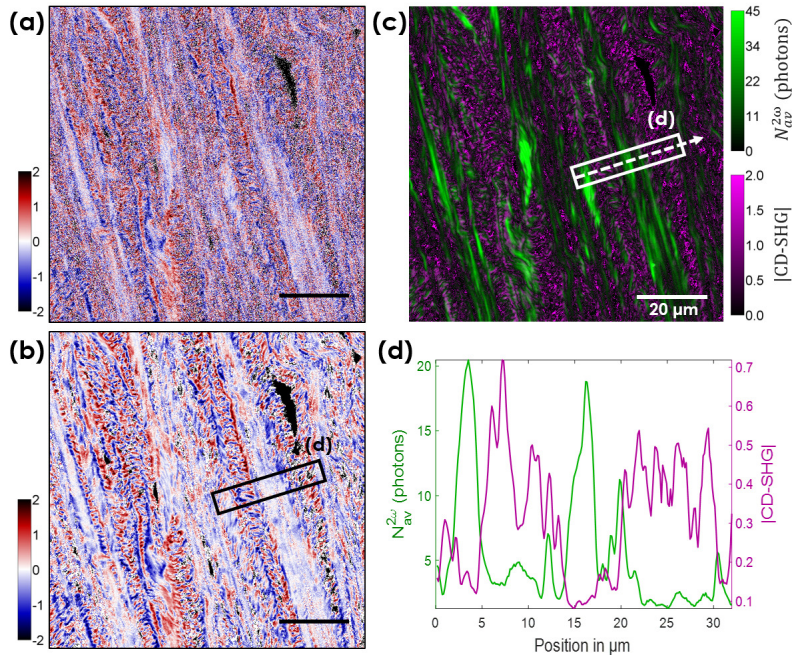


Fig. 5. SHG and CD-SHG imaging of a human cornea transverse section. (a) CD-SHG imaging without image accumulation. (b) CD-SHG imaging with 12 accumulated images. (c) Overlap of the average SH intensity (in green) and the absolute value of CD-SHG (in magenta). (d) Profile plot of the average SH intensity (in green) and CD-SHG absolute value (in magenta) along the white rectangle drawn in (c) (corresponding to the black rectangle drawn in (b)). The values are averaged in the direction perpendicular to the white arrow. Scale bar = 20 μm .

4. Conclusion

This study demonstrates that CD-SHG imaging of collagen is highly sensitive to two types of experimental issues: imperfect circular polarizations and slight movements, regularly encountered in microscopy devices. A weak impairment in ellipticities can lead to strong imaging artifacts in CD-SHG (see Section 3.1) and a slight sample drift, even in the order of the pixel size (a few tens of nanometers), can be detrimental to a correct computation of the CD-SHG (see Section 3.3).

It is crucial to control and remove these artifacts because they may lead to incorrect interpretation of CD-SHG images. This can be done using the protocols described in this paper. First, the ellipticities of RCP and LCP must be controlled by two quarter waveplates to be precisely optimized at the center of the field of view, and then characterized throughout the whole field of view in order to select an imaging area where their values are higher than 0.98. Secondly, sample movement must be avoided as much as possible by mechanical stabilization before each CD-SHG experiment. Other strategies may be used to overcome these slight drift issues, like

fiducial nano-beads used in super-resolution. For our CD-SHG experiments, the "weight and wait" protocol appears to be sufficient. If necessary, it can be completed by an appropriate post-processing drift correction, provided some conditions: RCP and LCP images are recorded at a regular pace, the drift is small enough to be considered linear during the acquisition, and it belongs to the focal plane only (no axial drift). Another solution might be to implement a fast RCP/LCP switching based on line-to-line (or even pixel-to-pixel) switching of polarization using an electro-optical modulator (EOM), as in [35]. However, as the EOM is located outside the SHG microscope, before galvanometric and dichroic mirrors, a careful calibration may not be sufficient to reach quasi-perfect circular polarizations.

Moreover, as low SHG signals are measured while performing CD-SHG, a strategy of accumulated measurements in a time-lapse mode is proposed in this paper, to improve measurement accuracy. As it extends the acquisition time, the sample drift issue becomes all the more challenging, but can be removed with the same protocol.

The control and correction of all these issues enable the detection of artifact-free CD-SHG signal and allow a reliable study of collagen structure in tissues. We showed that CD-SHG imaging is efficient to visualize the out-of-plane structures in cornea transverse sections and that the combination of this mode of contrast with regular SHG imaging, which highlights fibrils lying in the focal plane, allows the visualization of all fibrils in a tissue, whatever their 3D orientation. Artifact-free CD-SHG imaging therefore appears as a unique technique to explore the 3D organization of tissues.

Appendix 1: Numerical simulations with elliptical polarizations

Numerical simulations were performed with Matlab in order to quantify the distortion of the CD-SHG signal as a function of the ellipticity. For the sake of simplicity, plane wave and electric dipolar approximations were used. The calculation was consistent with previous derivations [17, 18] and the values reported in [17] were used for the components of the third-rank susceptibility tensor χ^2 :

$$\frac{\chi_{xyy}^{(2)}}{\chi_{xxx}^{(2)}} = 0.63, \quad \frac{\chi_{yyx}^{(2)}}{\chi_{xxx}^{(2)}} = 0.48, \quad \frac{\chi_{yzx}^{(2)}}{\chi_{xxx}^{(2)}} = -0.14 - 0.19i \quad (8)$$

We first focused on the case where the imperfect RCP and LCP beams have their elliptical polarizations identically oriented (the gap between the major axes of RCP and LCP ellipses is 0°). The main results are displayed in the first column of Table 1 and Table 2: distortions of the CD-SHG signal are computed as the maximum difference between the CD-SHG obtained with imperfect circular polarizations and the "perfect" CD-SHG obtained when $e(RCP) = e(LCP) = 1$, normalized to the perfect CD-SHG. First column of Table 1 shows that the same defect in circularity for both polarizations (that is an identical ellipticity $e < 1$ for RCP and LCP) artifactually reduces the absolute value of CD-SHG, and that this effect increases as the ellipticity decreases. A decrease of 5 % of the CD-SHG signal is found for $e(RCP) = e(LCP) = 0.9$. First column of Table 2 shows that even more dramatic effects occur when RCP and LCP exhibit different ellipticities, even when one of them is close to 1. Here, $e(RCP) = 0.98$ and $e(LCP)$ ranges from 0.82 to 0.98, and a distortion up to 21 % occur in the CD-SHG signal.

Then, because the linear field contributes differently to the SHG depending on its polarization orientation with respect to collagen fibrils, we looked at the distortion of CD-SHG signal when RCP and LCP beams do not have the same ellipse axis of polarization. This leads either to an important increase (when the axis of the LCP ellipse is closer to the collagen fibrils axis than the RCP axis) or decrease (when the RCP axis is closer than LCP axis to the collagen orientation) of the CD-SHG signal. The maximum signal distortion rates are mentioned in the last two columns of Table 1 and Table 2, in the cases of a 45° axis gap and 90° axis gap.

Table 1. Maximum Distortion of CD-SHG with $e(\text{RCP})=e(\text{LCP})$

Ellipticity	Axis gap	0°	45°	90°
	1		0 %	0 %
0.9		5 %	18 %	28 %
0.8		16 %	50 %	69 %
0.7		35 %	95 %	119 %
0.6		64 %	144 %	167 %
0.5		100 %	183 %	201 %

Table 2. Maximum Distortion of CD-SHG with $e(\text{RCP})=0.98$ and varying $e(\text{LCP})$

$e(\text{LCP})$	Axis gap	0°	45°	90°
	0.98		1 %	3 %
0.94		7 %	9 %	11 %
0.90		13 %	15 %	18 %
0.86		17 %	19 %	22 %
0.82		21 %	23 %	26 %

These simulations raised two points that have to be tackled before CD-SHG imaging: the two circular incident polarizations used to excite the sample must be very similar either in terms of ellipticity or axis orientation, and they must exhibit ellipticities very close to 1. Otherwise, the distortion of CD-SHG signal is too important and imaging artifacts are obtained.

Appendix 2: CD-SHG imaging of collagen membranes

CD-SHG imaging of a collagen membrane, that provides less heterogeneous response than cornea, is presented here to highlight the artifacts that may occur because of inhomogeneities in the incident polarization ellipticities throughout the field of view. Fig. 6 shows the same area of the membrane imaged twice: first when this area is placed at the border of the field of view (Figs. 6(a) and 6(b)) and then when it is centered in the middle of the field of view (Fig. 6(c)). The measured CD-SHG signals differ significantly, which should not be the case if the incident polarization ellipticities were identical throughout the field of view.

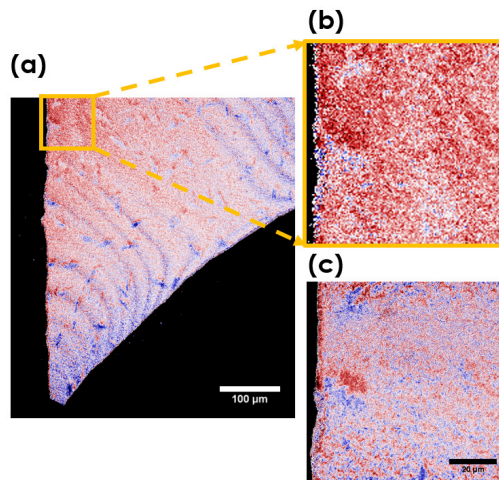


Fig. 6. CD-SHG imaging of a casted collagen membrane. (a) CD-SHG image with a large field-of-view ($540\ \mu\text{m} \times 540\ \mu\text{m}$). (b) Zoom-in on the yellow rectangle drawn on top of the image in (a). (c) CD-SHG imaging of the exact same area as in (b), after moving the sample to center this area in the middle of the field of view. Scale bar = $20\ \mu\text{m}$.

Funding

Agence Nationale de la Recherche (ANR) (ANR-10-INBS-04 France BioImaging, ANR-11-EQPX-0029 Morphoscope2).

Acknowledgments

The authors thank Nicolas Olivier, Vincent Maioli and Emmanuel Beurepaire for helpful scientific discussions, Michèle Savoldelli for human corneas handling, l'Établissement Français du Sang (EFS, Paris) and la Banque Française des Yeux (BFY, Paris) for providing human corneas. M.S. acknowledges financial support from the École Doctorale Interfaces, Univ. Paris-Saclay.

Disclosures

The authors declare that there are no conflicts of interest related to this article.

References

1. D. Hulmes, "Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures," *J. Struct. Biol.* **137**, 2–10 (2002).
2. K. L. Goh, A. Listrat, and D. Bechet, "Hierarchical mechanics of connective tissues: Integrating insights from nano to macroscopic studies," *J. Biomed. Nanotechnol.* **10**, 2464–2507 (2014).
3. P. Fratzl and R. Weinkamer, "Nature's hierarchical materials," *Prog. Mater. Sci.* **52**, 1263–1334 (2007).
4. X. Y. Chen, O. Nadiarynh, S. Plotnikov, and P. J. Campagnola, "Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure," *Nat. Protoc.* **7**, 654–669 (2012).
5. S. Bancelin, C. Aimé, I. Gusachenko, L. Kowalczyk, G. Latour, T. Coradin, and M.-C. Schanne-Klein, "Determination of collagen fibril size via absolute measurements of second-harmonic generation signals," *Nat. Commun.* **5** (2014).
6. P. Stoller, K. Reiser, P. Celliers, and A. Rubenchik, "Polarization-modulated second harmonic generation in collagen," *Biophys. J.* **82**, 3330–3342 (2002).
7. F. Tiaho, G. Recher, and D. Rouède, "Estimation of helical angle of myosin and collagen by second harmonic generation imaging microscopy," *Opt. Express* **15**, 12286–12295 (2007).
8. A. E. Tuer, M. K. Akens, S. Krouglov, D. Sandkuijl, B. C. Wilson, C. M. Whyne, and V. Barzda, "Hierarchical model of fibrillar collagen organization for interpreting the second-order susceptibility tensors in biological tissue," *Biophys. J.* **103**, 2093–2105 (2012).
9. I. Gusachenko, V. Tran, Y. Goulam Houssen, J.-M. Allain, and M.-C. Schanne-Klein, "Polarization-resolved second-harmonic generation in tendon upon mechanical stretching," *Biophys. J.* **102**, 2220–9 (2012).

10. J. Duboisset, D. Ait-Belkacem, M. Roche, H. Rigneault, and S. Brasselet, "Generic model of the molecular orientational distribution probed by polarization-resolved second-harmonic generation," *Phys. Rev. A* **85**, 043829 (2012).
11. C. P. Brown, M. A. Houle, K. Popov, M. Nicklaus, C.-A. Couture, M. Laliberté, T. Brabec, A. Ruediger, A. J. Carr, A. J. Price, H. S. Gill, L. Ramunno, and F. Légaré, "Imaging and modeling collagen architecture from the nano to micro scale," *Biomed. Opt. Express* **5**, 233–243 (2014).
12. A. Golaraei, L. Kontenis, R. Cisek, D. Tokarz, S. J. Done, B. C. Wilson, and V. Barzda, "Changes of collagen ultrastructure in breast cancer tissue determined by second-harmonic generation double stokes-mueller polarimetric microscopy," *Biomed. Opt. Express* **7**, 4054–4068 (2016).
13. A. Benoit, G. Latour, M.-C. Schanne-Klein, and J.-M. Allain, "Simultaneous microstructural and mechanical characterization of human corneas at increasing pressure," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **60**, 93–105 (2016).
14. M. Rivard, C.-A. Couture, A. K. Miri, M. Laliberté, A. Bertrand-Grenier, L. Mongeau, and F. Légaré, "Imaging the bipolarity of myosin filaments with Interferometric Second Harmonic Generation microscopy," *Biom. Opt. Express* **4**, 2078–86 (2013).
15. M. Rivard, K. Popov, C.-A. Couture, M. Laliberté, A. Bertrand-Grenier, F. Martin, H. Pépin, C. P. Pfeffer, C. Brown, L. Ramunno, and F. Légaré, "Imaging the noncentrosymmetric structural organization of tendon with Interferometric Second Harmonic Generation microscopy," *J. Biophotonics* **7**, 638–646 (2014).
16. C.-A. Couture, S. Bancelin, J. Van der Kolk, K. Popov, M. Rivard, K. Légaré, G. Martel, H. Richard, C. Brown, S. Laverty, L. Ramunno, and F. Légaré, "The Impact of Collagen Fibril Polarity on Second Harmonic Generation Microscopy," *Biophys. J.* **109**, 2501–10 (2015).
17. H. Lee, M. J. Huttunen, K. J. Hsu, M. Partanen, G. Y. Zhuo, M. Kauranen, and S.-W. Chu, "Chiral imaging of collagen by second-harmonic generation circular dichroism," *Biomed. Opt. Express* **4**, 909–16 (2013).
18. G. Y. Zhuo, M. Y. Chen, C. Y. Yeh, C. L. Guo, and F. J. Kao, "Fast determination of three-dimensional fibril orientation of type-I collagen via macroscopic chirality," *Appl. Phys. Lett.* **110**, 023702 (2017).
19. T. P. Petralli-Mallow, T. M. Wong, J. D. Byers, H. I. Yee, and J. M. Hicks, "Circular dichroism spectroscopy at interfaces: a surface second harmonic generation study," *J. Phys. Chem.* **97**, 1383–1388 (1993).
20. M. Kauranen, S. Verbiest, J. J. Maki, and A. Persoons, "Second-harmonic generation from chiral surfaces," *J. Chem. Phys.* **101**, 8193–8199 (1994).
21. A.-M. Pena, T. Boulesteix, T. Dartigalongue, and M.-C. Schanne-Klein, "Chiroptical effects in the second harmonic signal of collagens I and IV," *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 10314–10322 (2005).
22. X. Chen, C. Raggio, and P. J. Campagnola, "Second-harmonic generation circular dichroism studies of osteogenesis imperfecta," *Opt. Lett.* **37**, 3837–9 (2012).
23. K. R. Campbell and P. J. Campagnola, "Wavelength-Dependent Second Harmonic Generation Circular Dichroism for Differentiation of Col I and Col III Isoforms in Stromal Models of Ovarian Cancer Based on Intrinsic Chirality Differences," *J. Phys. Chem. B* **121**, 1749–1757 (2017).
24. A. Golaraei, M. K. Akens, V. Barzda, K. Mirsanaye, B. C. Wilson, Y. Ro, and S. Krouglov, "Collagen chirality and three-dimensional orientation studied with polarimetric second-harmonic generation microscopy," *J. Biophotonics* **12**, e201800241 (2018).
25. F. Gobeaux, G. Mosser, A. Anglo, P. Panine, P. Davidson, M.-M. Giraud-Guille, and E. Belamie, "Fibrillogenesis in dense collagen solutions: A physicochemical study," *J. Mol. Biol.* **376**, 1509 – 1522 (2008).
26. I. Bergman and R. Loxley, "Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline," *Anal. Chem.* **35**, 1961–1965 (1963).
27. C. Teulon, I. Gusachenko, G. Latour, and M.-C. Schanne-Klein, "Theoretical , numerical and experimental study of geometrical parameters that affect anisotropy measurements in polarization-resolved SHG microscopy," *Opt. Express* **23**, 10168–10176 (2015).
28. P. Mahou, G. Malkinson, É. Chaudan, T. Gacoin, E. Beaufort, and W. Supatto, "Metrology of multiphoton microscopes using second harmonic generation nanoprobe," *Small* **13**, 1701442 (2017).
29. L. D. Barron, *Molecular Light Scattering and Optical Activity* (Cambridge University, 2004), 2nd ed.
30. M. Kauranen, J. J. Maki, T. Verbiest, S. Van Elshocht, and A. Persoons, "Quantitative determination of electric and magnetic second-order susceptibility tensors of chiral surfaces," *Phys. Rev. B* **55**, R1985–R1988 (1997).
31. F. Hache, H. Mesnil, and M.-C. Schanne-Klein, "Application of classical models of chirality to surface second harmonic generation," *J. Chem. Phys.* **115**, 6707–6715 (2001).
32. C. Teulon, A. Tidu, F. Portier, G. Mosser, and M.-C. Schanne-Klein, "Probing the 3D structure of cornea-like collagen liquid crystals with polarization-resolved SHG microscopy," *Opt. Express* **24**, 16084–16098 (2016).
33. J. J. Gart, "The Analysis of Ratios and Cross-Product Ratios of Poisson Variates with Application to Incidence Rates," *Commun. Stat. - Theory Methods* **7**, 917–937 (1978).
34. T. F. Griffin, "Distribution of the ratio of two poisson random variables," Master thesis, Texas Tech University, USA (1992).
35. G. Ducourthial, J.-s. Affagard, M. Schmeltz, X. Solinas, M. Lopez-Poncelas, C. Bonod-Bidaud, R. Rubio-Amador, F. Ruggiero, J.-M. Allain, E. Beaufort *et al.*, "Monitoring dynamic collagen reorganization during skin stretching with fast polarization-resolved second harmonic generation imaging," *J. Biophotonics* **12**, e201800336 (2019).

3 Procédures expérimentales et numériques adoptées

En complément des points abordés dans l'article, nous ajoutons ici quelques détails sur les procédures expérimentales à respecter pour le CD-SHG. Tout d'abord, les paramètres et le mode d'acquisition ont été optimisés de façon à obtenir une image de CD-SHG exploitable sans dégrader l'échantillon. Ensuite, nous reviendrons sur la mise en place numérique du *time-lapse* et sur le contrôle de la dérive identifiée expérimentalement.

3.1 Paramètres d'acquisition optimaux

Comme détaillé dans l'article, le signal de CD-SHG est obtenu par la différence entre deux signaux qui peuvent être assez faibles (I_R et I_L) et il est donc sensible au bruit. Il est alors nécessaire pour les mesures de CD-SHG d'allonger le temps d'acquisition et de diminuer la taille de chaque pixel, ce dernier point permettant un sur-échantillonnage pour éventuellement moyenniser certains pixels entre eux lors du traitement de données. Notre résolution latérale étant de 360 nm, l'échantillonnage de Nyquist correspond à 180 nm par pixel³. La figure IV.3 présente l'imagerie CD-SHG de fibrilles issues d'un tendon de queue de rat pour deux échantillonnages différents : 338 nm *vs* 105 nm par pixel. Le premier donne une taille pixel légèrement plus petite que la taille résolue, mais n'atteint pas la fréquence de Nyquist. Si cette taille pixel est suffisante pour la P-SHG, on voit ici qu'elle est en revanche insuffisante pour le CD-SHG et ne permet pas une séparation claire des structures. Le deuxième échantillonnage permet quant à lui de distinguer différentes structures du tendon, malgré la densité du tissu.

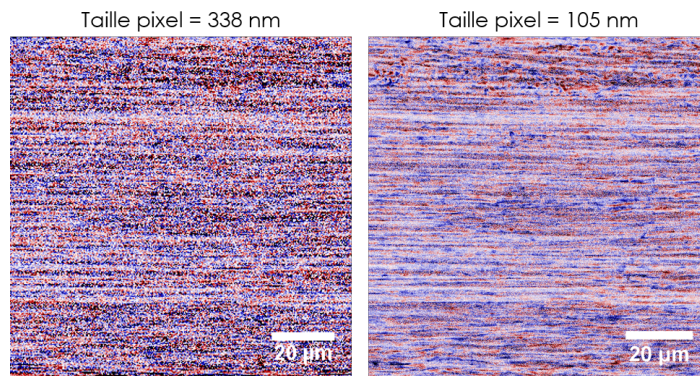


Figure IV.3 – Imagerie en CD-SHG de tendon à différents échantillonnages.

Les paramètres d'acquisition optimaux retenus pour nos expériences en CD-SHG sont 10 à 20 μ s de temps d'exposition par pixel ainsi qu'une taille pixel de 100 à 140 nm.

3.2 Mise en place du *time-lapse* et contrôle de la dérive

Les paramètres d'acquisition retenus correspondent à un échantillonnage spatial important ainsi qu'à un temps d'acquisition par pixel augmenté par rapport à la P-SHG, occasionnant une exposition plus longue de l'échantillon au laser et donc une plus forte probabilité de créer des dommages. Si, de plus, pour améliorer la précision du signal CD-SHG d'un facteur \sqrt{N} , une accumulation de N images est faite sans interruption de l'excitation laser, la puissance moyenne reçue par l'échantillon devient trop forte et des dégradations sont visibles (Fig. IV.4). Expérimentalement, nous avons constaté que des temps d'attente de plusieurs dizaines de secondes (durée variable selon les échantillons) entre chaque image, c'est-à-dire une accumulation en mode *time-lapse*, permet à l'échantillon de ne pas

3. Cette valeur est donnée comme ordre de grandeur. Elle ne peut pas être utilisée telle quelle dans notre cas où le signal détecté est issu d'un processus cohérent.

trop s'échauffer et retarde l'apparition de dégradations⁴. Un module Labview a été écrit pour ajouter ce mode d'acquisition *time-lapse* avec une durée ajustable (mais constante sur toute la durée de l'acquisition) entre chaque image, et un algorithme d'analyse de données a été mis en place sous Fiji (ImageJ) pour prendre en charge tout type de données (pile d'images en profondeur ou Z unique, avec ou sans *time-lapse*).

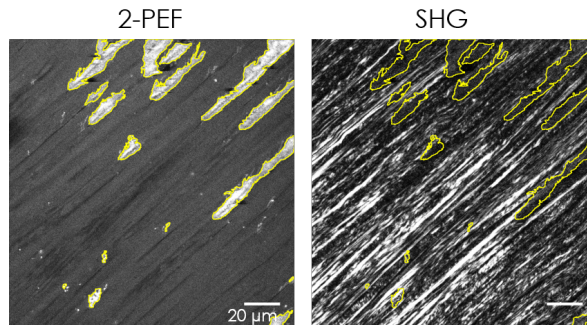


Figure IV.4 – Images en fluorescence (gauche) et en SHG (droite) d'une coupe transverse de cornée humaine. Il s'agit de la quatrième image consécutive d'une accumulation sans pause entre images : d'importantes dégradations sont visibles en fluorescence, et correspondent à une perte du signal SHG (zones en jaune).

Le mode d'acquisition *time-lapse* a mis en évidence une dérive mécanique présente sur notre système expérimental. Cette dérive a été quantifiée allant de quelques dizaines de nanomètres jusqu'au micron selon les expériences. Différents essais de stabilisation mécanique ont été effectués pour minimiser la dérive pendant l'acquisition, notamment l'ajout de poids avec des rondelles métalliques pesantes pouvant solidement s'ancrer sur les lamelles contenant l'échantillon, tout en laissant libre l'espace central d'imagerie (système visible en figure IV.5).



Figure IV.5 – Porte-échantillon adapté pour stabiliser l'échantillon, ici entre deux lamelles de microscopie. Une rondelle métallique vient s'ancrer dans la rondelle inférieure, l'échantillon restant entre les deux. Des demi-lames de verre peuvent aussi être positionnées sur les côtés des rondelles, maintenant la partie externe de l'échantillon.

Nous avons ensuite vérifié la stabilité du système par l'ajout de nano-cristaux de KTP sur un échantillon préparé au laboratoire (ici, des fibrilles de collagène issus d'un tendon de queue de rat). Des lamelles contenant les cristaux de KTP ont été préparées suivant le protocole décrit en 2017 par Pierre Mahou dans Small [94], et les fibrilles de collagène ont été déposées sur cette lamelle et aplaties pour que les plans d'imagerie des fibrilles et des cristaux soient bien confondus (les deux objets doivent être visualisés simultanément pour un même plan focal). Différentes concentrations et différentes tailles de cristaux ont été testées afin de remplir deux critères : une répartition uniforme et pas trop dense des cristaux dans le champ de vue et une bonne séparation des signaux (signal SHG du KTP et signal SHG des fibrilles). Des cristaux de KTP de diamètre 80 nm donnent un signal SHG assez faible qu'on ne peut pas distinguer du signal de l'échantillon. En revanche, des cristaux de diamètre 150 nm saturent rapidement en signal, rendant la séparation des signaux plus immédiate. Pour obtenir une densité correcte, une dilution entre 1 :5000 et 1 :10000 a été utilisée (figure IV.6).

4. Cette approche ne permet en revanche pas de réduire de potentiels dommages liés à la puissance crête du laser, qu'il convient de diminuer au maximum.

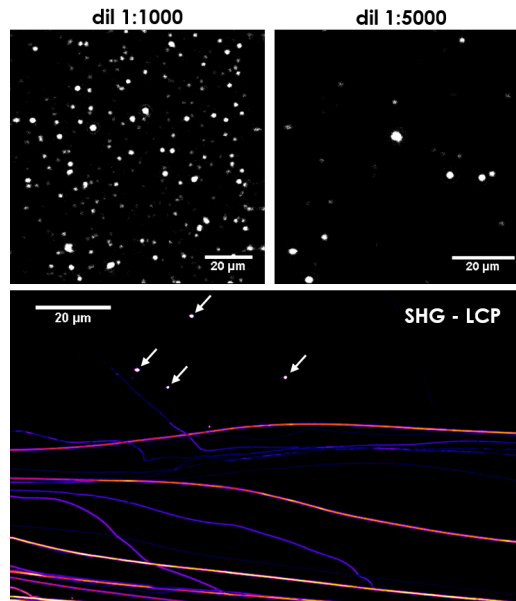


Figure IV.6 – En haut, images SHG de nano-cristaux de KTP pour deux dilutions différentes. La répartition des nano-cristaux est assez uniforme dans les deux cas, mais la densité de KTP est trop importante dans le cas de la dilution 1 :1000. En bas, image SHG de fibres de tendon de queue de rat. Les nano-cristaux (indiqués par les flèches) sont visibles pour la même profondeur d'imagerie.

Les expériences sur nano-cristaux de KTP ont montré l'annulation de la dérive lorsque le protocole "weight and wait" décrit dans l'article est bien suivi. Cette assurance de stabilité est très précieuse, car elle nous autorise à utiliser un temps relativement long pour les expériences de CD-SHG. En effet, le temps minimal pour obtenir une image de CD-SHG de taille $40\ \mu\text{m} \times 40\ \mu\text{m}$, avec accumulation en *time-lapse* de 4 images, est de 24 secondes ($10\ \mu\text{s}$ pour $140\ \text{nm}$ soit environ 3 s par image, $\times 2$ pour laisser reposer l'échantillon, $\times 4$ pour les 4 accumulations) : cela est relativement long pour de l'imagerie et serait inutilisable sans une stabilité parfaite du système. Un algorithme de recalage d'images RCP/LCP, décrit dans l'article en section précédente, a toutefois été mis en place sous Matlab pour traiter des données acquises sans ce protocole et pour lesquelles la stabilisation n'est alors pas parfaite (sous condition de pouvoir négliger la dérive axiale).

Conclusion

Les protocoles expérimentaux et les astuces techniques mis au point durant ce travail rendent désormais possible des mesures fiables du CD-SHG sur tissu biologique. Les artefacts les plus fréquents ont été compris et supprimés de nos expériences, et nous avons désormais une idée de la sensibilité du CD-SHG grâce au calcul de sa dispersion. Cela nous a permis de mesurer de manière fiable le signal de CD-SHG sur des coupes transverses de cornées humaines. Ce tissu, étudié en P-SHG au chapitre III, section 2.2, présente une structuration intéressante en lamelles perpendiculaires entre elles. À notre connaissance, il s'agit ici des premières expériences qui montrent aussi clairement une anti-corrélation entre le signal de CD-SHG et le signal en intensité SHG moyenne. Cette anti-corrélation pourrait être due à un lien entre le CD-SHG et les structures inclinées par rapport au plan d'imagerie (avec un angle hors-plan ψ non nul d'après les conventions angulaires présentées en section 1.1.1 du chapitre II). En effet, ces structures donnent un signal de CD-SHG fort, alors que les structures présentant une forte intensité SHG (structures dans le plan) ont un signal de CD-SHG presque nul. Le CD-SHG apparaît donc comme un outil pertinent pour visualiser les structures hors-plan, bien plus efficace que l'imagerie SHG classique. Toutefois, nous ne savons pas si la mesure du CD-SHG donne directement

accès à la polarité hors plan ψ des structures. Si cela était possible, la combinaison des imageries SHG et CD-SHG permettrait alors une visualisation rapide et complète de l'architecture 3D des tissus. Actuellement, sans mesure directe de ψ , il est nécessaire d'acquérir une pile d'images SHG en profondeur pour reconstruire l'agencement 3D, et la reconstruction peut être ambiguë dans le cas de tissus denses où les fibrilles sont fortement imbriquées les unes dans les autres. Nous développons dans le prochain chapitre des approches théoriques couplées à des vérifications expérimentales pour étudier l'influence quantitative de cet angle sur le signal de CD-SHG.

Chapitre V

Dichroïsme circulaire en microscopie SHG : résultats théoriques et expérimentaux



Sommaire

1	Approche théorique dans l'approximation dipolaire électrique (ADE)	131
1.1	Calcul analytique du CD-SHG	131
1.2	Simulations numériques dans l'ADE	132
1.3	Implications expérimentales	133
2	Mesures expérimentales de CD-SHG	133
2.1	Validation sur cristal	134
2.2	Mesures sur tissus biologiques	135
2.3	Discussions	141
3	Nouvelle approche théorique pour le CD-SHG	142
3.1	Origine microscopique du CD-SHG dans le collagène	142
3.2	Calcul analytique du CD-SHG avec les contributions dipolaires magnétiques ..	144
3.3	Simulations numériques dans l'approche magnétique	148
4	Analyse expérimentale de la dépendance à l'angle hors-plan	156
4.1	Variabilité des tenseurs de susceptibilité non-linéaire dans un même tissu	156
4.2	Étude des contraintes locales	160
4.3	Expériences sur échantillons inclinés	161
5	Discussion et conclusion sur le CD-SHG	167
5.1	Récapitulation et analyse des étapes de travail	168
5.2	Discussion : variabilité spatiale de la réponse SHG	169
5.3	Discussion : origine du CD-SHG et pertinence en imagerie	171

Dans ce chapitre, nous nous intéressons aux informations que le CD-SHG est capable d'apporter sur les échantillons étudiés. En particulier, nous souhaitons relier le CD-SHG à des paramètres

géométriques de la structure microscopique de l'échantillon : il nous faut pour cela établir l'expression analytique du CD-SHG, ce qui nécessite de comprendre les mécanismes physiques à l'origine de ce signal. Depuis 2013, quelques simulations numériques du signal de CD-SHG ont été proposées dans la littérature, sans toutefois être accompagnées d'expressions analytiques. Elles partent toutes de l'approximation dipolaire électrique [86, 87], qui est adaptée à beaucoup de phénomènes d'optique non-linéaire. Nous avons donc commencé par explorer cette voie, en confrontant le calcul analytique du CD-SHG qui en résulte à plusieurs séries d'expériences. Les deux premières sections présentent nos résultats théoriques et expérimentaux. Cette confrontation expérimentale nous a alors obligés à remettre en question l'approximation utilisée : en effet, si la considération des seuls effets dipolaires électriques donne un lien direct entre le signal de CD-SHG et la polarité hors-plan des structures dans le volume focal, les résultats des expériences sur tissus biologiques ne vont pas dans ce sens. Cela signifierait que, pour les tissus biologiques considérés, il est nécessaire de prendre en compte les contributions dipolaires magnétiques et quadrupolaires électriques, négligées ou mal prises en compte dans la littérature récente.

Pourtant, des travaux pionniers sur le CD-SHG, débutés au milieu des années 90, mentionnaient déjà ces contributions [151], et des travaux effectués au LOB avaient même montré qu'elles pouvaient être du même ordre de grandeur que les contributions dipolaires électriques dans le collagène [75]. Le choix récent de l'approximation dipolaire électrique a sans doute été une première approche nécessaire pour tenter d'expliquer le signal complexe de CD-SHG dans les tissus biologiques, car elle a l'avantage de simplifier les calculs analytiques et de les maintenir dans le cadre standard des calculs d'optique non-linéaire, où les effets sont souvent dominés par les interactions dipolaires électriques. Malheureusement, nous montrons par cette étude qu'elle n'est pas suffisante pour rendre compte des phénomènes dans les tissus biologiques : leur activité optique non-linéaire doit alors s'expliquer par des contributions d'ordre supérieur (dipolaires magnétiques ou quadrupolaires électriques).

Nous proposons donc, dans la troisième section, une nouvelle approche théorique pour expliquer le CD-SHG. Plusieurs cas de figure aboutissant à différentes expressions analytiques du CD-SHG (toutes en accord avec nos observations expérimentales) sont présentés, sans qu'il soit pour l'instant possible de connaître le cas réel avec certitude. Une dernière section présente alors quelques démarches pour "reconstruire expérimentalement" l'expression analytique correcte du CD-SHG.

1 Approche théorique dans l'approximation dipolaire électrique (ADE)

Ici, les contributions dipolaires magnétiques ou quadrupolaires électriques ne sont pas prises en compte dans le calcul de la réponse SHG. On considère alors que le champ incident va uniquement induire une polarisation non-linéaire d'origine dipolaire électrique :

$$\vec{P}^{(2)}(2\omega) = \epsilon_0 \underline{\underline{\chi}}^{(2)} \vec{E}(\omega) \vec{E}(\omega). \quad (\text{V.1})$$

Cette approximation se justifie car les phénomènes d'optique non-linéaires sont souvent dominés par les interactions dipolaires électriques. De plus, elle a l'avantage de simplifier grandement les calculs analytiques.

L'expression analytique du CD-SHG dans cette approximation a été établie par Claire Teulon, ancienne doctorante du LOB [2], et est redonnée dans cette section, accompagnée de simulations numériques que nous chercherons ensuite à reproduire expérimentalement.

1.1 Calcul analytique du CD-SHG

Nous avons dérivé au chapitre II, section 1.2.2, l'expression dans le repère (XYZ) du laboratoire des polarisations non-linéaires induites par des excitations polarisées circulairement. Elles sont données par l'équation II.21 et s'expriment en fonction des composantes du tenseur $\chi^{(2)}$ des fibrilles de collagène dans le repère (xyz) des fibrilles ainsi que de leur angle hors-plan ψ (les repères et conventions angulaires utilisés sont donnés en figure II.1 du chapitre II, et rappelés dans ce chapitre en figure V.2) :

$$\begin{aligned} P_{X,L/R}^{(2)} &= \epsilon_0 \frac{E_0^2}{2} \cos \psi [(\chi_{xxx}^{(2)} - \chi_{xyy}^{(2)}) \cos^2 \psi + 2\chi_{yxy}^{(2)} \sin^2 \psi \mp 2i\chi_{yzx}^{(2)} \sin \psi], \\ P_{Y,L/R}^{(2)} &= \epsilon_0 \frac{E_0^2}{2} \cos \psi [2\chi_{yzx}^{(2)} \sin \psi \pm 2i\chi_{yxy}^{(2)}]. \end{aligned} \quad (\text{V.2})$$

En calculant ensuite $I^{2\omega} \propto |P_X^{(2)}|^2 + |P_Y^{(2)}|^2$, nous avons vu que si les composantes chirales $\chi_{yzx}^{(2)}$ sont nulles ou si elles ne présentent aucun déphasage avec les composantes achirales (en noir, vert et bleu) du tenseur $\chi^{(2)}$, les intensités $I_{L/R}^{2\omega}$ pour des polarisations incidentes circulaires gauche ou droite sont identiques. Ainsi, aucun signal de CD-SHG n'est détecté. En particulier, on ne peut pas expliquer un signal de CD-SHG si l'on reste dans le cadre des conditions de Kleinman, pour lesquelles $\chi_{yzx}^{(2)} = 0$. Cela peut se comprendre physiquement : la chiralité du collagène n'est prise en compte qu'en gardant l'information temporelle sur le champ incident, qui permet de discriminer une polarisation circulaire gauche d'une circulaire droite. La symétrie de Kleinman, supposant une réponse instantanée du milieu, n'est donc plus applicable ici, ce qui permet de lever l'égalité entre $\chi_{xyy}^{(2)}$ et $\chi_{yxy}^{(2)}$ et d'avoir des composantes chirales non nulles.

Pour autoriser l'existence d'un signal de CD-SHG dans l'approximation dipolaire électrique, imposons de plus un déphasage entre les composantes chirales et achirales. Pour simplifier, nous pouvons prendre comme référence de phase les composantes achirales en les considérant réelles et ajouter une partie imaginaire non nulle aux composantes chirales $\chi_{yzx}^{(2)} = \chi_{yzx}^{(2)'} + i\chi_{yzx}^{(2)''}$. Désormais, l'intensité de second harmonique dépend du sens de la polarisation circulaire incidente (gauche, L, ou droite, R) et s'écrit :

$$\begin{aligned} I_{L/R}^{2\omega} &= K \frac{(I^\omega)^2 \cos^2 \psi}{4} \left[\left((\chi_{xxx}^{(2)} - \chi_{xyy}^{(2)}) \cos^2 \psi + 2\chi_{yxy}^{(2)} \sin^2 \psi \pm 2\chi_{yzx}^{(2)''} \sin \psi \right)^2 \right. \\ &\quad \left. + 8(\chi_{yzx}^{(2)'} \sin \psi)^2 \right. \\ &\quad \left. + 4(\chi_{yzx}^{(2)''} \sin \psi \pm \chi_{yxy}^{(2)})^2 \right]. \end{aligned} \quad (\text{V.3})$$

avec K constante de proportionnalité prenant en compte ϵ_0 , les indices de réfraction, la célérité de la lumière et des facteurs géométriques.

En première approximation, l'intensité SHG moyenne est proportionnelle à $(I^\omega)^2 \cos^2 \psi$. Le signal de CD-SHG (différence circulaire normalisée par le signal de second harmonique moyen) est donc équivalent à :

$$\begin{aligned} \frac{1}{K} \frac{I_L^{2\omega} - I_R^{2\omega}}{(I^\omega)^2 \cos^2 \psi} &= 2 \left((\chi_{xxx}^{(2)} - \chi_{xyy}^{(2)}) \cos^2 \psi + 2\chi_{xyy}^{(2)} \sin^2 \psi \right) \chi_{yzx}^{(2)''} \sin \psi + 4\chi_{xyy}^{(2)} \chi_{yzx}^{(2)''} \sin \psi \\ &= \chi_{yzx}^{(2)''} \left(2 \sin \psi \cos^2 \psi (\chi_{xxx}^{(2)} - \chi_{xyy}^{(2)}) + 4 \sin \psi (1 + \sin^2 \psi) \chi_{xyy}^{(2)} \right), \end{aligned} \quad (\text{V.4})$$

ou encore

$$\begin{aligned} \frac{1}{K} \frac{I_L^{2\omega} - I_R^{2\omega}}{(I^\omega)^2 \cos^2 \psi} &= \chi_{yzx}^{(2)''} \sin \psi \left(2(\chi_{xxx}^{(2)} - \chi_{xyy}^{(2)} - 2\chi_{xyy}^{(2)}) \cos^2 \psi + 8\chi_{xyy}^{(2)} \right) \\ &= \chi_{yzx}^{(2)''} \sin \psi \mathcal{F}(\cos^2 \psi, \chi^{(2)}). \end{aligned} \quad (\text{V.5})$$

L'équation V.5 clarifie l'influence de l'angle ψ sur le signal de CD-SHG. Le collagène étant homochiral, le signe de $\chi_{yzx}^{(2)''}$ est fixe¹ (nous le prendrons négatif dans la suite). Ainsi, si la fonction $\mathcal{F}(\cos^2 \psi, \chi^{(2)})$ est de signe constant pour les valeurs de ψ qui nous intéressent, le CD-SHG mesuré est du signe de $-\text{sgn}(\mathcal{F}) \sin \psi$. Et en particulier, si les fibrilles dans le volume d'excitation sont alignées dans le plan d'imagerie, $\psi = 0$ et aucun signal de CD-SHG n'est mesuré. On rappelle que dans notre formalisme, l'angle ψ définit la polarité hors-plan et peut varier entre $-\frac{\pi}{2}$ et $\frac{\pi}{2}$: un angle négatif correspond à une structure qui "pointe vers le bas" c'est-à-dire dont la polarité hors-plan est du côté des Z positifs (direction de propagation du laser), alors qu'un angle positif correspond à une polarité "vers le haut" (du côté des Z négatifs) (se reporter à la figure V.2 (a) pour un rappel du repère considéré).

1.2 Simulations numériques dans l'ADE

Pour compléter l'expression analytique V.5 donnant la différence d'intensité $I_L^{2\omega} - I_R^{2\omega}$ simplement normalisée par $(I^\omega)^2 \cos^2 \psi$, nous effectuons des simulations numériques sous Matlab, reprenant les calculs depuis le début (équation II.18). Tracer le signal de CD-SHG complet (avec la normalisation exacte) en fonction de ψ nécessite de définir des valeurs pour les composantes tensorielles. Nous utilisons ici pour la composante chirale $\chi_{yzx}^{(2)}$ la seule valeur publiée dans la littérature, par H. Lee et al. en 2013 [86]. Dans cet article, ils ajustent leurs données expérimentales de CD-SHG par itérations afin de trouver une valeur complexe convenable pour $\chi_{yzx}^{(2)}$. Pour les autres composantes tensorielles, ils reprennent les valeurs mesurées expérimentalement par P.-J. Su et al. en 2011 [163]. C'est celles que nous utilisons également ici :

$$\begin{aligned} \alpha &= \frac{\chi_{xyy}^{(2)}}{\chi_{xxx}^{(2)}} = 0.63, \\ \beta &= \frac{\chi_{yxy}^{(2)}}{\chi_{xxx}^{(2)}} = 0.48, \\ \gamma &= \frac{\chi_{yzx}^{(2)}}{\chi_{xxx}^{(2)}} = -0.14 - 0.19i. \end{aligned} \quad (\text{V.6})$$

D'autres groupes ont aussi mesuré des valeurs pour les composantes tensorielles du collagène : les groupes de Rouède en 2007 [72], Barzda en 2011 [70] et plus récemment Simpson en 2016 [164]. Dans leur cas, les deux composantes $\chi_{xyy}^{(2)}$ et $\chi_{yxy}^{(2)}$ sont très proches et inférieures à $\chi_{xxx}^{(2)}$. Des mesures ont également été faites au LOB, en considérant l'égalité des composantes $\chi_{xyy}^{(2)} = \chi_{yxy}^{(2)}$, mais en introduisant du désordre à l'échelle du volume focal [79]. Elles ont abouti aux valeurs $\alpha = \beta = \frac{1}{1.36}$. Toutefois, ces travaux ne donnent des mesures que pour α et β , sans mentionner les composantes chirales du collagène. Dans le cas que nous reprenons de P.-J. Su et H. Lee, les composantes chirales

1. Deux énantiomères auraient des composantes $\chi_{yzx}^{(2)}$ de même module mais de signe opposé.

interviennent et une hiérarchie s'installe dans les composantes avec $\chi_{yxy}^{(2)} < \chi_{xyy}^{(2)}$, les deux restant dominées par $\chi_{xxx}^{(2)}$.

Nous traçons en figure V.1(a) la fonction \mathcal{F} qui intervient dans l'expression V.5, calculée avec ces valeurs tensorielles, en fixant $\chi_{xxx}^{(2)}$ à 1. On constate que cette fonction est toujours positive quelque soit ψ , ce qui signifie d'après l'équation V.5 que le CD-SHG mesuré est de signe opposé à ψ . On montre en figure V.1(b) une simulation du signal de CD-SHG en fonction de l'angle hors-plan avec le formalisme utilisé jusqu'à présent (ondes planes, approximation dipolaire électrique et valeurs tensorielles données par Eq. V.6), qui valident bien le rapport de signe entre le CD-SHG et ψ .

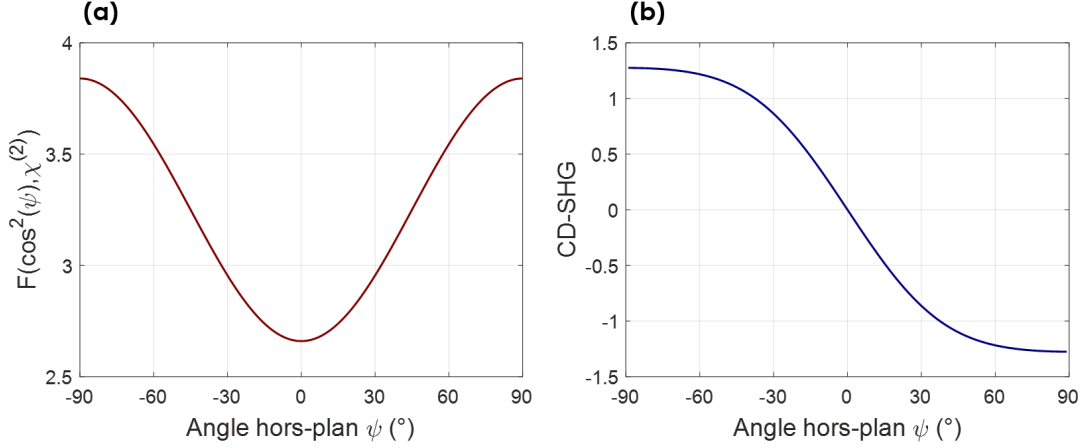


Figure V.1 – (a) Fonction \mathcal{F} donnée par l'équation V.5 et (b) signal de CD-SHG, en fonction de l'angle hors-plan ψ des fibrilles de collagène dans le volume d'excitation, variant de $-\frac{\pi}{2}$ à $\frac{\pi}{2}$. Simulation issue d'un calcul analytique en ondes planes, dans l'approximation dipolaire électrique.

1.3 Implications expérimentales

L'approche dipolaire électrique conduit à un résultat très net pour le CD-SHG : le signal de CD-SHG détecté sur du collagène fibrillaire et l'angle hors-plan ψ des fibrilles sont liés par une relation bijective, permettant la connaissance fine de l'organisation 3D des fibrilles dès lors que l'on mesure le CD-SHG (gardons en mémoire que l'angle φ des structures *dans le plan de l'image* n'a aucune influence sur le CD-SHG).

Plus précisément, le signe du CD-SHG mesuré dépend du signe de $\sin(\psi)$, et donc du signe de ψ : comme $\chi_{yzy}^{(2)}$ est négative et que la fonction $\mathcal{F}(\cos^2\psi, \chi^{(2)})$ est toujours positive quelque soit ψ pour les valeurs du tenseur $\chi^{(2)}$ choisies selon [86], nous nous attendons à mesurer :

- Une valeur de CD-SHG positive quand $\sin \psi$ est négatif, soit $\psi \in [-90^\circ, 0]$: les fibrilles pointent vers le bas.
- Une valeur de CD-SHG négative quand $\sin \psi$ est positif, soit $\psi \in [0, 90^\circ]$: les fibrilles pointent vers le haut.

Pour valider expérimentalement cette relation, nous pouvons étudier l'évolution du signal de CD-SHG pour différentes positions de l'échantillon, donnant différentes polarités hors-plan², et en particulier des signes opposés de l'angle ψ .

2 Mesures expérimentales de CD-SHG

Une expérience de validation possible consiste à comparer le signal de CD-SHG obtenu sur un échantillon avec le signal obtenu sur la même zone après rotation de l'échantillon de 180° autour d'un

2. Ou avoir la chance de trouver des échantillons d'angles hors-plan absolus connus

axe contenu dans le plan (XY) d'imagerie (c'est-à-dire le plan pour lequel $\psi = 0$, voir le schéma V.2). Une telle expérience compare donc la configuration *up* d'un échantillon avec sa configuration *down* où toutes les polarités hors-plan ψ sont renversées (on passe de ψ à $-\psi$) : on la qualifiera d'expérience *Up-Down* dans la suite du manuscrit. D'après l'expression analytique du CD-SHG, on s'attend à obtenir deux signaux *up* et *down* opposés, proportionnels à $\sin \pm\psi$ respectivement.

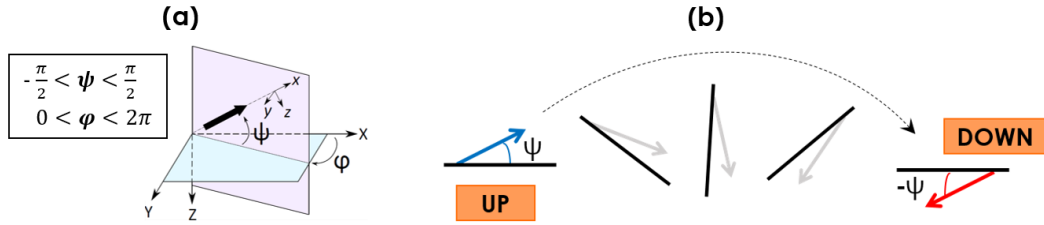


Figure V.2 – Illustration de la rotation dans l'expérience *Up-Down* : une même zone est imagée dans deux configurations différentes qui présentent des polarités hors-plan $\pm\psi$ opposées.

Une première validation expérimentale de l'expression du CD-SHG a été effectuée par Claire Teulon dans sa thèse en 2016 sur un cristal présentant le même tenseur $\chi^{(2)}$ que le collagène. Ses résultats ont été reproduits avec le même cristal après correction des artéfacts décrits au chapitre précédent. Ils sont l'objet de la partie 2.1.

Dans un deuxième temps, nous présentons dans la partie 2.2 les essais de validation sur tissus biologiques. Nous vérifions tout d'abord que l'angle φ dans le plan de l'image ne joue effectivement aucun rôle sur le signal détecté. Des expériences *Up-Down* sur plusieurs types de tissus biologiques ont ensuite été conduites, et ont abouti à d'importantes conséquences.

2.1 Validation sur cristal

Les expériences menées sur cristal pour valider l'approche dipolaire électrique sont du type *Up-Down*. Le cristal considéré est de l'iodate de lithium ($LiIO_3$), choisi grâce à sa structure hexagonale de symétrie C_6 , lui conférant le même tenseur $\chi^{(2)}$ que le collagène. Il est coupé de façon à ce que son axe principal de symétrie (équivalent à l'axe x des fibrilles de collagène) soit incliné d'un angle $\theta = 41^\circ$ par rapport à l'axe Z de propagation du laser (voir schéma V.3). Cela correspond à un angle hors-plan $\psi = \pm 49^\circ$, supposé donner un signal de CD-SHG non nul, dont le signe dépend de la géométrie de mesure.

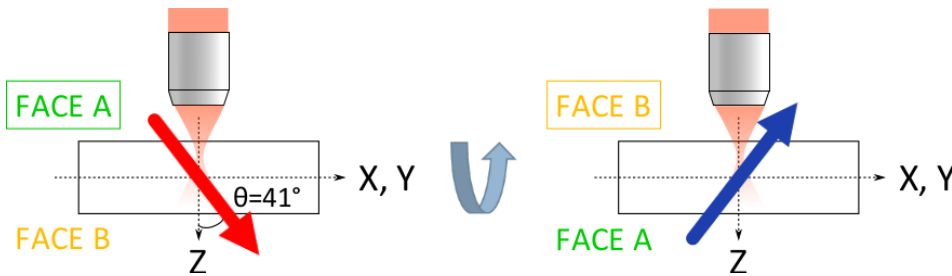


Figure V.3 – Expérience *Up-Down* sur cristal de $LiIO_3$. L'axe principal, incliné par rapport à l'axe Z, est figuré en bleu ou en rouge selon le signe du signal de CD-SHG attendu.

Notons qu'ici, la zone imagée en géométrie *down* ne peut pas être la même que celle en géométrie *up*, l'épaisseur importante du cristal (0.5 mm) empêchant d'imager la même zone dans les deux configurations. De plus, le cristal est très biréfringent ($\Delta n = -0.06$ à 860 nm, ce qui correspond à une modification de la polarisation sur quelques microns) rendant pertinentes les seules mesures effectuées à la surface du cristal. Pour repérer la surface du cristal, le travail précédent proposait d'utiliser le pied de la courbe d'intensité SHG moyenne en fonction de la profondeur (car l'intensité SHG devient

subitement très importante à l'intérieur du cristal). Elle peut aussi se repérer par les images en intensité SHG, sur lesquelles les impuretés de surface sont visibles à une profondeur précise (les deux méthodes sont en accord).

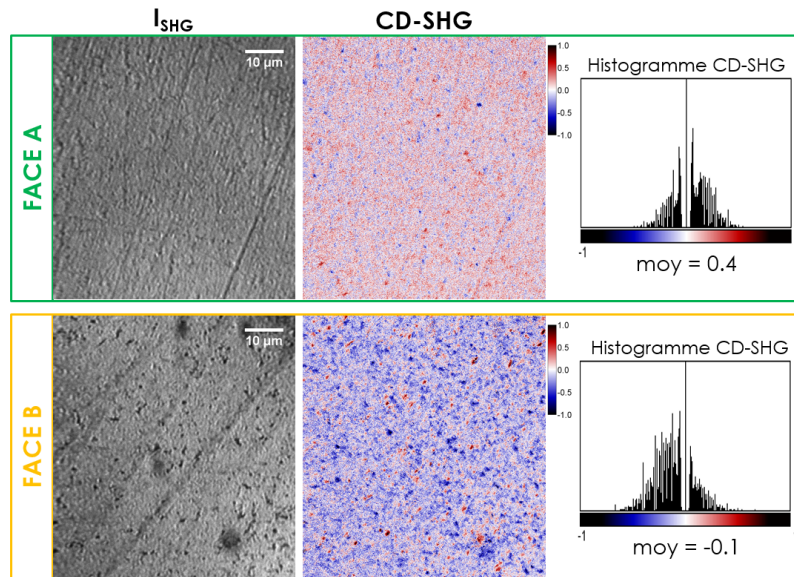


Figure V.4 – Mesures de CD-SHG pour les faces A (en haut) et B (en bas) du $LiIO_3$. L’histogramme des valeurs de CD-SHG au sein de l’image est donné à droite. Les images en intensité SHG (à gauche) permettent de définir la surface du cristal où la mesure est pertinente.

Pour ces mesures sur cristal, nous accumulons 5 images avec une taille pixel de 105 nm et un temps par pixel de 5 μ s. En accord avec les travaux précédents, nous mesurons des valeurs de CD-SHG très faibles à la surface du cristal, mais qui présentent tout de même une inversion entre les deux configurations, comme nous le voyons sur la figure V.4 : signal moyen de -0.1 sur la face A du cristal et de 0.4 sur la face B. Cela permet de valider, pour ce cristal, l’expression analytique du CD-SHG obtenue dans le cadre de l’approximation dipolaire électrique : la mesure du CD-SHG donne la polarité des structures hors du plan de l’image, c’est-à-dire le signe de l’angle ψ dans le volume d’excitation. La faible amplitude des signaux de CD-SHG peut également être expliquée dans ce cadre par une petite valeur de $\Im[\chi_{xyz}^{(2)}]$. En effet, le $LiIO_3$ ne présente presque pas d’absorption, conduisant à des composantes tensorielles potentiellement toutes réelles [165].

2.2 Mesures sur tissus biologiques

Les mesures de CD-SHG sur cristal soutiennent l’approximation dipolaire électrique, mais ne permettent pas de la valider directement pour tout type de structure possédant le même tenseur $\chi^{(2)}$. Il est donc également nécessaire de confronter cette approche théorique à des mesures sur tissus biologiques. Un constat général pour tous les échantillons biologiques est que l’orientation hors-plan ψ n’est pas homogène sur l’ensemble de l’image, contrairement au cristal pour lequel ψ est fixe sur toute la surface. Ainsi, d’un volume sondé à l’autre (ou pour simplifier, d’un pixel à l’autre), le signal peut varier et même changer de signe. Il ne s’agit donc pas ici de comparer le signe de la moyenne des valeurs de CD-SHG entre les deux géométries comme précédemment, mais de comparer pixel à pixel la valeur de CD-SHG pour constater (ou pas) une inversion de signe. Il faut donc être capable de retrouver exactement la même zone des deux côtés de l’échantillon, c’est pourquoi nous utilisons des échantillons très fins. Cela a également l’avantage de ne pas induire de déformation de l’état des polarisations circulaires.

2.2.1 Échantillons étudiés

Les mesures ont été effectuées sur quatre types de tissus différents, chacun avec une structuration macroscopique différente du collagène. Afin de rendre possible l'imagerie de la même zone dans les deux géométries lors des expériences *Up-Down*, les échantillons ont tous été choisis fins (au maximum une dizaine de microns d'épaisseur) et déposés entre deux lamelles de microscopie de 170 μm d'épaisseur (lamelles #1.5). Les deux lamelles ont ensuite été scellées soit par du vernis, soit par des bandes adhésives, et placées sur le système de porte-échantillon adapté pour stabiliser le système, visible en figure IV.5.

Collagène purifié fibrillé

Tirant parti d'un protocole de fibrillogenèse *in vitro* fournis par nos collaborateurs du LCMCP [166], nous avons étudié des fibrilles issues de collagène purifié. Une solution de collagène stérile à environ 3 mg/ml en acide acétique 0.017 N, extrait de peaux de veau (Symatase, France) a été utilisée et placée sous vapeur d'ammoniac pour augmenter le pH jusqu'à 7-7.5 où la fibrillogenèse a lieu. Quelques microlitres de solution contenant les fibrilles ont ensuite été déposés entre les deux lamelles.

Tendon de queue de rat

Nous avons extrait des tendons à partir de deux queues de rat, conservées au congélateur à -20°C . Les fibres de collagène issues des tendons ont été rincées puis conservées à 4°C dans du PBS, et étudiées dans les jours qui suivent. Pour l'imagerie, les fibres les plus fines ont été choisies et coupées pour atteindre une longueur de 1 cm maximum, puis ont été aplaties lors du dépôt sur la lamelle de microscopie. Certaines ont également été légèrement grattées pour que des fibres isolées puissent se détacher en périphérie des plus grosses fibres de tendon. Ce protocole permet une faible épaisseur de l'échantillon, rendant possible l'imagerie *Up-Down*, mais contraint également les fibrilles à rester dans le plan de l'image et n'offre que peu de structures hors-plan.

Coupes transverses de cornée humaine

Plusieurs coupes transverses de cornées humaines, préparées suivant différents protocoles pour que nos résultats ne soient pas biaisés par la méthode de préparation, ont été étudiées.

Nous avons notamment eu accès à une cornée de la Banque Française des Yeux, fixée dans du glutaraldéhyde à 2.5 % dans un tampon de cacodylate 0.1 M (pH 7.4), re-fixée dans du tétraoxyde d'osmium à 1 % dans un tampon de cacodylate 0.2 M (pH 7.4), puis incluse dans une résine époxy avant d'être coupée en sections transverses de 2 μm à l'ultra-microtome. Nous l'appellerons cornée *BFY* dans la suite du manuscrit.

D'autres cornées issues de l'Établissement Français du Sang ont subi un protocole de cryomicrotomie : fixation dans du PFA à 4 %, immersion dans une solution de saccharose à 30 %, enrobage dans du Tissue-Text O.C.T. puis refroidissement à -20°C . Elles ont ensuite été coupées en sections transverses semi-minces de 3 μm d'épaisseur par un cryomicrotome. Nous en avons étudiées 2 indépendantes, qui seront mentionnées dans la suite en tant que cornées *EFS*.

Enfin, nous avons également étudié en CD-SHG des coupes transverses similaires à celles caractérisées par P-SHG au chapitre III, section 2.2.2, obtenues auprès de l'Université de Münster. Il s'agit de coupes de 3 cornées indépendantes, fixées puis incluses en résine époxy avant d'être coupées à l'ultramicrotome en sections de 2 μm , que nous appellerons cornées *UWE*.

Membranes de collagène fibrillaire

Des membranes de collagène fibrillaire ont été préparées par Carole Aimé au LCMCP, Paris, à partir de collagène de type I, extrait et purifié de tendons de queue de rat, comme décrit dans [167]. La pureté du collagène a été évaluée par électrophorèse et sa concentration estimée par titrage de l'hydroxyproline [168]. Ensuite, 1.2 mL de solution de collagène à une concentration de 1.7 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ dans 30 mM HCl et 75 % vol. d'éthanol, ou alternativement dans 30 mM HCl seulement, a été versé dans un moule en silicone. Les membranes de collagène coulées ont été obtenues après évaporation du solvant pendant la

nuit sous les conditions ambiantes. L'organisation des fibrilles au sein des membranes a été visualisée par SEM et TEM et correspond à un agencement aléatoire des fibrilles dans toutes les directions du plan XY.

2.2.2 Expériences *Up-Down* : influence de ψ

Des expériences préliminaires ont été conduites pour assurer l'indépendance des mesures de CD-SHG vis-à-vis de l'angle φ , c'est-à-dire vis-à-vis des rotations de l'échantillon dans le plan XY. Deux rotations XY de 180° et 90° sur cornées ainsi que des rotations XY d'angles 45° , 90° et 180° sur tendon ont été effectuées et ont démontré que le signal de CD-SHG reste identique pour tout angle φ (on peut se reporter à la figure 1 de l'article inclus en section 2.2 du chapitre IV, et à la figure V.2 (a) pour un rappel des angles considérés). Nous nous concentrons désormais sur l'influence de l'angle hors-plan ψ en présentant les résultats des expériences *Up-Down* pour chaque type de tissu. Une des grandes difficultés de ces expériences est de retrouver la même profondeur d'imagerie (même Z) dans les deux géométries de mesure. Pour cela, nous faisons l'acquisition en géométrie *down* d'une pile d'images à différentes profondeurs et utilisons les images des intensités SHG moyennes $I_{moy}^{2\omega} = \frac{I_L^{2\omega} + I_R^{2\omega}}{2}$ pour trouver la profondeur correcte (celle pour laquelle l'image $I_{moy}^{2\omega}$ de la pile d'images *down* a la meilleure corrélation avec l'image $I_{moy}^{2\omega}$ en *up*).

Notons que dans la suite, le CD-SHG est indiqué soit directement par sa valeur (par exemple 0.1), soit par sa valeur en % (par exemple 10 %) appelée contraste.

Collagène fibrillé

Sur les quatre expériences réalisées sur collagène fibrillé, seul un couple de mesures a été exploitable pour la comparaison *Up-Down*. Cet échantillon présente en effet un signal de CD-SHG trop peu contrasté pour être comparé de manière fiable dans différentes configurations. Les mesures exploitables sont présentées sur la figure V.5. Nous observons une valeur absolue moyenne du CD-SHG autour de 0.1 pour les deux géométries (contraste moyen de 10 %), avec des signes constants entre la configuration *up* et la configuration *down* (un pixel bleu reste bleu et un rouge reste rouge). Cela tend à invalider l'ADE, mais nécessite des expériences supplémentaires plus fiables sur des tissus présentant un contraste CD-SHG important.

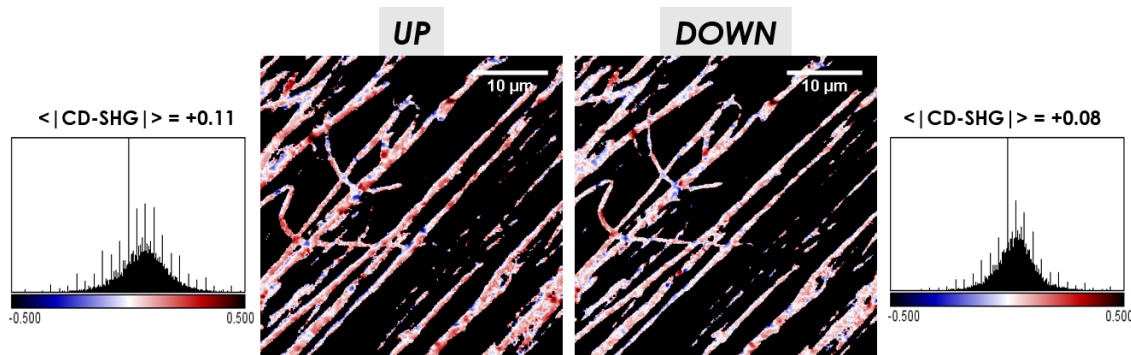


Figure V.5 – Images CD-SHG de collagène fibrillé, dans la configuration expérimentale *Up-Down*, et histogrammes de répartition des valeurs de CD-SHG dans chacune des configurations.

Tendon de queue de rat

Les mesures de CD-SHG sur tendon donnant un meilleur contraste moyen (entre 20 et 30%), nous avons pu exploiter une douzaine de mesures *Up-Down*. Toutefois, les résultats sont très variables d'un tendon à l'autre, rendant difficile la compréhension de l'influence de ψ sur ce type de tissu. Ainsi, pour certains échantillons, nous n'observons aucune inversion de signe dans les valeurs de CD-SHG, confortant les expériences réalisées sur collagène fibrillé (Fig. V.6 (a)). Mais pour d'autres

échantillons, nous pouvons observer à certains endroits des inversions claires de signe (Fig. V.6 (b)). Malheureusement, les inversions ne sont pas majoritaires sur l'ensemble de l'image et ne se produisent

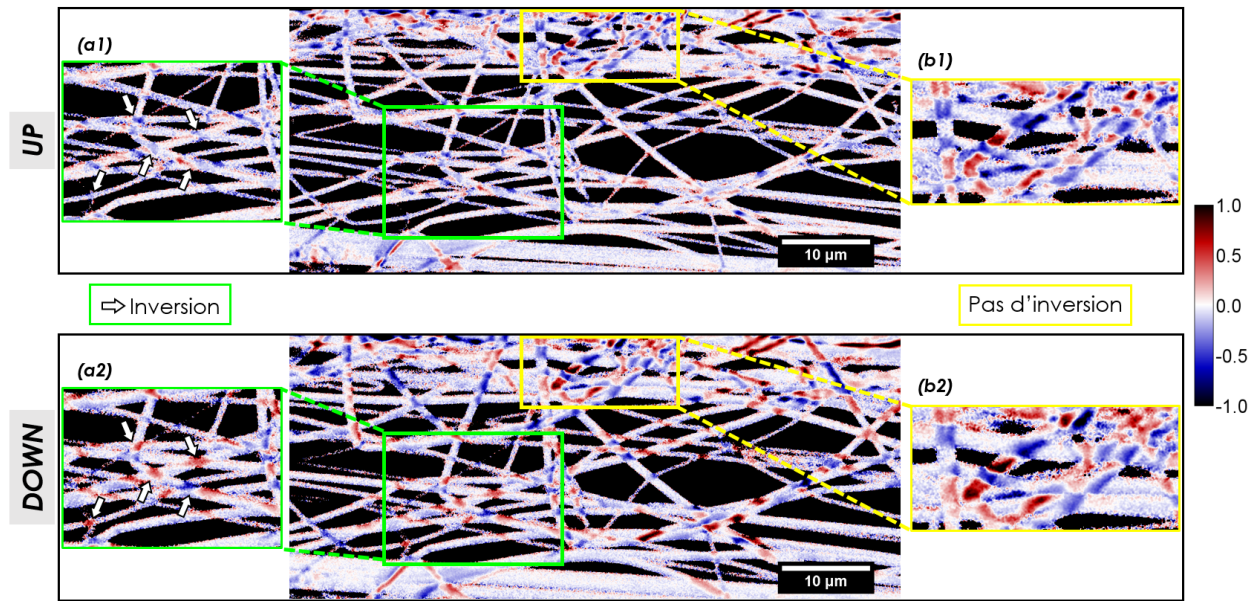


Figure V.6 – Images CD-SHG sur des fibres de collagène issues de tendon de queue de rat, dans la configuration expérimentale *Up-Down*.

qu'aux intersections entre plusieurs fibres. Or, à ces endroits, le volume sondé contient des fibrilles aux orientations très variées, et nous nous éloignons beaucoup de l'hypothèse d'un milieu homogène de fibrilles alignées les unes avec les autres (hypothèse utilisée pour pouvoir décrire le tenseur $\chi^{(2)}$ du collagène). De plus, ce sont des régions connues pour produire des artefacts de mesure en P-SHG [89], comme on peut le voir sur la figure V.7, où les orientations dans le plan calculées aux intersections sont en fait les moyennes des orientations des différentes fibres qui intersectent.

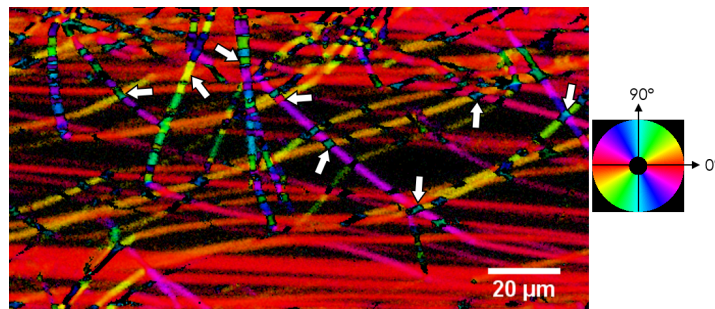


Figure V.7 – Carte d'orientation φ dans le plan obtenue par P-SHG sur tendon de queue de rat.

Ainsi, il est difficile de valider l'ADE avec seulement des inversions de signe dans ces régions où les signaux mesurés en SHG semblent être influencés par des effets de "géométrie macroscopique". Il faut alors se restreindre à l'étude des fibres de tendon qui n'intersectent pas. Mais si le contraste moyen de CD-SHG est bon sur l'ensemble de l'image, le contraste sur les fibres isolées tombe en dessous de 10 %. Cela est dû à notre méthode de préparation de l'échantillon, qui pour être fin est contraint d'être complètement dans le plan, donnant alors un très faible signal de CD-SHG. Cela confirme tout de même que le signal de CD-SHG est bien quasi nul pour $\psi=0$. Nous voyons là qu'un échantillon à la fois fin et présentant des structures hors-plan est indispensable.

Coupes transverses de cornées humaines

Le stroma des cornées humaines est organisé en lamelles de collagène de directions orthogonales les unes

par rapport aux autres, et toutes parallèles à la surface de la cornée. Ainsi, les coupes transverses de ce tissu sont des échantillons idéaux pour avoir accès à des structures hors-plan. Nous avons effectivement obtenu des signaux de CD-SHG de bonne qualité avec un contraste moyen de 30 %, et 18 mesures *Up-Down* exploitables sur l'ensemble des cornées étudiées : 1 mesure sur la cornée *BFY*, 4 mesures sur les cornées *EFS* (dont 3 sur la même cornée), et 13 mesures sur les cornées *UWE* (5 sur la première et 4 pour chacune des deux autres). Pour tous ces échantillons, les résultats sont concordants : aucune inversion de signe n'est repérable dans le signal de CD-SHG (Fig. V.8). De manière plus surprenante, il ne semble même n'y avoir aucune différence de signal entre les deux configurations, au-delà de simples considérations de signe. Cela interrogerait donc sur la véritable influence que l'angle hors-plan ψ joue sur le signal de CD-SHG, et démontre en tout cas une symétrie de la réponse CD-SHG dans la cornée pour toute rotation de 180° autour d'un axe contenu dans le plan XY d'imagerie.

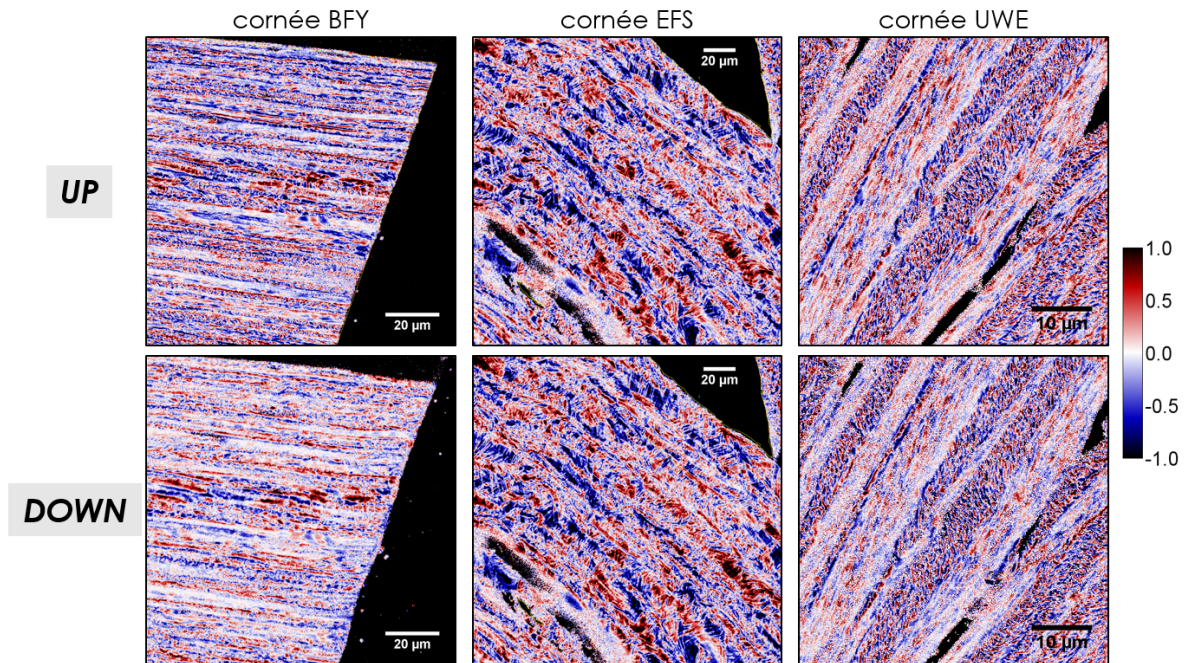


Figure V.8 – Images CD-SHG de coupes transverses de cornées humaines, dans la configuration expérimentale *Up-Down*.

Mais avant de pouvoir exclure l'ADE pour ce type de tissus, la question de la validité des signaux CD-SHG sur coupes transverses de cornées se pose. En effet, si le tendon peut présenter des signaux artéfactuels sur les intersections de fibres, la structure en lamelles fines de la cornée n'entraînerait-elle pas également des effets de géométrie macroscopique avec des conséquences sur le signal de CD-SHG ? Les coupes transverses présentent une alternance de lamelles d'orientations différentes d'environ $2\ \mu\text{m}$ d'épaisseur, c'est-à-dire une alternance d'interfaces verticales entre des tenseurs $\chi^{(2)}$ différents. Des simulations numériques sont en cours pour comprendre les effets que de telles géométries peuvent induire sur le signal de CD-SHG. Toutefois, si des effets artéfactuels pouvaient apparaître aux interfaces, les pixels au sein des lamelles, qui constituent la majorité du tissu, ne devraient pas en être affectés. Pour lever le doute expérimentalement, nous avons également décidé de répéter les tests *Up-Down* sur un nouvel échantillon : des membranes de collagène fibrillaire dans lesquelles les fibrilles prennent une organisation *a priori* aléatoire, formant ainsi un échantillon plus homogène où l'on s'affranchit en moyenne de ces effets d'interfaces entre des tenseurs $\chi^{(2)}$ différents.

Membranes de collagène fibrillaire

Les expériences *Up-Down* sur membranes ont finalement confirmé les précédents résultats sur tissus biologiques, avec une dizaine de mesures exploitables (Fig. V.9). Les membranes obtenues après préparation dans l'acide chlorhydrique ont donné des résultats de CD-SHG plus homogènes sur l'ensemble

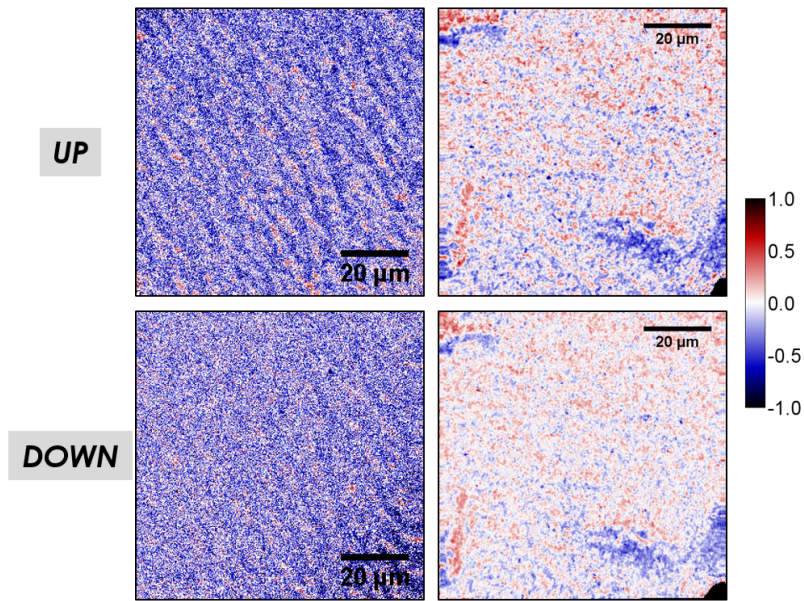


Figure V.9 – Images CD-SHG de membranes de collagène fibrillaire, dans la configuration expérimentale *Up-Down*. À gauche, une membrane obtenue après préparation dans HCl seulement. À droite, le solvant utilisé contient 75 % d'éthanol en plus de l'acide chlorhydrique.

de l'image que celles obtenues avec un solvant contenant de l'éthanol. Mais pour les deux types de membranes, aucune inversion de signe n'est constatée entre les configurations *up* et *down*.

Et sur un autre système expérimental ?

Une dernière confirmation de la non-inversion de signe du CD-SHG dans les tissus biologiques a été obtenue auprès de Maxime Pinsard, doctorant à l'INRS Varennes (Montréal, Canada). Nous lui avons demandé d'étudier du fascia³ de cheval avec le système expérimental de l'INRS, et il en a extrait le signal de CD-SHG pour les deux géométries *up* et *down*. Ses résultats sont présentés en figure V.10.

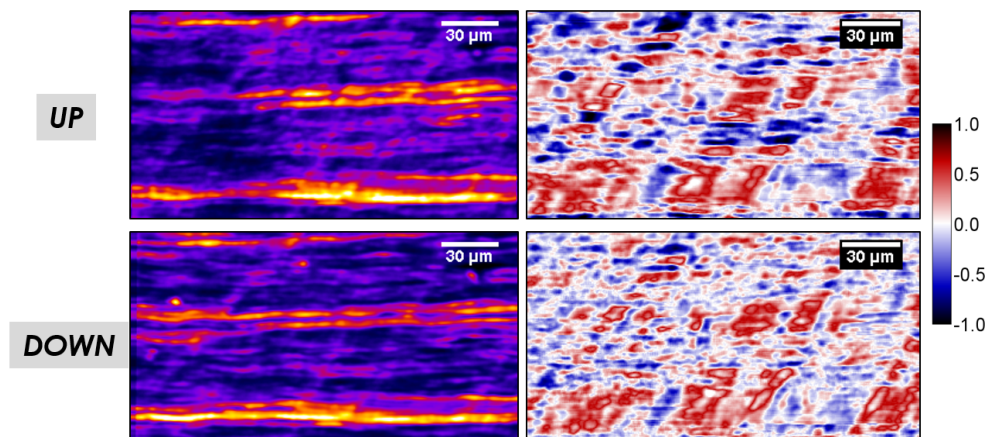


Figure V.10 – Images en intensité SHG (à gauche) et CD-SHG (à droite) de fascia de cheval, dans la configuration expérimentale *Up-Down*. Source : Maxime Pinsard (INRS Varennes, Montréal, Canada).

On constate sur les images en intensité SHG que les structures imagées en *up* et en *down* ne sont pas excitées de manière complètement identique, ce qui peut s'expliquer par un échantillon un peu incliné et par deux profondeurs d'imagerie légèrement différentes. Toutefois, les structures focalisées dans les

3. Tissu conjonctif riche en collagène formant entre autre l'enveloppe des muscles

deux configurations expérimentales présentent bien le même signal de CD-SHG, sans changement de signe.

2.3 Discussions

Les résultats présentés en détail dans la section précédente sont résumés dans le tableau V.11. Hormis le tendon qui présente une réponse ambiguë, la comparaison des mesures de CD-SHG *up* et *down* sur les quatre autres échantillons est sans ambivalence : la valeur du CD-SHG ne change pas de signe lorsque l'on inverse la géométrie de mesure, et que l'on passe d'une organisation de fibrilles suivant un angle hors-plan ψ à une organisation suivant un angle $-\psi$. On rappelle, que, même si le retournement de l'échantillon de *up* vers *down* change également l'angle φ dans le plan d'imagerie des fibrilles, ce dernier n'a aucune influence sur le signal de CD-SHG (nous l'avons de plus vérifié et validé expérimentalement).

Type d'échantillon	Nombre de mesures Up-Down	Inversions de signe des valeurs de CD-SHG
Collagène fibrillé	1	0
Tendon de queue de rat	12	20 à 40 % des intersections
Cornées BFY	1	0
Cornées EFS	4	0
Cornées UWE	13	0
Membranes de collagène	10	0
Fascia de cheval	1	0

Figure V.11 – Résumé des expériences *Up-Down* sur tissus biologiques.

Ce résultat a été très surprenant et même difficile à accepter dans les premiers temps, car il invalide l'approximation dipolaire électrique grâce à laquelle nous avons réussi à dériver l'expression analytique du CD-SHG, indiquant que ce dernier devait être du signe de $-\sin(\psi)$ et devait donc changer de signe avec une inversion de l'angle hors-plan ψ . C'est pourquoi nous avons multiplié le nombre d'échantillons, pour nous affranchir de tout biais et pouvoir faire entièrement confiance à nos résultats expérimentaux, et nous avons également vérifié ces résultats sur un deuxième système expérimental, indépendant du nôtre.

Constater expérimentalement la faiblesse de l'ADE est d'autant plus inattendu que c'est l'approximation utilisée par tous les articles qui présentent des résultats quantitatifs sur le CD-SHG à ce jour. Toutefois, on remarque également dans la littérature l'absence de validation expérimentale de cette approximation, en particulier aucune publication de résultats *Up-Down* fiables sur tissus biologiques. En effet, les premières expériences *Up-Down* en CD-SHG rapportées dans la littérature remontent à 1994, dans un article du groupe de J. M. Hicks [152]. Elles mettent en évidence l'inversion de signal de CD-SHG (il s'agit alors de SHG en réflexion) sur des mono-couches de molécules chirales, présentant un signal de CD-SHG positif en géométrie *up* et négatif en géométrie *down*. À notre connaissance, il s'agit en fait des seules expériences *Up-Down* jamais rapportées dans la littérature. Seul le groupe de P. J. Campagnola mentionne à son tour une telle expérience en 2017 sur une fibre de tendon clarifiée optiquement⁴, mais ne montre pas les données obtenues ("*data not shown*") [161].

Ainsi, nous avons été confronté à une remise en cause complète de la théorie communément admise, impliquant de sortir de l'approximation dipolaire électrique et de prendre en compte d'autres contributions au signal de CD-SHG, auparavant négligées. Cette nouvelle approche théorique fait l'objet des sections suivantes du chapitre.

4. C'est en fait assez ambigu : ils ne disent pas clairement s'il s'agit d'une rotation *Up-Down* de l'échantillon ou d'une rotation dans le plan XY.

3 Nouvelle approche théorique pour le CD-SHG

Dans l'approximation dipolaire électrique, on considère que seules les contributions dipolaires électriques sont à l'origine d'un signal de CD-SHG. Ainsi, seul le tenseur de susceptibilité non-linéaire dipolaire électrique χ^{eee} ⁵ intervient. Dans ce cas, nous avons vu qu'il est nécessaire que les composantes achirales et chirales de ce tenseur soient déphasées pour obtenir un signal de CD-SHG. Plus particulièrement, si l'on se fie à la valeur complexe de la composante chirale donnée par Lee et al. dans le formalisme de l'ADE [86], le déphasage nécessaire correspond à l'argument de $\chi_{yzz}^{eee} = -0.14 - 0.19i$, soit à environ $-\frac{7\pi}{10} = -126^\circ$. Avant même les résultats des expériences *Up-Down*, cet important déphasage était en fait très étonnant : comme nous travaillons assez loin des résonances, les composantes du tenseur dipolaire électrique doivent être toutes en phase ou de phases très proches (en pratique : toutes réelles).

On ne trouve pas d'explication satisfaisante dans la littérature quant à ce grand déphasage. En effet, H. Lee, et plus tard G.-Y. Zhuo [87] qui a repris les mêmes valeurs tensorielles, ne discutent pas du tout ce point. Fin 2018, dans son manuscrit de thèse, un doctorant du groupe de V. Barzda à Toronto donne également une expression analytique du CD-SHG sous l'ADE, et mentionne la nécessité d'un tel déphasage, *a priori* inexistant hors-résonance [169]. Pour lui, la partie imaginaire non nulle de χ_{yzz}^{eee} serait alors liée à la prise en compte des contributions magnétiques. C'est ici une mauvaise prise en compte de ces contributions : si elles sont effectivement complexes car caractérisées par des moments dipolaires magnétiques⁶ [170], on ne peut pas les ajouter brutalement au tenseur χ^{eee} . Elles doivent être calculées en faisant intervenir de nouveaux tenseurs de susceptibilités non-linéaires : χ^{em} et χ^{mee} . Ce sont les composantes chirales de ces tenseurs, et du tenseur χ^{eee} , qui contribuent ensuite au signal de CD-SHG. Nous développons ces calculs analytiques ici, après un bref exposé des différents travaux qui ont déjà discuté les origines, électriques et magnétiques, du signal de CD-SHG.

3.1 Origine microscopique du CD-SHG dans le collagène

3.1.1 Contexte bibliographique

Les deux groupes qui ont mené les travaux pionniers en CD-SHG à partir de 1993 mentionnaient aussi bien les contributions dipolaires électriques que dipolaires magnétiques et quadrupolaires électriques, mais chacun proposait une interprétation différente. Pour le groupe de J. Hicks, les contributions dipolaires magnétiques sont négligeables par rapport aux électriques, et le CD-SHG ne peut être mesuré que proche des résonances [152, 171]. Pour le groupe de A. Persoons en revanche, les contributions dipolaires magnétiques ne sont pas négligeables, surtout dans le cas de molécules chirales où elles sont mêmes les seules à devoir être considérées, hors ou proche des résonances [151, 154]. Il est à noter que les contributions quadrupolaires électriques, bien que mentionnées, ne sont jamais traitées analytiquement : en effet, elles sont en fait indiscernables expérimentalement du dipolaire magnétique, et on peut considérer que ces deux contributions forment un seul terme magnétique général, ce qui allège beaucoup les calculs. En 1998, en jouant sur la polarisation incidente et en analysant le signal SHG en polarisation, Schanne-Klein et al. ont mis en évidence sur une couche de molécules chirales spécifiques la cohabitation de contributions électriques et magnétiques **chirales** (c'est-à-dire les contributions au signal de CD-SHG) du même ordre de grandeur [155]. Procédant de manière similaire en 1999, Kauranen et al. du groupe de Persoons ont montré que les contributions dipolaires magnétiques étaient dominantes pour certaines polymères chiraux, alors que dans le cas d'hélicènebisquinone, les contributions dipolaires électriques chirales seules suffisaient [172]. En 2001, deux approches classiquement utilisées pour modéliser les mécanismes d'activité optique linéaires sont étendus au calcul du signal SHG par Hache et al. [156] : il s'agit des modèles de Kuhn et de Kauzmann, chacun lié à un arrangement moléculaire particulier, correspondant donc à deux types de chiralité différents. Ils sont illustrés par la figure V.12. Avec ces calculs, Hache et al. ont levé la controverse sur l'origine du signal

5. Ou plus exactement le tenseur $\chi^{(2),eee}$: dans les sections précédentes, nous l'avons simplement appelé $\chi^{(2)}$, mais par souci de clarté dans la suite du manuscrit, nous lui enlevons l'exposant ⁽²⁾ et le désignons désormais par χ^{eee} .

6. Un moment dipolaire magnétique est déphasé de $\frac{\pi}{2}$ par rapport à un moment dipolaire électrique

de CD-SHG : ce signal provient des composantes chirales des tenseurs électriques **et** magnétiques, dans des proportions qui dépendent de la structure moléculaire des échantillons considérés.

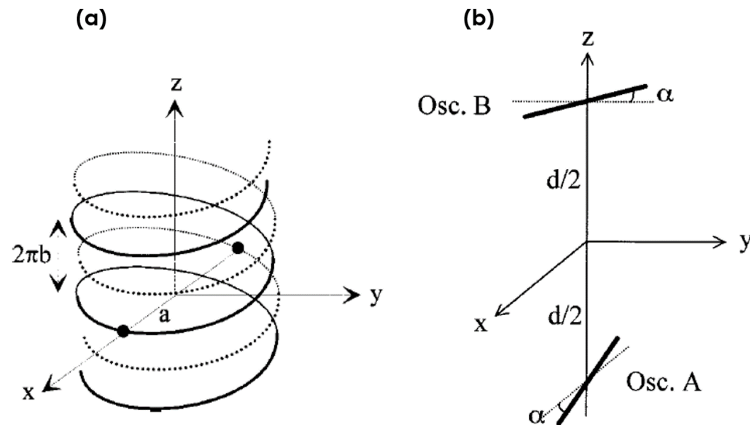


Figure V.12 – (a) Modèle de Kauzmann : modèle à un électron sur une hélice. (b) Modèle de Kuhn : modèle des oscillateurs couplés.

Regardons plus précisément les deux modèles classiques illustrant les origines physiques de l'activité optique, et en particulier du CD-SHG. On rappelle que le paramètre pertinent pour expliquer l'activité optique est la force rotatoire $R = \text{Im}(\vec{\mu} \cdot \vec{m})$ où $\vec{\mu}$ et \vec{m} sont les moments dipolaires de transition électrique et magnétique. La force R (et donc le signal de CD-SHG) est non nulle dans les deux cas présentés ci-dessous.

Modèle de Kauzmann La molécule possède une transition optique au caractère à la fois électrique et magnétique, avec des moments non orthogonaux : $\vec{\mu}$ et \vec{m} sont alors non nuls, ainsi que leur produit scalaire. C'est le cas par exemple des centres chiraux (comme le carbone asymétrique), qui *twistent* la trajectoire linéaire des électrons π délocalisés : leur trajectoire suit alors une hélice. Pour les calculs, Kauzmann utilise un artifice en considérant deux électrons diamétralement opposés oscillant sur deux hélices identiques de même axe, mais l'on parle tout de même du *modèle à un électron* (Fig. V.12 (a)).

Modèle de Kuhn La molécule comporte plusieurs chromophores achiraux agencés de manière chirale (non coplanaire et non colinéaires) et des interactions entre les différents groupes atomiques ont lieu : il y a couplage entre deux transitions $\vec{\mu}_1$ et $\vec{\mu}_2$ purement dipolaires électriques et séparées d'une distance \vec{r} , donnant lieu à une force rotatoire $R = \vec{\mu}_2 \cdot (\vec{r} \times \vec{\mu}_1)$ non nulle. Cela peut-être modélisé par deux oscillateurs non coplanaires en interaction : c'est le *modèle des oscillateurs couplés* (Fig. V.12 (b)).

Lorsqu'on les adapte à la réponse SHG (en introduisant une anharmonicité dans les oscillateurs considérés), le premier modèle donne une origine du signal CD-SHG principalement dipolaire magnétique, et des composantes chirales (magnétiques) déphasées par rapport aux achirales (électriques), tandis que l'autre illustre les cas où l'origine est dipolaire électrique, avec des composantes chirales et achirales en phase [156]. Ceci a été vérifié expérimentalement par Schanne-Klein et al. en 2001 et 2002 : ils ont mesuré par SHG de surface sur une molécule présentant un centre chiral (et donc décrite par le modèle de Kauzmann) un signal de CD-SHG provenant de contributions dipolaires magnétiques [173], tandis qu'un signal où les contributions dipolaires magnétiques pouvaient être négligées a été mesuré sur une molécule présentant une chiralité par couplage excitonique (modèle de Kuhn) [174]. En théorie, ces deux types de chiralité peuvent exister simultanément dans le cas général d'une molécule, modélisée non pas par un unique modèle mais par une combinaison des deux.

3.1.2 Et dans le collagène ?

Dans le cas du collagène, les harmonophores responsables du signal SHG sont les liaisons peptidiques formant les chaînes α [71]. Chaque liaison peptidique est chirale, composée d'un carbone asymétrique et suit ainsi le modèle de Kauzmann. De plus, la structure en hélice de la chaîne α entraîne l'agencement non coplanaire et non colinéaire des différentes liaisons peptidiques : le modèle de Kuhn est applicable dans ce cas⁷. On voit donc que les deux types de chiralité sont présents et qu'un mélange complexe des deux modèles entre en jeu pour décrire l'origine physique de l'activité optique du collagène. En pratique, des expériences de SHG de surface menées par Pena et al. en 2005 sur des fines couches de collagène I ont révélé des composantes chirales électriques et magnétiques du même ordre de grandeur [75].

3.2 Calcul analytique du CD-SHG avec les contributions dipolaires magnétiques

3.2.1 Démarche générale

La prise en compte des contributions dipolaires magnétiques implique de re-dériver l'intégralité du calcul analytique de l'intensité SHG (présenté en section 1.2 du chapitre II dans l'approximation dipolaire électrique). Il faut alors inclure les effets de champs non locaux, en introduisant deux tenseurs non locaux (magnétiques) χ^{eem} et χ^{mee} , en plus du tenseur local χ^{eee} . Nous gardons l'hypothèse d'ondes planes, avec un champ incident polarisé dans le plan (XY) dans le repère du laboratoire. Le champ rayonné à la fréquence double n'a plus la forme donnée par l'équation II.3 mais s'écrit désormais :

$$\vec{E}(2\omega) \propto (\hat{n} \times \vec{P}^{(2)}(2\omega)) \times \hat{n} - \hat{n} \times \vec{M}^{(2)}(2\omega), \quad (\text{V.7})$$

où \hat{n} est la direction d'observation, et $\vec{P}^{(2)}(2\omega)$ et $\vec{M}^{(2)}(2\omega)$ sont respectivement la polarisation et l'aimantation non-linéaires à 2ω , prenant la forme⁸ :

$$\begin{aligned} \vec{P}^{(2)}(2\omega) &= \epsilon_0 \underline{\underline{\chi}}^{eee} \vec{E}(\omega) \vec{E}(\omega) + 2\epsilon_0 \underline{\underline{\chi}}^{eem} \vec{E}(\omega) \vec{B}(\omega), \\ \vec{M}^{(2)}(2\omega) &= \epsilon_0 \underline{\underline{\chi}}^{mee} \vec{E}(\omega) \vec{E}(\omega). \end{aligned} \quad (\text{V.8})$$

Lorsque l'on calcule $\vec{E}(2\omega)$ dans le repère (XYZ) du laboratoire avec $\hat{n}=\hat{e}_Z$, l'équation V.7 devient :

$$\vec{E}(2\omega) \propto (P_X^{(2)} + M_Y^{(2)})\hat{e}_X + (P_Y^{(2)} - M_X^{(2)})\hat{e}_Y. \quad (\text{V.9})$$

Le champ SHG est encore polarisé dans le plan XY comme le champ incident. Il suffit donc de trouver l'expression de $P_X^{(2)}$, $P_Y^{(2)}$, $M_X^{(2)}$ et $M_Y^{(2)}$ dans le repère (XYZ) du laboratoire. Pour cela, nous suivons les mêmes étapes de calcul qu'au chapitre II, en considérant des polarisations incidentes circulaires gauche (L) ou droite (R) :

1. Expression des champs incidents $\vec{E}_{L/R}(\omega)$ et $\vec{B}_{L/R}(\omega)$ dans le repère (xyz) des fibrilles de collagène, à l'aide de la matrice de rotation $T(0, \psi)$ donnée dans l'encadré II.1 du chapitre II. ψ est l'angle hors-plan des fibrilles, et l'on prend $\varphi = 0$ pour simplifier les calculs, puisque le signal de CD-SHG est indépendant de l'angle dans le plan.
2. Calcul de la polarisation non-linéaire $\vec{P}_{L/R}^{(2)}$ et de l'aimantation non-linéaire $\vec{M}_{L/R}^{(2)}$ dans le repère (xyz) des fibrilles, suivant l'équation V.8.
3. Expression de la polarisation et de l'aimantation dans le repère (XYZ) du laboratoire, à l'aide de la matrice tT , puis calcul de $\vec{E}(2\omega)$ selon l'équation V.9.

7. Sympa le piège : une structure "macro" hélicoïdale a une chiralité du type de Kuhn et non une chiralité du type électron sur une hélice de Kauzmann !

8. Ce formalisme a initialement été introduit en CGS. Nous l'exprimons ici en SI, en utilisant le facteur ϵ_0 devant χ^{mee} et χ^{eem} pour avoir des formules similaires à celles du χ^{eee} . En pratique le facteur $\frac{1}{c}$ manquant devant $\vec{M}^{(2)}$ dans l'équation V.7 est alors inclus dans ces tenseurs.

3.2.2 Expression du CD-SHG

Nous détaillons a minima les différents calculs, faits à la main et vérifiés sous Mathematica.

1. Les champs $\vec{E}_{L/R}(\omega)$ et $\vec{B}_{L/R}(\omega)$ polarisés circulairement s'écrivent dans le repère (XYZ) du laboratoire :

$$\begin{aligned}\vec{E}_{L/R}(\omega) &= \frac{E_0}{\sqrt{2}} (\hat{e}_X \pm i\hat{e}_Y), \\ \vec{B}_{L/R}(\omega) &= \frac{n}{c} \hat{e}_Z \times \vec{E}_{L/R}(\omega) = \frac{n}{c} \frac{E_0}{\sqrt{2}} (\mp i\hat{e}_X + \hat{e}_Y),\end{aligned}\tag{V.10}$$

soit, dans le repère (xyz) des fibrilles :

$$\begin{aligned}\vec{E}_{L/R}(\omega) &= \frac{E_0}{\sqrt{2}} (\cos \psi \hat{e}_x \pm i\hat{e}_y + \sin \psi \hat{e}_z), \\ \vec{B}_{L/R}(\omega) &= \frac{n}{c} \frac{E_0}{\sqrt{2}} (\mp i \cos \psi \hat{e}_x + \hat{e}_y \mp i \sin \psi \hat{e}_z).\end{aligned}\tag{V.11}$$

2. On calcule ensuite $\vec{P}^{(2)}(2\omega)$ et $\vec{M}^{(2)}(2\omega)$ composantes par composantes (i, j et k désignent n'importe quels indices du repère (xyz)) :

$$\begin{aligned}P_i^{(2)}(2\omega) &= P_i^{ee}(2\omega) + P_i^{em}(2\omega) \\ &= \epsilon_0 \chi_{ijk}^{eee} E_j(\omega) E_k(\omega) + 2\epsilon_0 \chi_{ijk}^{eem} E_j(\omega) B_k(\omega), \\ M_i^{(2)}(2\omega) &= \epsilon_0 \chi_{ijk}^{mee} E_j(\omega) E_k(\omega).\end{aligned}\tag{V.12}$$

Cela nécessite de connaître les composantes tensorielles non nulles des différents tenseurs considérés. Ces tenseurs décrivent la réponse du même milieu qu'au chapitre II : un milieu homogène avec des fibrilles alignées les unes avec les autres selon l'axe x. Le tenseur χ^{eee} sera donc le même que dans les parties précédentes (c'est-à-dire simplifié par symétrie cylindrique et symétrie inhérente à la SHG). Le tenseur χ^{mee} est soumis aux mêmes symétries et présentera les mêmes composantes non nulles que χ^{eee} . Pour χ^{eem} , la symétrie cylindrique s'applique toujours mais on ne peut en revanche pas intervertir les deux derniers indices, puisqu'ils correspondent à $\vec{E}(\omega)$ et $\vec{B}(\omega)$ respectivement. De plus, comme nous l'avons vu, la symétrie de Kleinmann n'est pas applicable lorsque la chiralité du collagène est prise en compte : les χ_{ijk} sont non nuls et les χ_{ijj} sont différents des χ_{jij} (pour $i \neq j \neq k$). Nous obtenons donc 4 composantes indépendantes pour χ^{eee} et χ^{mee} , et 7 composantes indépendantes pour χ^{eem} . Elles sont toutes mentionnées dans le tableau V.1 : les composantes chirales sont en rouge, resp. violet, pour le tenseur local, resp. pour les tenseurs non locaux, et les composantes achirales en vert, resp. bleu⁹.

Nous pouvons maintenant dériver la polarisation et l'aimantation non-linéaires dans le repère (xyz). Par souci de clarté, nous utiliserons des notations simplifiées : c pour $\cos \psi$ et s pour $\sin \psi$.

$$\begin{aligned}P_{x,L/R}^{(2)} &= \frac{\epsilon_0 E_0^2}{2} \left[c^2 (\chi_{xxx}^{eee} - \chi_{xyy}^{eee}) \mp 2ic^2 (\chi_{xxx}^{eem} - \chi_{xyy}^{eem}) \right], \\ P_{y,L/R}^{(2)} &= \frac{\epsilon_0 E_0^2}{2} \left[\pm 2ic \chi_{xyy}^{eee} + 2cs \chi_{yzx}^{eee} + 2c (\chi_{xyy}^{eem} + \chi_{yyx}^{eem}) \mp 2ics (\chi_{yzx}^{eem} + \chi_{yxz}^{eem}) \right], \\ P_{z,L/R}^{(2)} &= \frac{\epsilon_0 E_0^2}{2} \left[2cs \chi_{xyy}^{eee} \mp 2ic \chi_{yzx}^{eee} \mp 2ics (\chi_{xyy}^{eem} + \chi_{yyx}^{eem}) - 2c (\chi_{yzx}^{eem} + \chi_{yxz}^{eem}) \right], \\ M_{x,L/R}^{(2)} &= \frac{\epsilon_0 E_0^2}{2} \left[c^2 (\chi_{xxx}^{mee} - \chi_{xyy}^{mee}) \right], \\ M_{y,L/R}^{(2)} &= \frac{\epsilon_0 E_0^2}{2} \left[\pm 2ic \chi_{xyy}^{mee} + 2cs \chi_{yzx}^{mee} \right], \\ M_{z,L/R}^{(2)} &= \frac{\epsilon_0 E_0^2}{2} \left[2cs \chi_{xyy}^{mee} \mp 2ic \chi_{yzx}^{mee} \right].\end{aligned}\tag{V.13}$$

9. Attention au changement de couleur par rapport à la section 1 : le rouge reste rouge mais le noir, bleu et vert fusionnent en vert uniquement !

	Réponse dip. électrique (tenseur local)	Réponse dip. magnétique (tenseurs non locaux)	
Achirale	$\begin{aligned} &\chi_{xxx}^{eee} \\ &\chi_{xyy}^{eee} = \chi_{xzz}^{eee} \\ &\chi_{yxy}^{eee} = \chi_{yyx}^{eee} = \chi_{zxx}^{eee} = \chi_{zzx}^{eee} \end{aligned}$	$\chi_{yzx}^{mee} = \chi_{yxz}^{mee} = -\chi_{zyx}^{mee} = -\chi_{zxy}^{mee}$	$\begin{aligned} \chi_{yzx}^{eem} &= -\chi_{zyx}^{eem} \\ \chi_{yxz}^{eem} &= -\chi_{zxy}^{eem} \\ \chi_{xyx}^{eem} &= -\chi_{xzy}^{eem} \end{aligned}$
Chirale	$\chi_{yzx}^{eee} = \chi_{yxz}^{eee} = -\chi_{zyx}^{eee} = -\chi_{zxy}^{eee}$	$\begin{aligned} &\chi_{xxx}^{mee} \\ &\chi_{xyy}^{mee} = \chi_{xzz}^{mee} \\ &\chi_{yxy}^{mee} = \chi_{yyx}^{mee} = \chi_{zxx}^{mee} = \chi_{zzx}^{mee} \end{aligned}$	$\begin{aligned} &\chi_{xxx}^{eem} \\ &\chi_{xyy}^{eem} = \chi_{xzz}^{eem} \\ &\chi_{yxy}^{eem} = \chi_{zxx}^{eem} \\ &\chi_{yyx}^{eem} = \chi_{zzx}^{eem} \end{aligned}$

Tableau V.1 – Composantes non nulles des tenseurs considérés.

3. Après multiplication à gauche par ${}^tT(0, \psi)$, nous obtenons $P_X^{(2)}$, $P_Y^{(2)}$, M_X et M_Y dans le repère (XYZ) du laboratoire :

$$\begin{aligned} P_{X,L/R}^{(2)} &= cP_{x,L/R}^{(2)} + sP_{z,L/R}^{(2)}, \\ P_{Y,L/R}^{(2)} &= P_{y,L/R}^{(2)}, \\ M_{X,L/R}^{(2)} &= cM_{x,L/R} + sM_{z,L/R}, \\ M_{Y,L/R}^{(2)} &= M_{y,L/R}. \end{aligned} \tag{V.14}$$

Ces expressions permettent le calcul de l'intensité SHG totale donnée par :

$$\begin{aligned} I^{2\omega} &\propto (|E_X^{2\omega}|^2 + |E_Y^{2\omega}|^2) \propto (|P_X^{(2)} + M_Y^{(2)}|^2 + |P_Y^{(2)} - M_X^{(2)}|^2) \\ &\propto \Re[P_X^{(2)} + M_Y^{(2)}]^2 + \Im[P_X^{(2)} + M_Y^{(2)}]^2 + \Re[P_Y^{(2)} - M_X^{(2)}]^2 + \Im[P_Y^{(2)} - M_X^{(2)}]^2, \end{aligned} \tag{V.15}$$

à condition de fixer la phase de chaque composante tensorielle. En théorie, les tenseurs non locaux χ^{eem} et χ^{mee} sont déphasés de $\frac{\pi}{2}$ par rapport au tenseur local χ^{eee} [170]. Nous pouvons alors choisir χ^{eee} réel et les tenseurs non locaux imaginaires purs. On trouve ainsi :

$$\begin{aligned} I_{L/R}^{2\omega} &= K \frac{(I\omega)^2 c^2}{4} \times \\ &\left[\left| c^2(\chi_{xxx}^{eee'} - \chi_{xyy}^{eee'}) + 2s^2\chi_{yxy}^{eee'} \pm 2(c^2(\chi_{xxx}^{eem''} - \chi_{xyy}^{eem''}) + s^2(\chi_{yxy}^{eem''} + \chi_{yyx}^{eem''}) - \chi_{yxy}^{mee''}) \right|^2 \right. \\ &+ 4s^2 \left| \mp \chi_{yzx}^{eee'} - (\chi_{yzx}^{eem''} + \chi_{yxz}^{eem''}) + \chi_{yzx}^{mee''} \right|^2 \\ &+ 4s^2 \left| \chi_{yzx}^{eee'} \pm (\chi_{yzx}^{eem''} + \chi_{yxz}^{eem''}) \mp \chi_{yzx}^{mee''} \right|^2 \\ &\left. + \left| \pm 2\chi_{yxy}^{eee'} + 2(\chi_{yxy}^{eem''} + \chi_{yyx}^{eem''}) - c^2(\chi_{xxx}^{mee''} - \chi_{xyy}^{mee''}) - 2s^2\chi_{yxy}^{mee''} \right|^2 \right], \end{aligned} \tag{V.16}$$

avec K constante de proportionnalité prenant en compte les indices de réfraction, la célérité de la lumière et des facteurs géométriques. Le prime ' indique la partie réelle et le double prime '' la partie imaginaire des composantes tensorielles.

La différence d'intensité correspondant au numérateur du CD-SHG prend la forme (on normalise ici par l'ordre de grandeur de l'intensité SHG moyenne) :

$$\frac{1}{K} \frac{I_L^{2\omega} - I_R^{2\omega}}{(I\omega)^2 c^2} = F_c^m (\chi_{xxx}^{eee'} - \chi_{xyy}^{eee'}) + G_c^m \chi_{yxy}^{eee'} + H_c^e \left((\chi_{yzx}^{eem''} + \chi_{yxz}^{eem''}) - \chi_{yzx}^{mee''} \right), \tag{V.17}$$

avec

$$\begin{aligned}
 F_c^m &= 2c^2 \left(c^2(\chi_{xxx}^{eem''} - \chi_{xyy}^{eem''}) + s^2(\chi_{yyx}^{eem''} + \chi_{yxx}^{eem''}) - \chi_{yxy}^{mee''} \right), \\
 G_c^m &= 2 \left(2s^2 c^2(\chi_{xxx}^{eem''} - \chi_{xyy}^{eem''}) + 2(1 + s^4)(\chi_{yyx}^{eem''} + \chi_{yxx}^{eem''}) - c^2(\chi_{xxx}^{mee''} - \chi_{xyy}^{mee''}) - 4s^2 \chi_{yxy}^{mee''} \right), \\
 H_c^e &= 8s^2 \chi_{yzx}^{eee'}.
 \end{aligned} \tag{V.18}$$

La plus grande différence entre cette expression et celle donnée en section 1. avec l'ADE (équation V.5) est l'absence du facteur $\sin \psi$ qui fixait le signe du CD-SHG en fonction de ψ . Ici, seules les puissances paires de $\sin \psi$ et $\cos \psi$ interviennent : c 'est une fonction paire, qui prendra donc les mêmes valeurs en ψ ou en $-\psi$. Aucune inversion du signal de CD-SHG avec l'angle hors-plan n'est attendue dans ce cas.

Par ailleurs, on voit que les facteurs F_c^m et G_c^m (respectivement H_c^e) ne font intervenir que les composantes chirales des tenseurs non locaux (resp. du tenseur local) et multiplient les composantes achirales du tenseur local (resp. des tenseurs non locaux), avec lesquels une différence de phase de $\frac{\pi}{2}$ existe. Plus précisément, les termes qui contribuent au signal de CD-SHG sont les produits de composantes achirales et chirales $\chi_a * \chi_c$ à condition qu'un déphasage existe entre χ_a et χ_c .

Nous pouvons étendre notre analyse, limitée ici à un tenseur χ^{eee} réel et des tenseurs χ^{eem} et χ^{mee} imaginaires purs, à un cas où tous les tenseurs sont complexes. En particulier, si l'on autorise $\chi_{yzx}^{eee''} \neq 0$ comme en section 1 de ce chapitre, la partie imaginaire de cette composante chirale donne une contribution croisée avec les composantes achirales réelles du même tenseur χ^{eee} . On retrouve alors les termes donnés par l'équation V.4 dans l'ADE, que l'on peut prendre en compte en remplaçant F_c^m et G_c^m de l'équation V.17 par F_c et G_c :

$$\begin{aligned}
 F_c &= F_c^m + F_c^e = F_c^m + 2sc^2 \chi_{yzx}^{eee''}, \\
 G_c &= G_c^m + G_c^e = G_c^m + 4s(1 + s^2) \chi_{yzx}^{eee''}.
 \end{aligned} \tag{V.19}$$

En autorisant également une partie réelle non nulle pour les composantes chirales des tenseurs non locaux, d'autres termes croisés avec leurs composantes achirales purement imaginaires entrent en jeu, que l'on introduit dans l'équation V.17 en remplaçant H_c^e par $H_c = H_c^e + H_c^m$, avec

$$H_c^m = 2sc^2(2\chi_{xxx}^{eem'} - 2\chi_{xyy}^{eem'} - \chi_{xxx}^{mee'} + \chi_{xyy}^{mee'}) + 4s(1 + s^2)(\chi_{yzy}^{eem'} + \chi_{yzy}^{eem'} - \chi_{yzy}^{mee'}). \tag{V.20}$$

Ainsi, l'équation V.17 se généralise au cas où tous les tenseurs ont des composantes chirales complexes, simplement par l'addition d'un terme :

$$\begin{aligned}
 \frac{1}{K} \frac{I_L^{2\omega} - I_R^{2\omega}}{(I^\omega)^2 c^2} &= F_c(\chi_{xxx}^{eee'} - \chi_{xyy}^{eee'}) + G_c \chi_{yxy}^{eee'} + H_c \left((\chi_{yzy}^{eem''} + \chi_{yzy}^{eem''}) - \chi_{yzy}^{mee''} \right) \\
 &= \left[F_c^m(\chi_{xxx}^{eee'} - \chi_{xyy}^{eee'}) + G_c^m \chi_{yxy}^{eee'} + H_c^e \left((\chi_{yzy}^{eem''} + \chi_{yzy}^{eem''}) - \chi_{yzy}^{mee''} \right) \right] (1) \\
 &+ \left[F_c^e(\chi_{xxx}^{eee'} - \chi_{xyy}^{eee'}) + G_c^e \chi_{yxy}^{eee'} + H_c^m \left((\chi_{yzy}^{eem''} + \chi_{yzy}^{eem''}) - \chi_{yzy}^{mee''} \right) \right] (2).
 \end{aligned} \tag{V.21}$$

Ce nouveau terme (2) comprend toutes les contributions $\chi_c * \chi_a$ d'un même type de tenseur χ (soit seulement local, soit seulement non local), que nous désignerons par les *contributions internes*. Il contient en particulier la contribution purement dipolaire électrique dérivée en section 1.1 et peut se factoriser entièrement par $\sin \psi$ (F_c^e , G_c^e et H_c^m sont toutes factorisables par $\sin \psi$) : c 'est une fonction impaire et le signe de ψ influence donc son signe. Le premier terme (1) comprend quant à lui les *contributions croisées* formées par le produit de composantes achirales locales et de composantes chirales non locales, ou vice-versa. Comme nous l'avons vu, ce terme ne s'inverse pas avec l'angle ψ .

En somme, la prise en compte de tous ces termes amène à une expression analytique assez compliquée qui ne donne pas beaucoup d'intuition sur le CD-SHG. Le comportement du CD-SHG en fonction de ψ n'est ici pas immédiat, et va beaucoup dépendre des valeurs des composantes tensorielles. Nous présentons donc dans la partie suivante des simulations numériques permettant de calculer et visualiser l'évolution du signal total de CD-SHG en fonction de l'angle hors-plan ψ , pour différents ordres de grandeur et déphasages entre composantes tensorielles.

3.3 Simulations numériques dans l'approche magnétique

Nous avons mis en place des simulations sous Matlab pour effectuer numériquement l'intégralité du calcul précédent. Dans toutes les simulations, la norme E_0 du champ incident est fixée à 1 (elle n'a pas d'influence sur le signal de CD-SHG). Le code nous donne une valeur de CD-SHG avec comme paramètres d'entrée l'angle ψ et les trois tenseurs χ^{eee} , χ^{eem} et χ^{mee} . Nous traçons ensuite le CD-SHG pour ψ variant de $-\frac{\pi}{2}$ à $\frac{\pi}{2}$.

Une difficulté a été de donner des valeurs aux composantes tensorielles. En effet, si l'on trouve des mesures du tenseur χ^{eee} dans la littérature (voir section 1.2), un seul article donne une mesure des composantes des tenseurs non locaux χ^{mee} et χ^{eem} [175]. Les mesures ont été effectuées par SHG de surface en 1997 dans le groupe de A. Persoons sur une couche mince de polymères chiraux. Nous ne pouvons pas les utiliser directement car il ne s'agit pas de collagène et les erreurs estimées sur les valeurs de chaque composante sont assez élevées, supérieures à 50 % pour certaines. Ces mesures nous indiquent cependant les ordres de grandeur possibles entre composantes : ils sont rassemblés dans le tableau V.2 en prenant χ_{xxx}^{eee} comme référence (100 %), et sont en accord avec les mesures de Pena et al. donnant des composantes chirales magnétiques et électriques du même ordre de grandeur [75].

	Réponse dip. électrique (tenseur local)	Réponse dip. magnétique (tenseurs non locaux)	
Achirale	$\chi_{xyy}^{eee}, \chi_{yxy}^{eee} \approx 60 \%$	$\chi_{yzx}^{mee} \leq 10 \%$	$\chi_{yzx}^{eem}, \chi_{yxz}^{eem}, \chi_{xyz}^{eem} \leq 10 \%$
Chirale	$\chi_{yzx}^{eee} \approx 10 \%$	$\chi_{xxx}^{mee} \approx 20 \%$ $\chi_{xyy}^{mee}, \chi_{yxy}^{mee} \leq 10 \%$	$\chi_{xxx}^{eem} \approx 10 \%$ $\chi_{xyy}^{eem}, \chi_{yxy}^{eem}, \chi_{yyx}^{eem} \leq 10 \%$

Tableau V.2 – Ordres de grandeur approximatifs des composantes non nulles des tenseurs considérés, exprimés en pourcentage de χ_{xxx}^{eee} , obtenus à partir de [175].

3.3.1 Identification des contributions internes et des contributions croisées

Nous avons montré par les calculs analytiques que deux types de contributions entrent en jeu dans le signal de CD-SHG : les contributions internes et les contributions croisées. Il est intéressant d'identifier le comportement de chaque contribution individuellement pour comprendre comment se structure ensuite le signal de CD-SHG total. Pour cela, nous simulons le signal de CD-SHG en fonction de l'angle hors-plan pour différentes conditions de tenseurs, résumées dans le tableau V.3. Les valeurs tensorielles utilisées se basent en partie sur les ordres de grandeur donnés dans le tableau V.2 et sur les mesures de χ^{eee} de la section 1.2, mais restent aléatoires : on ne pourra faire principalement que des commentaires qualitatifs sur les simulations présentées dans cette section.

Contributions internes

Les contributions internes n'apparaissent que si l'on autorise aux composantes tensorielles chirales une partie imaginaire et une partie réelle non nulles. Alors d'une part χ_{yzx}^{eee} interagit avec les composantes achirales réelles de χ^{eee} et d'autre part les parties réelles des composantes chirales de χ^{mee} et χ^{eem} interagissent avec leurs composantes achirales imaginaires pures. La figure V.13 présente le signal de CD-SHG en fonction de l'angle hors-plan ψ que l'on obtient dans quatre cas "internes" théoriques différents :

1. Seul le tenseur local χ^{eee} est non nul (courbe rouge) : c'est le cas dipolaire électrique, dérivé précédemment, et on retrouve bien la courbe donnée en figure V.1. Pour ces valeurs tensorielles,

Contribution interne locale	Contributions internes non locales	Contributions croisées
$\chi_{xxx}^{eee} = 1$	$\chi_{xxx}^{eee} = 0$	$\chi_{xxx}^{eee} = 1$
$\chi_{xyy}^{eee} = 0.63$	$\chi_{xyy}^{eee} = 0$	$\chi_{xyy}^{eee} = 0.63$
$\chi_{yxy}^{eee} = 0.48$	$\chi_{yxy}^{eee} = 0$	$\chi_{yxy}^{eee} = 0.48$
$\chi_{yzx}^{eee} = -0.14 - 0.19i$	$\chi_{yzx}^{eee} = 0$	$\chi_{yzx}^{eee} = -0.14$
$\chi_{yzx}^{mee} = 0$	$\chi_{yzx}^{mee} = 0.3i$	$\chi_{yzx}^{mee} = 0.3i$
$\chi_{xxx}^{mee} = 0$	$\chi_{xxx}^{mee} = 0.2(1 + i)$	$\chi_{xxx}^{mee} = 0.2i$
$\chi_{xyy}^{mee} = 0$	$\chi_{xyy}^{mee} = 0.15(1 + i)$	$\chi_{xyy}^{mee} = 0.15i$
$\chi_{yxy}^{mee} = 0$	$\chi_{yxy}^{mee} = 0.1(1 + i)$	$\chi_{yxy}^{mee} = 0.1i$
$\chi_{yzx}^{eem} = 0$	$\chi_{yzx}^{eem} = 0.3i$	$\chi_{yzx}^{eem} = 0.3i$
$\chi_{yxz}^{eem} = 0$	$\chi_{yxz}^{eem} = 0.2i$	$\chi_{yxz}^{eem} = 0.2i$
$\chi_{xyz}^{eem} = 0$	$\chi_{xyz}^{eem} = 0.1i$	$\chi_{xyz}^{eem} = 0.1i$
$\chi_{xxx}^{eem} = 0$	$\chi_{xxx}^{eem} = 0.2(1 + i)$	$\chi_{xxx}^{eem} = 0.2i$
$\chi_{xyy}^{eem} = 0$	$\chi_{xyy}^{eem} = 0.18(1 + i)$	$\chi_{xyy}^{eem} = 0.18i$
$\chi_{yxy}^{eem} = 0$	$\chi_{yxy}^{eem} = 0.15(1 + i)$	$\chi_{yxy}^{eem} = 0.15i$
$\chi_{yyx}^{eem} = 0$	$\chi_{yyx}^{eem} = 0.1(1 + i)$	$\chi_{yyx}^{eem} = 0.1i$

Tableau V.3 – Valeurs des composantes tensorielles utilisées dans les simulations présentées en section 3.3.1.

le signal et l'angle ψ sont liés par une fonction bijective et impaire : chaque valeur de CD-SHG correspond à un unique angle ψ , de signe opposé.

- 2. & 3.** Seul un tenseur non local (χ^{mee} , courbe bleu, ou χ^{eem} , courbe violette) est non nul : pour ces deux cas, le CD-SHG est également une fonction impaire de ψ , et son signe est donné par celui de ψ (avec le signe des valeurs tensorielles choisi ici). En revanche, elle n'est pas bijective : plusieurs angles hors-plan correspondent à une même valeur de CD-SHG.
- 4.** Les deux tenseurs non locaux χ^{mee} et χ^{eem} sont non nuls, mais χ^{eee} est nul (courbe noire) : dans ce cas, il existe des termes croisés entre χ^{mee} et χ^{eem} , mais comme ce sont tous deux des tenseurs non locaux, nous considérons ces termes comme des contributions internes (non locales). Sans surprise, le signal de CD-SHG est à nouveau une fonction impaire de ψ , et change donc de signe avec ψ .

Nous avons remarqué dans les calculs analytiques que les contributions internes étaient toutes très semblables aux contributions dipolaires électriques et notamment étaient toutes factorisables par $\sin \psi$. Nos simulations confirment bien que le CD-SHG issu de ces contributions est une fonction impaire de l'angle hors-plan, s'annulant lorsque $\psi = 0$ et s'inversant lorsque ψ s'inverse.

Contributions croisées

Intéressons-nous maintenant au CD-SHG purement issu de contributions croisées. Dans ce cas, le tenseur χ^{eee} est uniquement réel et les deux tenseurs non locaux sont imaginaires purs. Nous distinguons sur le graphe présenté en figure V.14 les contributions croisées de χ^{eee} avec χ^{mee} seulement (courbe en bleu) et avec χ^{eem} seulement (courbe en violet). La courbe noire donne quant à elle le CD-SHG obtenu avec l'intégralité des contributions croisées. À chaque fois, le CD-SHG est une fonction paire de ψ : $\text{CD-SHG}(-\psi) = \text{CD-SHG}(\psi)$. Cela est cohérent avec les calculs analytiques qui montrent dans ces trois cas que le numérateur du CD-SHG s'exprime uniquement avec des puissances paires de $\sin \psi$ ou $\cos \psi$. On constate également que le CD-SHG conserve le même signe quelque soit ψ , pour les valeurs tensorielles utilisées ici.

Contributions totales

Que se passe-t-il ensuite lorsque nous autorisons aussi bien les contributions internes que les contributions croisées ? La figure V.15 nous en donne un aperçu : les courbes rouge et noire ont été obtenues

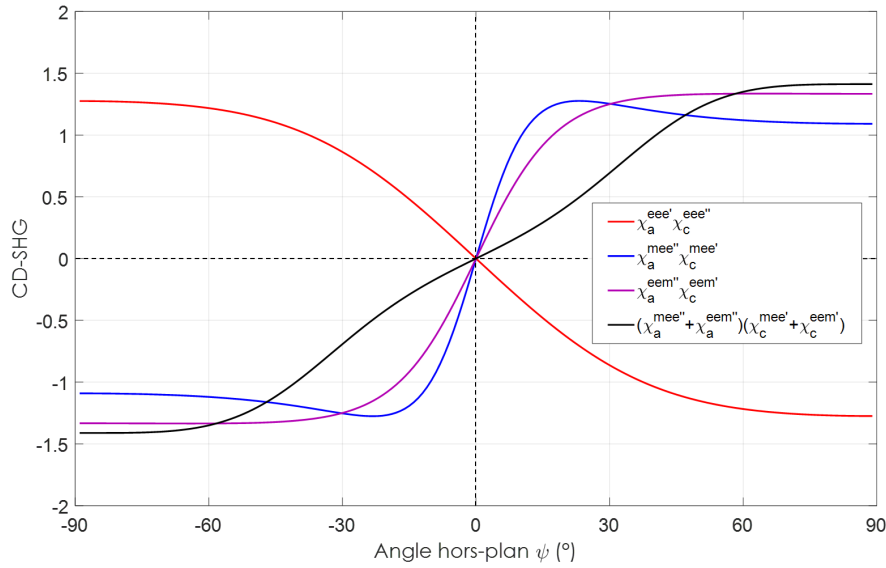


Figure V.13 – Simulations du CD-SHG issu de contributions internes, en fonction de l'angle hors-plan ψ . Courbe rouge : contributions internes locales. Courbe bleue : contributions internes non locales de χ^{mee} seul. Courbe violette : contributions internes non locales de χ^{eem} seul. Courbe noire : contributions internes non locales totales. Les composantes tensorielles utilisées sont données en colonnes 1 et 2 du tableau V.3.

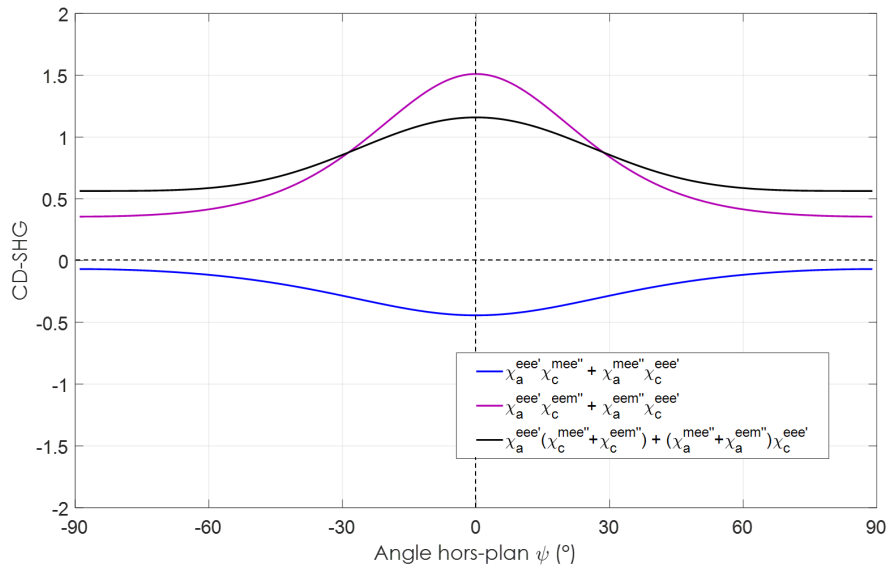


Figure V.14 – Simulations du CD-SHG issu de contributions croisées, en fonction de l'angle hors-plan ψ . Courbe bleue : contributions croisées entre χ^{eee} et χ^{mee} . Courbe violette : contributions croisées entre χ^{eee} et χ^{eem} . Courbe noire : contributions croisées totales. Les composantes tensorielles utilisées sont données en colonne 3 du tableau V.3.

en autorisant respectivement la contribution interne locale et les contributions internes non locales, en plus de l'intégralité des contributions croisées. Dans les deux cas, on retrouve à peu près la forme des contributions internes concernées, mais avec un offset (ici positif car les contributions croisées sont positives) qui décale la courbe : ainsi le CD-SHG n'est plus une fonction impaire de ψ . Lorsque les deux types de contributions internes sont autorisés en plus des contributions croisées (courbe en violet), la forme générale de la courbe tend vers la contribution interne prédominante (ici la contribution interne locale), toujours avec un offset donné par les contributions croisées. La contribution interne la plus

faible ne donne donc pas sa forme globale à la courbe mais semble tout de même la rendre davantage symétrique par rapport à l'axe des ordonnées (ici le côté des $\psi < 0$ est légèrement rabaissé et le côté des $\psi > 0$ est légèrement relevé).

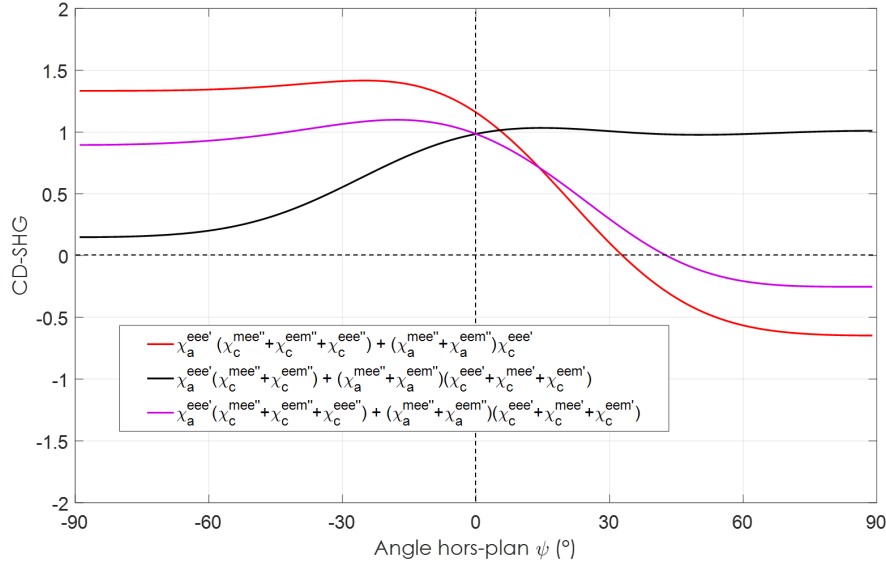


Figure V.15 – Simulations du CD-SHG issu de contributions internes et croisées, en fonction de l'angle hors-plan ψ . Courbe rouge : contributions croisées totales + contributions internes locales. Courbe violette : contributions croisées totales + contributions internes non locales. Courbe noire : contributions internes et croisées totales. Les composantes tensorielles utilisées sont données par le tableau V.3.

Nous comprenons donc avec ces premières simulations que la prise en compte des contributions magnétiques entraîne une diminution de la partie impaire de la réponse de CD-SHG en fonction de ψ , au profit d'une augmentation de la partie paire. C'est bien cela que les expériences *Up-Down* ont mis en évidence, en montrant que $\text{sgn}[\text{CD-SHG}(-\psi)] = \text{sgn}[\text{CD-SHG}(\psi)]$ et donc nécessairement $\text{CD-SHG}(-\psi) \neq -\text{CD-SHG}(\psi)$: l'*impairité* de la fonction qui existait dans l'ADE est perdue.

3.3.2 Variations du module et de la phase des composantes chirales

Les simulations précédentes ont été réalisées avec des valeurs fixes pour les composantes des tenseurs, mais celles-ci sont toutefois incertaines. Nous évaluons ici l'influence des valeurs tensorielles considérées. Pour cela, au lieu d'écrire les composantes complexes sous forme algébrique, il est plus simple de les utiliser sous forme exponentielle, où nous avons un contrôle direct de leur module et de leur phase. Nous pouvons ensuite facilement simuler le signal CD-SHG en itérant sur l'un ou l'autre de ces paramètres, de façon à leur faire prendre toute une gamme de valeurs. Pour limiter l'étendue des situations possibles, nous laissons les composantes achirales de χ^{eee} réelles (phases nulles) et celles de χ^{mee} et de χ^{eem} imaginaires pures (phases de $+\frac{\pi}{2}$), et gardons leurs modules fixes. Le tableau V.4 détaille les valeurs utilisées : le module $\frac{1}{15}$ des composantes achirales non locales est fixé arbitrairement tout en respectant les ordres de grandeur précédents, et le facteur 1.36 qui intervient dans les composantes achirales locales provient des mesures de composantes du tendon données en section 1.3 du chapitre II.

Variations des modules

Dans un premier temps, nous regardons l'**influence du module de chaque composante chirale**, une par une, sur le signal de CD-SHG. Les phases de toutes les composantes chirales sont fixées, ainsi que le module des composantes chirales quand on ne les fait pas varier (voir tableau V.5). Ensuite, nous traçons les courbes représentant le signal de CD-SHG en fonction de ψ avec le module de la

Composantes achirales
$\chi_{xxx}^{eee} = 1$
$\chi_{xyy}^{eee} = 1/1.36$
$\chi_{yxy}^{eee} = 1/1.36$
$\chi_{yzx}^{mee} = 1/15e^{i\frac{\pi}{2}}$
$\chi_{yzx}^{eem} = 1/15e^{i\frac{\pi}{2}}$
$\chi_{yxz}^{eem} = 1/15e^{i\frac{\pi}{2}}$
$\chi_{xyz}^{eem} = 1/15e^{i\frac{\pi}{2}}$

Tableau V.4 – Valeurs des composantes achirales des tenseurs de susceptibilité, utilisées dans les simulations présentées en section 3.3.2. Elles sont fixes dans toutes les simulations.

composante chirale considérée variant de $\frac{1}{20}$ à 1^{10} .

Composantes chirales
$\chi_{yzx}^{eee} = \frac{1}{10}e^{i\frac{\pi}{12}}$ (phase 15°)
$\chi_{xxx}^{mee} = \frac{1}{5}e^{i\frac{5\pi}{12}}$ (phase 75°)
$\chi_{xyy}^{mee} = \chi_{yxy}^{mee} = \frac{1}{5*1.36}e^{i\frac{5\pi}{12}}$ (phase 75°)
$\chi_{xxx}^{eem} = \frac{1}{10}e^{i\frac{5\pi}{12}}$ (phase 75°)
$\chi_{xyy}^{eem} = \chi_{yxy}^{eem} = \chi_{yyx}^{eem} = \frac{1}{10*1.36}e^{i\frac{5\pi}{12}}$ (phase 75°)

Tableau V.5 – Valeurs des composantes chirales des tenseurs de susceptibilité, utilisées dans les simulations présentées en section 3.3.2 sauf pour les composantes que l'on fait explicitement varier (mentionné à chaque simulation).

Nous considérons pour simplifier que $|\chi_{xyy}^{mee}| = |\chi_{yxy}^{mee}|$ et que $|\chi_{xyy}^{eem}| = |\chi_{yxy}^{eem}| = |\chi_{yyx}^{eem}|$. Ainsi, il nous reste seulement 5 composantes chirales indépendantes à étudier. L'influence des modules de χ_{xxx}^{mee} , χ_{xyy}^{mee} , χ_{xxx}^{eem} , χ_{xyy}^{eem} et de χ_{yzx}^{eem} sur la courbe CD-SHG(ψ) est donnée en figure V.16. On constate que le module des composantes tensorielles, et en particulier le module des composantes non locales, joue beaucoup sur les valeurs de CD-SHG obtenues. De manière plus drastique, on note qu'une augmentation de $\frac{1}{20}$ à $\frac{1}{2}$ du module de n'importe quelle composante chirale considérée entraîne une inversion du signe de certaines valeurs de CD-SHG : ces valeurs correspondent souvent à des ψ assez élevés (au moins supérieurs à 30°), sauf dans le cas d'une variation de module de χ_{xxx}^{mee} où l'inversion a lieu pour tous les ψ inférieurs à 60° .

La figure V.16 utilise l'hypothèse que les 5 composantes chirales sont indépendantes, mais il se peut qu'elles soient liées entre elles. Pour prendre cela en compte, nous imposons maintenant un rapport fixe entre les composantes χ_{xxx} et χ_{xyy} (rapport 1.36 :1) ou entre les composantes de χ^{mee} et χ^{eem} (rapport 2 :1 pour respecter les ordres de grandeur du tableau V.2). La figure V.17 (a) permet de visualiser simultanément l'influence du module des composantes chirales de χ^{eee} (courbes de différentes couleurs sur un même graphe), de χ^{mee} (augmente d'un graphe à l'autre de haut en bas) et de χ^{eem} (augmente d'un graphe à l'autre de gauche à droite), avec la contrainte $\chi_{xxx} = 1.36\chi_{xyy}$ pour les deux tenseurs non locaux. Lorsque le module de χ^{mee} est fixé à au moins $\frac{1}{5}$, on peut inverser le signe du

10. Un module de 1 signifie que la composante chirale considérée est du même ordre de grandeur que χ_{xxx}^{eee} .

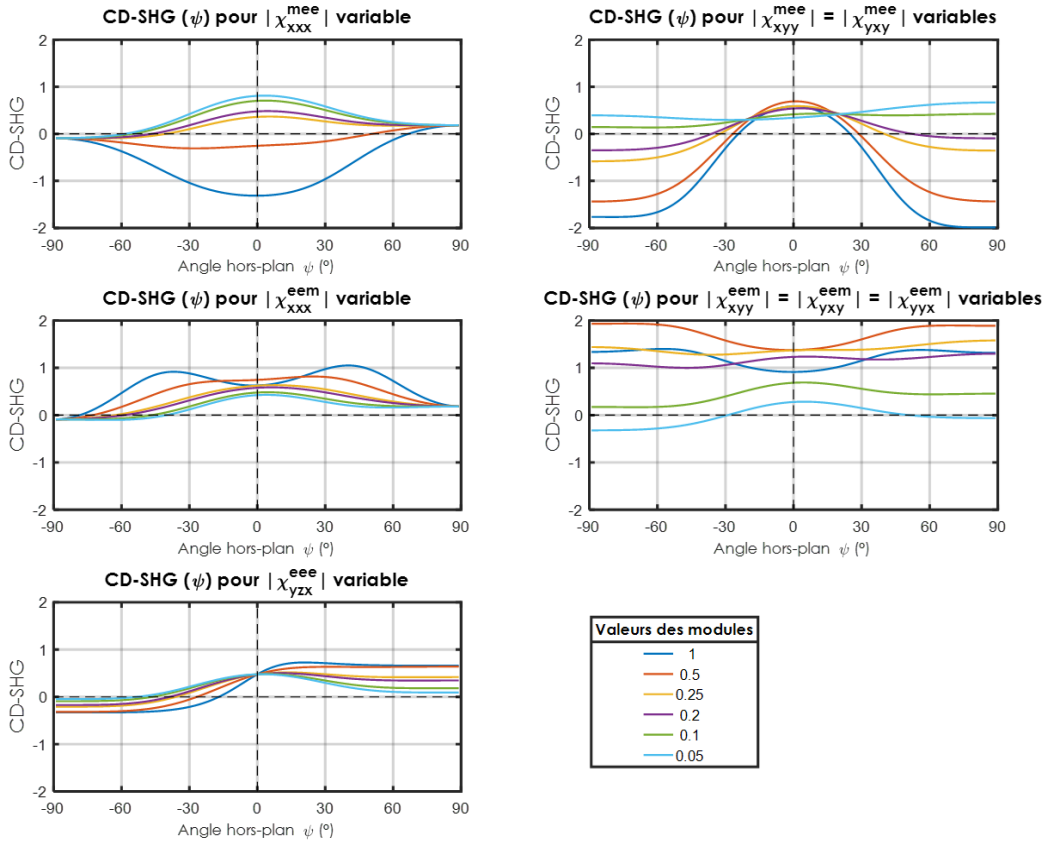


Figure V.16 – Simulations du CD-SHG en fonction de l’angle hors plan ψ , lorsque le module de certaines composantes tensorielles chirales varie. Les composantes dont le module varie sont indiquées au dessus de chaque graphe. Chaque couleur correspond à une valeur de module, allant de $\frac{1}{20}$ à 1. Les modules des composantes qui ne varient pas ainsi que les phases utilisées sont indiqués dans le tableau V.4 (composantes achirales) et le tableau V.5 (composantes chirales).

CD-SHG pour n’importe quel angle ψ en faisant varier le module de χ^{eem} (cadre rouge). On constate une inversion similaire lorsque l’on fixe un petit module pour χ^{eem} (de l’ordre de $\frac{1}{10}$ ou moins) et que le module de χ^{mee} varie (cadre vert). Si maintenant on laisse évoluer indépendamment les composantes de type χ_{xxx} et χ_{xyy} des tenseurs non locaux, mais que l’on lie ces deux tenseurs par la contrainte $\chi_{xxx}^{mee} = 2\chi_{xxx}^{eem}$ et $\chi_{xyy}^{mee} = 2\chi_{xyy}^{eem}$, on obtient les courbes de CD-SHG présentées en figure V.17 (b). Nous visualisons simultanément l’influence du module des composantes chirales de χ^{eee} (courbes de différentes couleurs sur un même graphe), et des composantes non locales de type χ_{xxx} (augmentent d’un graphe à l’autre de haut en bas) et de type χ_{xyy} (augmentent d’un graphe à l’autre de gauche à droite). Là encore, différentes formes de courbes sont possibles selon les modules considérés, et une valeur de CD-SHG pour un certain angle ψ peut changer de signe lorsque le module d’une composante change (cadres rouge et vert).

Variations des phases

Intéressons-nous maintenant à l’influence de la phase de chaque composante chirale sur le signal de CD-SHG. Il suffit de faire varier la phase des composantes entre $-\frac{\pi}{2}$ et $\frac{\pi}{2}$ pour connaître l’intégralité des situations, car les simulations numériques du signal de CD-SHG ont montré qu’une phase de θ est équivalente à une phase de $\pi - \theta$. Nous imposons pour simplifier une phase commune à toutes les composantes chirales d’un même tenseur, ce qui nous fait seulement 3 variations de phase à étudier, présentées en figure V.18 :

- (a) Variation de la phase des composantes chirales de χ^{mee} , toutes les autres phases et tous les modules restant constants par ailleurs, donnés par les tableaux V.4 et V.5.

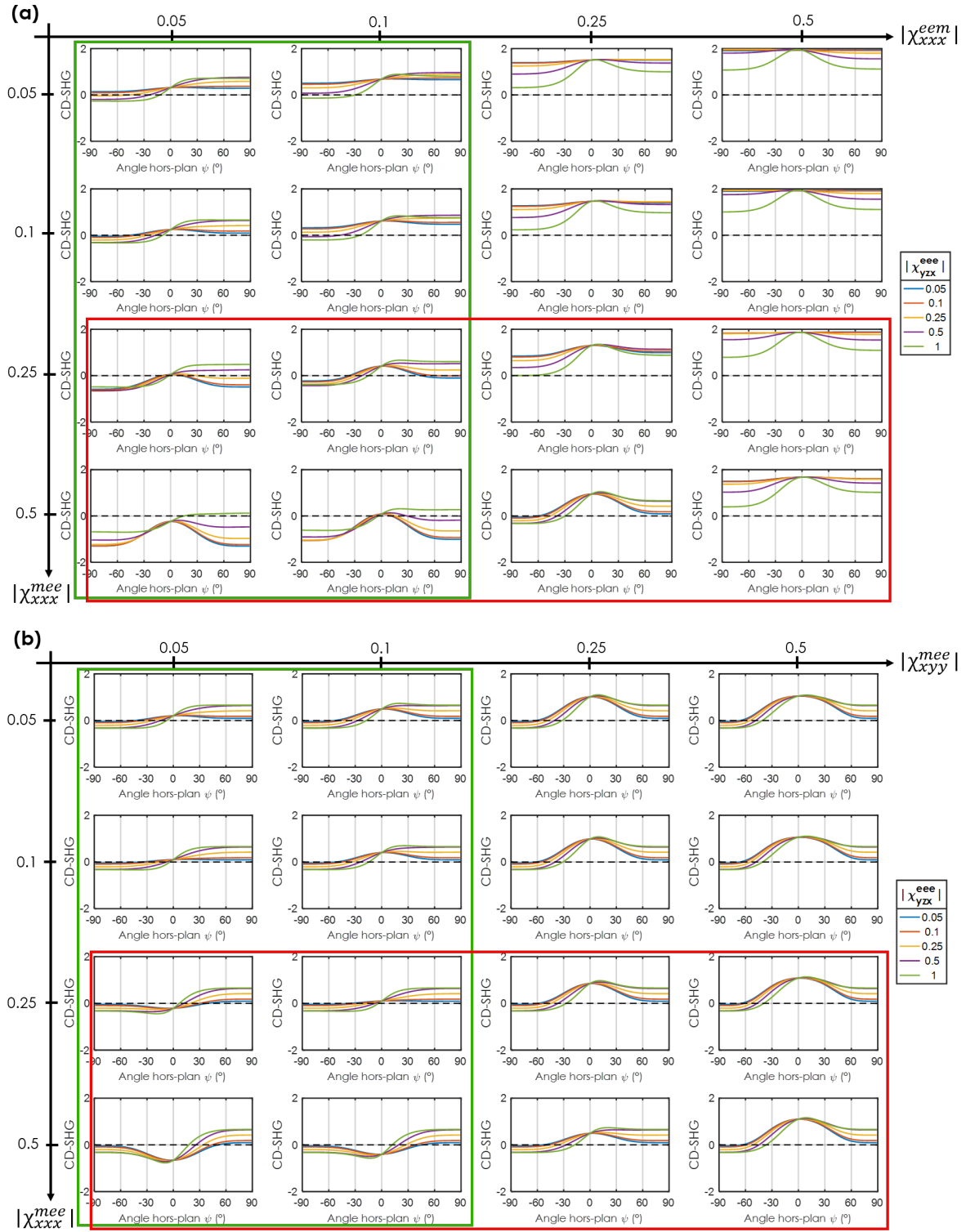


Figure V.17 – Simulations du CD-SHG en fonction de l'angle hors plan ψ , dans différentes configurations de modules de composantes tensorielles chirales. Sur chaque graphe, les courbes de différentes couleurs correspondent à différentes valeurs de module pour χ_{yzx}^{eee} , indiquées sur la légende. (a) Les modules de χ_{xxx}^{mee} et de χ_{xxx}^{eem} varient indépendamment entre $\frac{1}{20}$ et $\frac{1}{2}$. On impose dans ce cas : $|\chi_{xxx}^{mee}| = |\chi_{xyy}^{mee}| = \frac{1}{1.36}|\chi_{xxx}^{mee}|$ et $|\chi_{xxx}^{eem}| = |\chi_{xyy}^{eem}| = |\chi_{yyx}^{eem}| = \frac{1}{1.36}|\chi_{xxx}^{eem}|$. (b) Les modules de χ_{xxx}^{mee} et de χ_{xyy}^{mee} varient indépendamment entre $\frac{1}{20}$ et $\frac{1}{2}$. On impose dans ce cas : $|\chi_{xyy}^{mee}| = |\chi_{xyy}^{eem}|$, $|\chi_{xxx}^{eem}| = \frac{1}{2}|\chi_{xxx}^{mee}|$ et $|\chi_{xyy}^{eem}| = |\chi_{yyx}^{eem}| = |\chi_{xyy}^{eem}| = \frac{1}{2}|\chi_{xyy}^{eem}|$. Les valeurs des composantes achirales ainsi que les phases utilisées sont indiquées respectivement dans le tableau V.4 et le tableau V.5.

Faire varier la phase de 0 à $+\frac{\pi}{2}$ décale la courbe vers le bas, plus rapidement pour le bord que pour le centre. Ainsi une courbure centrale s'amplifie, en forme de bosse. La variation de phase dans l'autre sens (de 0 à $-\frac{\pi}{2}$) donne un effet inverse : la courbe est décalé vers le haut, et une courbure centrale en forme de puits se creuse. L'effet de la phase de χ^{mee} est surtout un effet de courbure.

- (b) Variation de la phase des composantes chirales de χ^{em} , toutes les autres phases et tous les modules restant constants par ailleurs, donnés par les tableaux V.4 et V.5.

La forme des courbes reste quasi-identique pour chaque phase, mais la courbe est décalée vers les valeurs positives lorsque la phase varie de $-\frac{\pi}{2}$ à $\frac{\pi}{2}$. L'effet de la phase de χ^{em} est surtout un effet de décalage.

- (c) Variation de la phase de la composante chirale de χ^{ee} , toutes les autres phases et tous les modules restant constants par ailleurs, donnés par les tableaux V.4 et V.5.

Le changement de phase n'entraîne cette fois pas de décalage de la courbe, mais la pivote dans un sens qui dépend du signe de la phase. En effet, pour une phase nulle, le CD-SHG suit la courbe violette présentant un maximum pour $\psi = 0$. Un changement de phase opère une sorte de rotation de la courbe par rapport à ce point de maximum, dans le sens trigonométrique pour une phase positive et dans le sens horaire pour une phase négative. Cette rotation change les propriétés de la fonction CD-SHG(ψ) : pour une phase nulle, cette fonction est paire, et reste quasi-paire pour des petites phases (on parle alors de courbes quasi-paires **QP**). Pour des phases plus grandes, la rotation est plus importante et la fonction perd sa parité jusqu'à devenir quasi bijective : on a une fonction de type fonction impaire, mais présentant un offset (CD-SHG(0) $\neq 0$) (on parle alors de courbes quasi-impaires décalées **QID**).

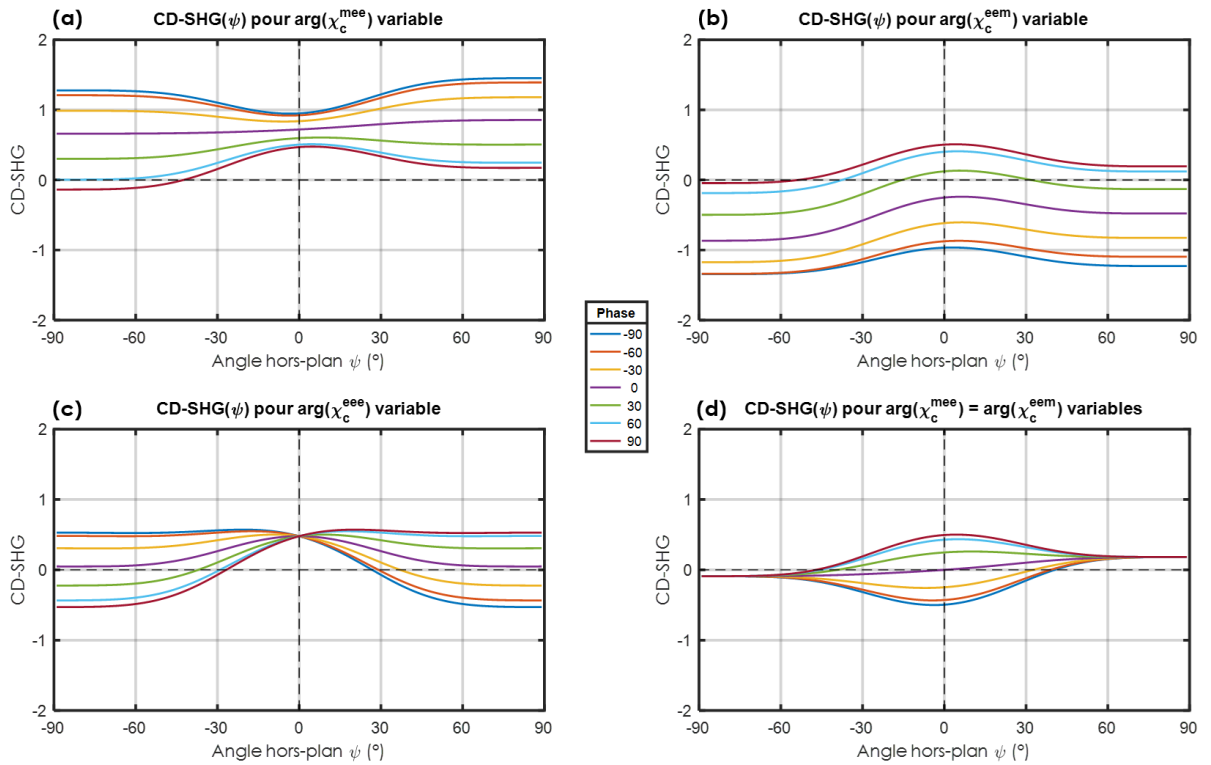


Figure V.18 – Simulations du CD-SHG en fonction de l'angle hors plan ψ , lorsque la phase de certaines composantes tensorielles chirales varie. Les composantes dont la phase varie sont indiquées au dessus de chaque graphe, et l'on considère que toutes les composantes chirales d'un même tenseur sont en phase (l'indice c vaut pour *chiral*). Chaque couleur correspond à une valeur de phase, allant de -90° à 90° par pas de 15° . Les phases des composantes qui ne varient pas ainsi que les modules utilisés sont indiqués dans le tableau V.4 (composantes achirales) et le tableau V.5 (composantes chirales).

La figure V.18 (d) donne l'évolution de la courbe de CD-SHG lorsque χ^{mee} et χ^{em} sont liés, c'est-à-

dire ont des phases identiques qui varient ensemble. Le décalage négatif dû à la variation de phase de χ^{mee} est alors compensé par le décalage positif dû à la variation de phase de χ^{eem} , et seule la courbure de la fonction change lorsque la phase change, sans plus aucun décalage.

Il est à noter que les trois effets décrits plus haut (resp. courbure, décalage et rotation) ont également lieu, mais dans une moindre mesure, lorsque l'on s'intéresse à la variation du module des composantes chirales de χ^{mee} , χ^{eem} et χ^{eee} , respectivement.

3.3.3 Les deux grands types de courbes théoriques du CD-SHG en fonction de ψ

Il est très difficile de tirer des conclusions sur les simulations numériques du signal de CD-SHG dans l'approche magnétique. La complexité vient du fait qu'à l'heure où ce travail est réalisé, nous ne connaissons pas les valeurs des composantes tensorielles, aussi bien non locales (jamais mesurées) que locales (mesurées dans l'approximation dipolaire électrique). Cela fait beaucoup de paramètres inconnus, que nous avons étudiés numériquement un à un dans la section précédente, pouvant donner lieu à toutes les situations possibles quant au comportement du CD-SHG en fonction de l'angle hors-plan ψ . Toutefois, nous avons pu distinguer les principaux effets liés à la phase et au module de chaque composantes chirales, et identifier deux grands types de courbes représentant CD-SHG(ψ) : le type quasi-pair **QP**, avec une forme caractéristique en *cloche* ou en *chapeau* dont la courbure peut être positive (cloche à l'endroit) ou négative (cloche à l'envers), et le type quasi-impair décalé **QID**, qui peut correspondre soit à une courbe QP pivotée et ré-aplatie aux bords par une phase importante de χ_{yzx}^{eee} , soit à des modules magnétiques faibles avec un module fort pour χ_{yzx}^{eee} . Ce dernier cas est visible en figure V.17 lorsque $|\chi_{yzx}^{eee}| \geq 0.5$, $|\chi_{xxx}^{mee}| \leq 0.25$ et $|\chi_{xxx}^{eem}|$ ou $|\chi_{xyy}^{mee}| \leq 0.1$ (courbes vertes et violettes dans le quart nord-ouest de la figure) : ce n'est pas étonnant, car on se rapproche dans ce cas des hypothèses de l'ADE aboutissant à une courbe impaire.

Pour aller plus loin dans la compréhension du signal de CD-SHG, il nous faut confronter ces simulations aux données expérimentales déjà obtenues sur le CD-SHG. En effet, avec ces données, notamment les résultats des expériences *Up-Down*, nous avons à notre disposition tout un ensemble d'informations expérimentales permettant de rejeter les cas théoriques incohérents. Dans la section suivante, nous embarquons donc avec l'équipage de toutes nos données de CD-SHG, à la recherche de la courbe exacte...

4 Analyse expérimentale de la dépendance à l'angle hors-plan

4.1 Variabilité des tenseurs de susceptibilité non-linéaire dans un même tissu

Dans un premier temps, il est raisonnable de penser qu'une seule et même courbe représentant l'évolution du signal de CD-SHG en fonction de l'angle hors-plan ψ est valide en tout point d'un même tissu constitué de fibrilles de collagène. Autrement dit, cela revient à considérer que chaque volume sondé au sein d'un même tissu répond avec les mêmes tenseurs de susceptibilité non-linéaire χ^{eee} , χ^{mee} et χ^{eem} : il n'y a pas de variabilité des tenseurs à l'échelle du tissu.

Sous cette hypothèse, comme les tenseurs ont des valeurs uniques, un seul type de courbe sur les deux possibles pour le CD-SHG est exact. À chaque pixel de la zone de tissu imagée en SHG correspond un angle ψ , associé à la valeur de CD-SHG donnée par l'unique fonction exacte. Cette fonction doit donc être en mesure d'expliquer l'intégralité des valeurs de CD-SHG rencontrées dans nos images. Or, on remarque que les distributions expérimentales des valeurs de CD-SHG au sein d'une image sont toutes quasi symétriques (la figure V.19 présente des histogrammes typiques de valeurs de CD-SHG pour différents tissus) : la courbe exacte doit donc couper au moins une fois l'axe des abscisses (CD-SHG = 0) pour présenter des valeurs de CD-SHG aussi bien négatives que positives. Par ailleurs, nos expériences *Up-Down* ont montré (pour la quasi totalité des tissus étudiés) l'absence d'inversion de signe du CD-SHG sur l'ensemble de l'image (donc pour n'importe quel angle hors-plan présent), lorsqu'on mesure le CD-SHG après avoir retourné l'échantillon de 180°. Cela doit aussi se retrouver sur la courbe, avec $\text{sgn}(\text{CD-SHG}(-\psi)) = \text{sgn}(\text{CD-SHG}(\psi))$.

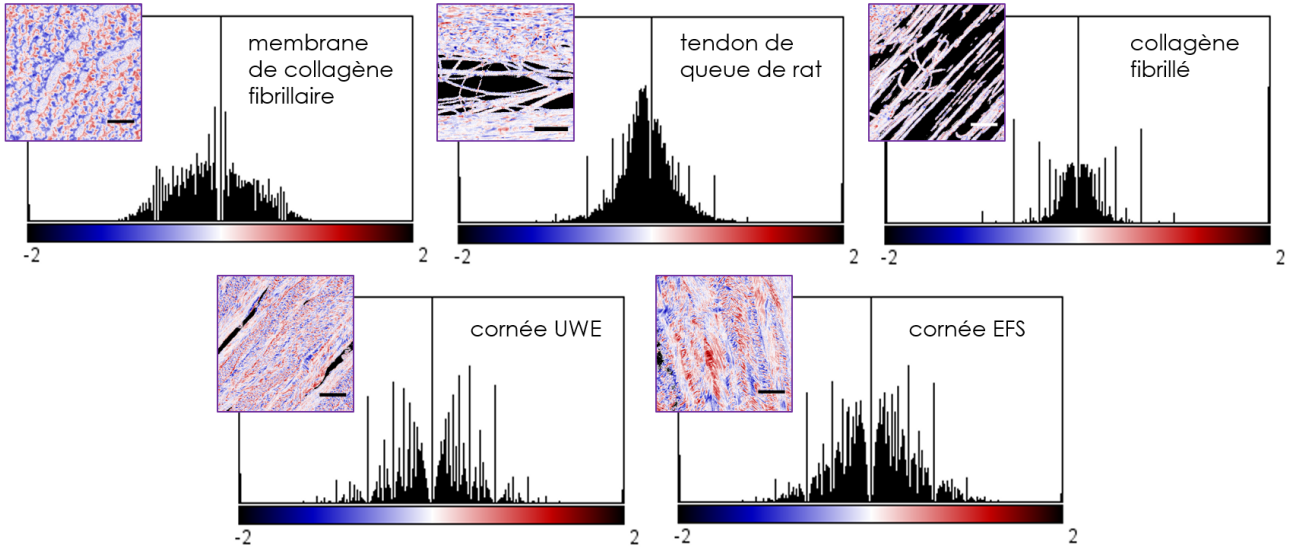


Figure V.19 – Histogrammes expérimentaux typiques des valeurs de CD-SHG dans différents tissus, réparties entre -2 (en bleu) et 2 (en rouge). Les images de CD-SHG sur lesquelles ont été calculées les distributions se trouvent à côté de leurs histogrammes respectifs. Barre d'échelle = 10 μm .

4.1.1 Le type QID (quasi-impair décalé)

Considérons tout d'abord l'éventualité du type QID, représenté en figure V.20 (a). Une telle courbe est obtenue pour de faibles modules magnétiques ou lorsque les composantes chirales et achirales de χ^{eee} sont déphasées d'environ $\frac{\pi}{2}$. Elle respecte bien la contrainte d'une distribution quasi symétrique de valeurs positives et négatives de CD-SHG. De plus, une courbe de type QID présente un décalage tel qu'elle ne passe pas par l'origine et annule le CD-SHG en $\psi_0 \neq 0$: cela entraîne une non-inversion de signe du CD-SHG lorsque ψ s'inverse pour tous les angles ψ tels que $|\psi| < |\psi_0|$. En revanche, elle permet l'inversion de signe pour des angles ψ plus grands tels que $|\psi| > |\psi_0|$. Si l'on suppose que les échantillons étudiés (en particulier les cornées) présentent aussi bien des petits angles que des angles importants proches de $\frac{\pi}{2}$, cela contredit nos résultats *Up-Down*, ne montrant aucun pixel inversé. Si l'on suppose maintenant que nos échantillons ne présentent que des petits angles, tels que $|\psi| < |\psi_0|$, nous aboutissons tout de même à une contradiction : les valeurs de CD-SHG obtenues devraient être soit toutes positives (décalage positif de la courbe QID), soit toutes négatives (décalage négatif). En conclusion, une unique courbe de type QID ne peut pas représenter l'évolution du signal de CD-SHG en fonction de ψ .

4.1.2 Le type QP (quasi-pair)

Qu'en est-il du type QP, représenté en figure V.20 (b) (avec une courbure positive pour l'exemple) ? Ce dernier advient principalement lorsque les composantes chirales locales et non locales sont du même ordre de grandeur, avec une légère prédominance de χ_{xxx}^{mee} , et lorsque la phase de χ_{yzx}^{eee} est faible. Ici, pour que le CD-SHG présente des valeurs à la fois positives et négatives, la courbe doit couper deux fois l'axe des abscisses : $\text{CD-SHG}(\psi_1) = \text{CD-SHG}(\psi_2) = 0$ (sinon la courbe est soit entièrement en dessous, soit entièrement au dessus de l'axe des abscisses). Si $\psi_1 = -\psi_2$, le CD-SHG ne change pas de signe lorsque l'on passe de ψ à $-\psi$, et ce quel que soit l'angle hors-plan ψ , en cohérence avec les expériences *Up-Down*. En revanche, si les deux angles d'annulation du CD-SHG diffèrent en valeur absolue (par exemple $|\psi_1| < |\psi_2|$), le CD-SHG peut inverser son signe pour certains angles ψ tels que $|\psi_1| < |\psi| < |\psi_2|$. Une telle divergence entre ψ_1 et ψ_2 se produit notamment lorsque la phase de χ_{yzx}^{eee} n'est plus assez petite, comme on le voit sur la courbe orange de la figure V.20 (b) où la phase de χ_{yzx}^{eee} est fixée à 15° . Ainsi, pour être en accord avec les résultats *Up-Down*, les composantes chirales et achirales de χ^{eee} ne doivent presque pas être déphasées (la courbe bleue présente un cas où χ_{yzx}^{eee} a

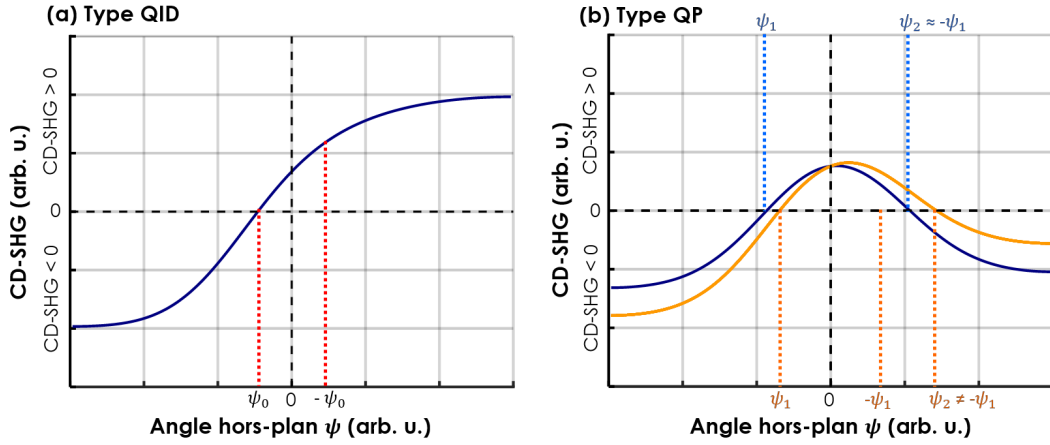


Figure V.20 – Simulations du CD-SHG en fonction de l'angle hors plan ψ , dans deux cas théoriques différents. Pour les deux cas, nous utilisons les mêmes composantes tensorielles achirales : $\chi_{xxx}^{eee} = 1$, $\chi_{xyy}^{eee} = \frac{1}{1.36}$, $\chi_{yxy}^{eee} = \frac{0.5}{1.36}$, $\chi_{yzx}^{mee} = \chi_{yzx}^{eem} = \chi_{yxz}^{eem} = \chi_{xyz}^{eem} = \frac{1}{15}e^{i\frac{\pi}{2}}$. (a) Courbe de type QID (*quasi impair décalé*), obtenue avec les composantes tensorielles chirales données en deuxième colonne du tableau V.6. (b) Courbes de type QP (*quasi pair*), obtenues avec les composantes chirales données en deuxième colonne du tableau V.6.

	Type QID	Type QP
χ_{yzx}^{eee}	$\frac{1}{10}e^{i\frac{\pi}{2}}$	$\frac{1}{10}e^{i\frac{1\pi}{36}}$ (phase 5°, courbe bleue) $\frac{1}{10}e^{i\frac{1\pi}{12}}$ (phase 15°, courbe orange)
χ_{xxx}^{mee}	$\frac{1}{10}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{5}e^{i\frac{5\pi}{12}}$
$\chi_{xyy}^{mee} = \chi_{yxy}^{mee}$	$\frac{1}{10*1.36}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{5*1.36}e^{i\frac{5\pi}{12}}$
χ_{xxx}^{eem}	$\frac{1}{20}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{10}e^{i\frac{5\pi}{12}}$
$\chi_{xyy}^{eem} = \chi_{yxy}^{eem}$	$\frac{1}{20*1.36}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{20*1.36}e^{i\frac{5\pi}{12}}$
χ_{yyx}^{eem}	$\frac{1}{20*1.36}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{15*1.36}e^{i\frac{5\pi}{12}}$

Tableau V.6 – Valeurs des composantes chirales des tenseurs de susceptibilité, utilisées pour les figures V.20 et V.21.

une phase de 5°).

Toutefois, une telle courbe impose que le CD-SHG prenne des valeurs assez importantes et de même signe à tous les petits angles ψ tels que $\psi_1 < \psi < \psi_2$ et de signe opposé aux grands angles $\psi < \psi_1$ ou $\psi > \psi_2$ (sur le graphe V.20 (b) : positif aux petits angles et négatifs aux grands angles, mais cela s'inverse si l'on choisit des phases magnétiques opposées par exemple). En complétant nos simulations par le tracé de l'intensité SHG moyenne $I_{moy}^{2\omega} = \frac{I_L + I_R}{2}$ en fonction de ψ (figure V.21), nous voyons que la zone de petits angles où le CD-SHG a une valeur positive importante correspond au maximum d'intensité SHG moyenne. Ainsi nous devrions constater expérimentalement un CD-SHG non nul et du même signe pour tous les pixels aux fortes intensités SHG, et un CD-SHG de signe opposé pour les pixels aux intensités SHG faibles.

Que nous disent nos données expérimentales? La figure V.22 présente l'image en intensité SHG moyenne accompagnée de l'image de CD-SHG obtenues expérimentalement sur une cornée UWE. À droite, les profils pris le long du rectangle rouge montrent qu'à une intensité SHG moyenne faible correspondent des valeurs importantes de CD-SHG aussi bien négatives que positives, qui deviennent presque nulles lorsque l'intensité moyenne est forte. En pratique, on constate sur toutes les coupes de cornées une anti-corrélation entre le signal de CD-SHG et l'intensité SHG moyenne (nous avons

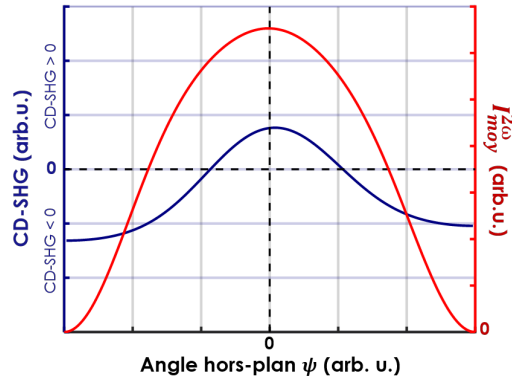


Figure V.21 – Simulations du CD-SHG (en bleu) et de l'intensité SHG moyenne (en rouge) en fonction de l'angle hors plan ψ , dans le cas QP déjà tracé en figure V.20 (b).

également mis cela en avant dans la figure 5 de l'article présenté au chapitre IV.). De plus, les expériences (présentées en section 2.2.2) sur tendon et collagène fibrillé, qui sont des échantillons avec des fibrilles principalement dans le plan (donc avec une faible amplitude d'angles ψ autour de 0° et une intensité SHG assez forte), donnent principalement du CD-SHG nul, avec des zones faiblement négatives et d'autres faiblement positives. En résumé, nos expériences montrent que les intensités SHG fortes correspondent à du CD-SHG proche de 0 (et de signe variable), et que les intensités SHG faibles sont associées à du CD-SHG important, aussi bien négatif que positif. Cela est en contradiction avec les attentes de notre simulation QP, qui associait aux fortes intensités SHG un CD-SHG non nul de signe unique, et aux faibles intensités SHG un CD-SHG du signe opposé (par exemple, un CD-SHG uniquement positif aux $I_{moy}^{2\omega}$ fortes et un CD-SHG uniquement négatif aux $I_{moy}^{2\omega}$ faibles, comme sur la figure V.21).

Nous déduisons de ces désaccords qu'il n'est pas possible d'expliquer nos résultats expérimentaux de CD-SHG en fonction de ψ par une seule courbe de type QP.

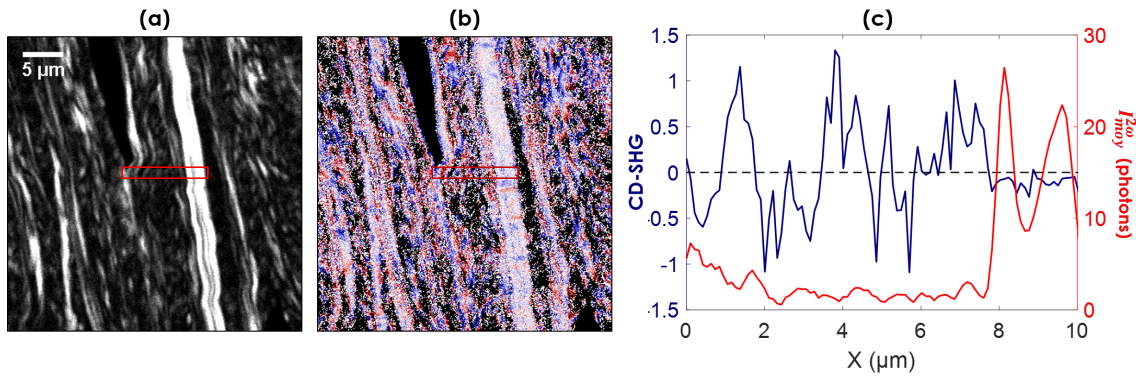


Figure V.22 – Imagerie d'une coupe transverse de cornée UWE : (a) Intensité SHG moyenne et (b) CD-SHG. Le rectangle rouge visible dans les deux images délimite la zone où ont été tracés les profils de valeurs SHG et CD-SHG (c), le long de la longueur du rectangle en moyennant sur la largeur.

L'hypothèse d'unicité des tenseurs de susceptibilité non-linéaire pour un même tissu n'aboutit qu'à des contradictions entre les expressions théoriques possibles du CD-SHG et nos résultats expérimentaux. Il est donc nécessaire de lever cette hypothèse : désormais, au sein d'un même tissu et pour un même angle hors-plan ψ des fibrilles dans le volume focal, nous supposons que la réponse de CD-SHG peut être différente d'un pixel à l'autre, et plusieurs courbes à la fois représentent l'évolution du CD-SHG en fonction de l'angle ψ . On peut comprendre cela en admettant que la micro-structuration du tissu n'est pas forcément homogène : au sein de volume focaux différents, les fibrilles sont plus ou moins nombreuses et peuvent s'agencer de différentes façons, avec une influence sur les composantes

tensorielles, qui ne sont alors pas identiques pour tous les pixels.

4.2 Étude des contraintes locales

Nous poursuivons donc notre analyse en acceptant que les composantes tensorielles puissent changer entre les pixels d'une même image. Cependant, comme aucune interprétation physique ne nous semble pertinente pour expliquer de grandes variations d'un pixel à l'autre dans la **phase** des composantes, nous considérons ici des phases constantes. Seuls les modules, variables, peuvent changer la forme de la courbe du CD-SHG d'un point à l'autre de la zone imagée.

Cette variabilité des courbes complexifie beaucoup notre étude du CD-SHG, mais permet de s'affranchir dans un premier temps d'une contrainte expérimentale : la symétrie de la distribution des valeurs de CD-SHG au sein d'une image, avec des valeurs aussi bien négative que positive. En effet, puisqu'une multitude de courbes est valide au sein d'une même image, on peut imaginer que certaines courbes prennent des valeurs exclusivement positives et d'autres exclusivement négatives, construisant ainsi une distribution symétrique de valeurs de CD-SHG. Une courbe particulière représentant le CD-SHG d'un seul pixel n'est donc plus obligée de croiser l'axe des abscisses (CD-SHG=0). Cet allègement des contraintes rebat les cartes pour les deux grands types de courbes que nous avons rejeté en section précédente, et dont nous pouvons maintenant reprendre l'analyse. Seules restent ce que nous pouvons appeler les contraintes locales : la contrainte de non-inversion de signe du CD-SHG lorsque ψ s'inverse et la contrainte d'anti-corrélation du CD-SHG avec $I_{moy}^{2\omega}$: un maximum d'intensité SHG moyenne doit correspondre à un faible CD-SHG.

4.2.1 Contrainte de non-inversion de signe

Pour respecter la contrainte de non-inversion de signe du CD-SHG quelque soit l'angle ψ , une courbe de type QID n'a pas d'autre choix que d'être entièrement positive ou entièrement négative pour tous les angles ψ (voir la figure V.23 (a), courbes en trait plein, tracées selon le tableau V.7). Une courbe de type QP, en revanche, respecte automatiquement la contrainte de non-inversion lorsqu'elle croise l'axe des abscisses en ψ_1 et en ψ_2 , à condition que $\psi_1 \approx -\psi_2$. Cette égalité n'est plus nécessaire si la courbe ne croise pas l'axe des abscisses, comme c'est le cas en figure V.23 (b) et (c) (courbes en trait plein, tracées selon le tableau V.7). Comme une distribution symétrique de valeurs de CD-SHG n'est plus requise, de telles courbes sont désormais acceptables, et la contrainte de non-inversion peut être respectée dans tous les cas.

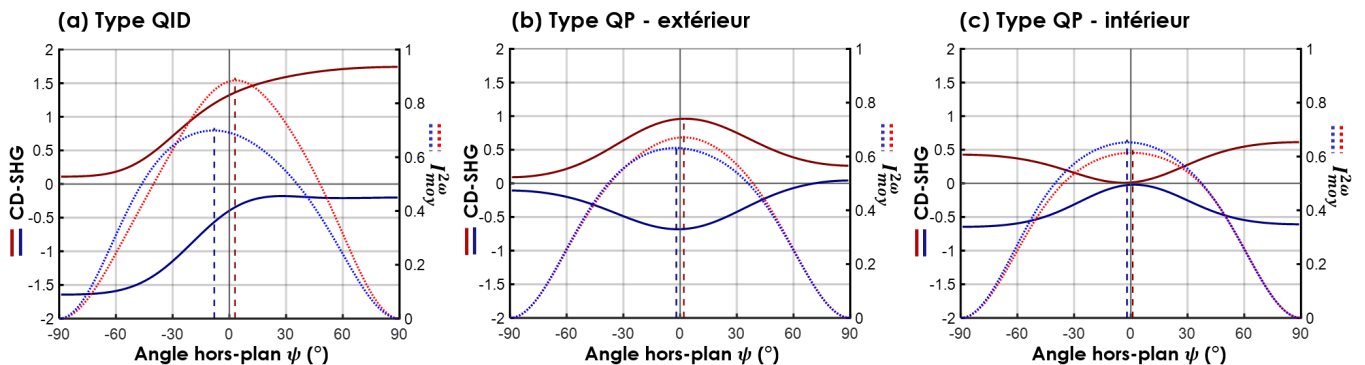


Figure V.23 – Simulations du CD-SHG (trait plein) et de l'intensité SHG moyenne (pointillés) en fonction de l'angle hors plan ψ , dans six cas théoriques différents : (a) Cas QID, positif et négatif, (b) Cas QP extérieur, positif et négatif, et (c) Cas QP intérieur, positif et négatif. Les composantes tensorielles achirales valent : $\chi_{xxx}^{eee} = 1, \chi_{xyy}^{eee} = \frac{1}{1.36}, \chi_{yyx}^{eee} = \frac{0.5}{1.36}, \chi_{yzz}^{mee} = \chi_{yzx}^{eem} = \chi_{yxz}^{eem} = \chi_{xyz}^{eem} = \frac{1}{15}e^{i\frac{\pi}{2}}$. Les composantes chirales varient d'une courbe à l'autre et sont données dans le tableau V.7.

	QID p.	QID n.	QP e.p.	QP e.n.	QP i.p.	QP i.n.
χ_{yzz}^{eee}	$\frac{1}{10}e^{i\frac{\pi}{2}}$	$\frac{1}{10}e^{i\frac{\pi}{2}}$	$\frac{1}{10}e^{i\frac{5\pi}{180}}$	$\frac{1}{10}e^{i\frac{5\pi}{180}}$	$\frac{1}{10}e^{i\frac{5\pi}{180}}$	$\frac{1}{10}e^{i\frac{5\pi}{180}}$
χ_{xxx}^{mee}	$\frac{1}{5}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{5}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{5}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{5}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{5}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{5}e^{i\frac{5\pi}{12}}$
$\chi_{xyy}^{mee} = \chi_{yxy}^{mee}$	$\frac{1}{6.8}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{6.8}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{6.8}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{27.2}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{27.2}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{6.8}e^{i\frac{5\pi}{12}}$
χ_{xxx}^{eem}	$\frac{1}{5.5}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{50}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{5}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{50}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{10}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{12.5}e^{i\frac{5\pi}{12}}$
$\chi_{xyy}^{eem} = \chi_{yxy}^{eem} = \chi_{yyx}^{eem}$	$\frac{1}{7.48}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{68}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{13.6}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{136}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{27.2}e^{i\frac{5\pi}{12}}$	$\frac{1}{34}e^{i\frac{5\pi}{12}}$

Tableau V.7 – Valeurs des composantes chirales des tenseurs de susceptibilité, utilisées pour la figure V.23. n. négatif, p. positif, e. extérieur (Fig. V.23 (b)) et i. intérieur (Fig. V.23 (c)).

4.2.2 Contrainte d'anti-corrélation avec $I_{moy}^{2\omega}$

Pour contrôler l'anti-corrélation du signal de CD-SHG avec l'intensité SHG moyenne, nous traçons simultanément la courbe de CD-SHG (en trait plein) et la courbe de $I_{moy}^{2\omega}$ (en pointillés, de la même couleur que le CD-SHG correspondant) obtenues dans chaque cas (Fig. V.23). Les maxima d'intensité SHG moyenne sont repérés par une ligne verticale en tirets. Cela permet d'éliminer directement les courbes de type QID : en effet, du fait de leur décalage important pour respecter la contrainte d'inversion, elles donnent des valeurs de CD-SHG fortes au maximum d'intensité SHG moyenne.

Quant aux courbes de type QP, elles peuvent présenter une courbure positive (la "cloche" vers le haut) ou une courbure négative (la "cloche" vers le bas). On constate que dans tous les cas présentés en figure V.23 (b-c), cette cloche se forme pour des ψ correspondant aux valeurs maximales de l'intensité SHG moyenne. De ce fait, la contrainte d'anti-corrélation n'est pas respectée dans les cas où la "cloche" est vers l'extérieur (Fig. V.23 (b), avec la courbe QP de courbure positive donnant des valeurs de CD-SHG positives et la courbe QP de courbure négative donnant des valeurs de CD-SHG négatives). En revanche, lorsque la "cloche" est orienté vers l'intérieur, c'est-à-dire vers l'axe où le CD-SHG s'annule, comme représentée en figure V.23 (c), nous obtenons bien un minimum de signal de CD-SHG lorsque l'intensité SHG moyenne est maximale.

Une courbe de type QP avec sa "cloche" orientée vers l'intérieur et proche de l'axe d'annulation du CD-SHG semble donc **la seule courbe capable de respecter toutes les propriétés du CD-SHG obtenues expérimentalement**, à condition qu'au sein d'une image, des courbes QP positives coexistent avec des courbes QP négatives (plus précisément, les pixels dont le signal de CD-SHG suit une courbe positive doivent être présents en quantité équivalente aux pixels dont le CD-SHG suit une courbe négative).

On rappelle qu'ici, l'objet de notre quête est le type exact des courbes qui représentent l'évolution du CD-SHG en fonction de l'angle hors-plan ψ . Dans cette section, nous avons convergé vers un type précis de courbes, par élimination successives des autres types au vu de nos résultats expérimentaux déjà obtenus sur le CD-SHG. Une autre approche est de tenter de reconstruire point par point la courbe de CD-SHG, en imageant puis calculant le CD-SHG d'un échantillon incliné, pour différentes inclinaisons. Nous avons effectué ces tests expérimentaux en espérant valider le type de courbes conjecturé au terme de cette section, et présentons les résultats en section suivante.

4.3 Expériences sur échantillons inclinés

4.3.1 Mise en place et difficultés des expériences

Une première idée pour suivre l'évolution du signal de CD-SHG en fonction de l'angle hors-plan a été de tendre des fibres extraites de tendon de queue de rat sur un capillaire fin, de façon à imposer au tendon des angles hors-plan opposés de part et d'autre du capillaire (ce montage expérimental est visible sur la photo V.24). Mais si le CD-SHG peut évoluer différemment en fonction de l'angle

hors-plan ψ d'un point à l'autre du tissu, nous ne pouvons pas être sûrs que la variation de signal de CD-SHG observée de part et d'autre du capillaire est due à la variation de ψ plutôt qu'à la variabilité inter-pixel. On comprend donc que pour suivre l'évolution du CD-SHG en fonction de ψ , il faut pouvoir suivre les mêmes points exactement de l'échantillon, c'est-à-dire imager la même zone à différentes inclinaisons de l'échantillon pour regarder la variation du signal de CD-SHG sur les mêmes pixels.

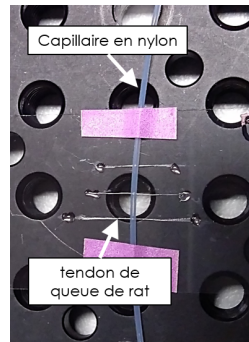


Figure V.24 – Lamelle préparée pour les expériences de CD-SHG sur capillaire.

Nous utilisons pour cela deux coupes transverses de cornées UWE, ainsi qu'un échantillon de tendon, présentés en section 2.2.1. Différentes inclinaisons peuvent être imposées par des vis micrométriques faisant pivoter la platine du support d'échantillon autour de l'axe Y du repère du laboratoire (la platine est alors inclinée suivant la direction X). Ces expériences donnent lieu à plusieurs difficultés :

- D'une inclinaison θ_i à l'autre, nous devons comparer exactement les mêmes volumes de tissus. Cela nécessite d'imager de nombreux plans à des profondeurs Z différentes pour avoir toutes les structures dans le plan focal, car incliner l'échantillon amène forcément certaines structures hors du plan d'imagerie. De ce fait, nous nous limiterons à de faibles inclinaisons, de l'ordre de 10° .
- Une même zone doit être imagée un grand nombre de fois : pour chaque inclinaison, plusieurs images sont prises à des profondeurs différentes, et pour chaque profondeur, l'accumulation de plusieurs images est nécessaire pour obtenir une image de CD-SHG fiable. Ce temps d'imagerie prolongé est néfaste pour la plupart de nos échantillons fins. Nous sommes alors obligés de limiter le nombre d'inclinaisons étudiées à 2 ou 3.
- L'angle hors-plan imposé aux structures de l'échantillon avec les différentes inclinaisons n'est pas exactement maîtrisable. En effet, l'angle θ_i imposé à la platine par les vis micrométriques peut être connu assez précisément, mais il n'est pas directement équivalent à l'angle hors-plan supplémentaire, $\Delta\psi_i$, imposé aux structures : ce dernier dépend de l'orientation dans le plan des structures par rapport à l'axe d'inclinaison de la platine. On place donc l'échantillon de façon à ce que les structures soient alignées au mieux avec l'axe X suivant lequel la platine est inclinée. Dans ce cas, $\Delta\psi_i$ correspond bien en valeur absolue à l'angle imposée à la platine, cependant nous ne connaissons pas son signe, qui dépend de la polarité dans le plan de la fibrille¹¹. Une explication de ceci est donnée en figure V.25, où l'angle imposé relève le côté $X > 0$ de la platine : une fibrille de polarité pointant vers les $X > 0$ aura un $\Delta\psi_i = \theta_i > 0$ lorsqu'une fibrille pointant vers les $X < 0$ aura un $\Delta\psi_i = -\theta_i < 0$.
- Enfin, nous ne connaissons pas la distribution initiale d'angle hors-plan dans nos échantillons, c'est-à-dire les angles hors-plan des structures lorsque l'échantillon est à plat (notés ψ_0).

Les deux premières difficultés font qu'il n'est pas possible de reconstruire la courbe de CD-SHG en fonction de ψ point par point sur un pixel, car nous ne pouvons pas faire assez de mesures. Il faut donc changer de stratégie : au lieu de regarder comment le CD-SHG varie sur un seul pixel selon beaucoup d'inclinaisons $\Delta\psi_i$ différentes (stratégie 1), nous pouvons regarder comment le CD-SHG varie

11. Et nous ne connaissons pas la polarité dans le plan de la fibrille, même en couplant nos expériences avec de la P-SHG, qui donne seulement l'**orientation** (non-directionnelle) dans le plan !

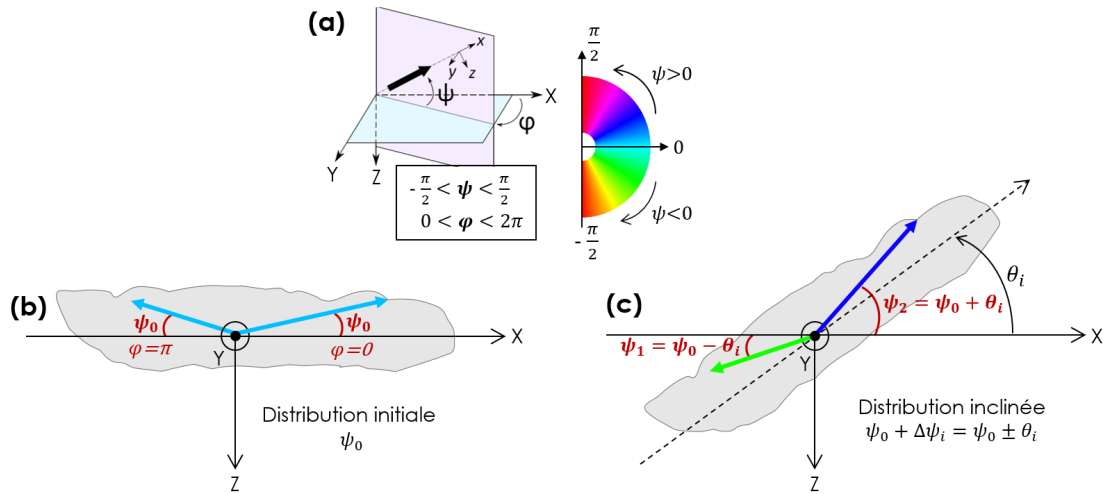


Figure V.25 – Effet de l'inclinaison de la platine de θ_i sur deux fibrilles de l'échantillon qui ont environ le même angle hors-plan initial ψ_0 mais ont des polarités dans le plan opposées. (a) Rappel des conventions angulaires. (b) Distribution angulaire initiale. (c) Distribution angulaire après inclinaison : l'angle hors-plan de la fibrille polarisée vers les $X > 0$ devient $\psi_0 + \theta_i$, tandis que l'angle hors-plan de la fibrille polarisée vers les $X < 0$ devient $\psi_0 - \theta_i$.

indépendamment sur une multitude de pixels (il y a beaucoup de pixels sur une seule image!), qui ont chacun des angles hors-plan initiaux différents, selon seulement une ou deux inclinaisons (stratégie 2). Ces deux stratégies sont illustrée en figure V.26.

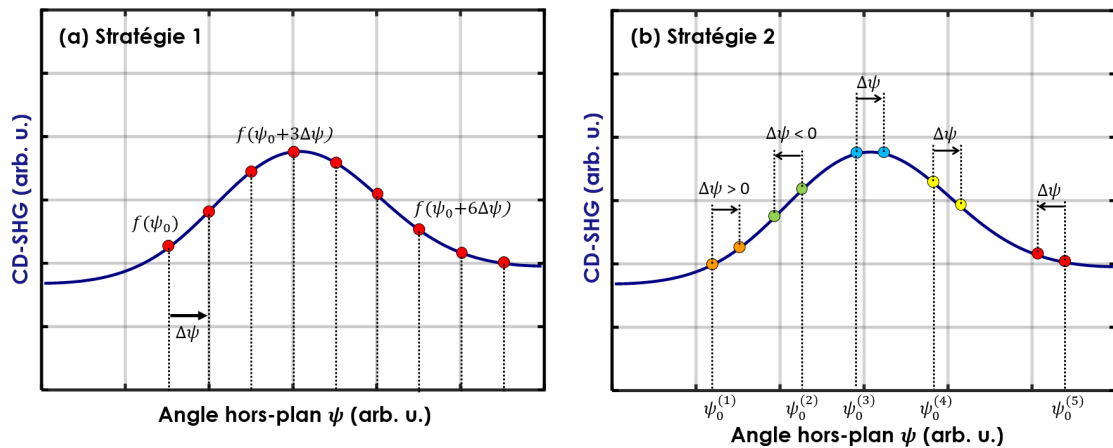


Figure V.26 – Deux façons de reconstruire une courbe à partir d'expérience sur échantillon incliné : (a) Reconstruction à partir d'un pixel et plusieurs inclinaisons $\Delta\psi_i = i\Delta\psi$. (b) Reconstruction à partir de plusieurs pixels (chacun représenté par une couleur différente) et une seule inclinaison $\Delta\psi$.

Malgré cette nouvelle stratégie, les deux dernières difficultés montrent que l'analyse des données va être critique : il faut réussir à tirer des informations en comparant des images de CD-SHG, correspondant à des distributions distinctes d'angle hors-plan ψ inconnues, dont les $\Delta\psi$ séparant 2 distributions peuvent être aussi bien positifs que négatifs. Tout cela en se rappelant que les courbes de CD-SHG en fonction de ψ sont potentiellement différentes d'un pixel à l'autre, et ne sont *a priori* pas injectives. À l'attaque!

4.3.2 Analyse des résultats

Plusieurs expériences ont été effectuées avec de très faibles inclinaisons, de l'ordre de 1 à 2°, sans qu'il soit alors possible de discriminer la variation de signal de CD-SHG du bruit. Une deuxième série d'expériences a ensuite été conduite en mesurant les échantillons d'abord sans inclinaison (image à plat) puis avec une inclinaison de 10°, sur 3 échantillons indépendants (1 expérience sur tendon de queue de rat, 1 sur une première cornée UWE, et 4 sur une deuxième cornée UWE).

La première étape d'analyse est le recalage des images de CD-SHG, pour que les mêmes pixels sur les deux images de l'échantillon correspondent bien aux mêmes volumes de tissu. Pour cela nous utilisons le plugin d'ImageJ *StackReg* [176] pour recalibrer les images en intensité SHG, avant de calculer le CD-SHG. Nous binons ensuite nos images de CD-SHG pour être moins sensibles en cas de léger décalage de quelques pixels (et augmenter en prime le rapport signal à bruit). Ce binning doit rester faible pour ne pas moyenniser trop de signaux de CD-SHG. Nous fixons la taille maximale de binning entre 300 et 400 nm, ce qui correspond à moyenniser 3 x 3 pixels pour former ce que nous appellerons par la suite **un carreau**.

Nous étudions ensuite la variation du signal de CD-SHG, carreau par carreau, en soustrayant l'image inclinée et l'image à plat, bien recalées. Notons plus simplement $CD_k(\psi)$ le signal de CD-SHG en fonction de l'angle hors-plan des structures contenues dans un seul carreau k , et $\psi_0^{(k)}$ leur angle hors-plan initial (dans l'image à plat). Nous connaissons les valeurs du CD-SHG dans ce carreau pour deux inclinaisons différentes, et pouvons donc calculer leur différence :

$$\Delta CD\text{-SHG} = CD_k(\psi_0^{(k)} + \Delta\psi_i) - CD_k(\psi_0^{(k)}) \approx CD'_k(\psi_0^{(k)}) * \Delta\psi_i, \quad (\text{V.22})$$

où $\Delta\psi_i \approx \pm 10^\circ$ selon la polarité dans le plan des structures du carreau k , et où $CD'_k(\psi_0^{(k)})$ est la dérivée de CD_k en $\psi_0^{(k)}$. Malheureusement, nous ne connaissons ni $\psi_0^{(k)}$ ni le signe de $\Delta\psi_i$, mais en prenant la valeur absolue de cette variation, nous obtenons tout de même une information importante : la valeur absolue de la pente $|CD'_k(\psi_0^{(k)})|$ avec laquelle la courbe CD_k atteint la valeur $CD_k(\psi_0^{(k)})$ de CD-SHG. Toutefois, si la fonction CD_k est différente pour chaque carreau, nous n'obtenons qu'une seule information sur chaque courbe, et ne pouvons pas conclure grand chose...

Pour aller plus loin, simplifions le problème en imaginant que seulement deux courbes de CD-SHG interviennent dans une image, une complètement positive CD_{pos} et une complètement négative CD_{neg} ¹². Tous les carreaux avec un signal de CD-SHG positif nous donnent alors des informations sur CD_{pos} , et tous les carreaux avec un signal de CD-SHG négatif nous renseignent sur CD_{neg} . Grâce au nombre important de carreaux dans l'image, une large gamme d'angles hors-plan ψ_0 (dans l'image initiale de l'échantillon non incliné) est atteinte, et nous pouvons finalement calculer la valeur absolue des pentes des deux courbes pour la quasi-totalité des valeurs de CD-SHG possibles (valeurs positives pour CD_{pos} , et négatives pour CD_{neg}).

Pour représenter les résultats, nous traçons $|\Delta CD\text{-SHG}| = 10|CD'(\psi_0)|$ en fonction des valeurs de CD-SHG initiales $CD(\psi_0)$ échantillonnées en 100 classes entre -1 et 1¹³. Le $|\Delta CD\text{-SHG}|$ tracé est en fait la moyenne des valeurs absolues des variations sur tous les carreaux d'une même classe (nous considérons que deux carreaux appartiennent à la même classe s'ils ont le même signal de CD-SHG initial, *ie* sur l'image à plat). Ces résultats sont visibles sur la figure V.27 (a) : les points correspondant à CD_{neg} sont en bleu et les points correspondant à CD_{pos} en rouge, pour respecter le code couleur utilisé sur les images de CD-SHG.

Nous voyons sur la figure V.27 (a) que, d'un type d'échantillon à l'autre, $|\Delta CD\text{-SHG}|$ peut prendre des valeurs très différentes, très fortes dans le tendon et très faibles pour la cornée UWE #2. En revanche pour chaque échantillon, les courbes CD_{pos} et CD_{neg} présentent des valeurs absolues de variations de CD-SHG similaires et dont le comportement est reproductible sur l'ensemble des expériences : en valeur absolue, la pente de CD-SHG est minimale pour des valeurs de CD-SHG proches

12. C'est une simplification drastique : nous reviendrons sur ce point plus tard.

13. Les signaux au delà de 1 en valeur absolue correspondent essentiellement à du bruit sur nos échantillons de cornées et de tendon.

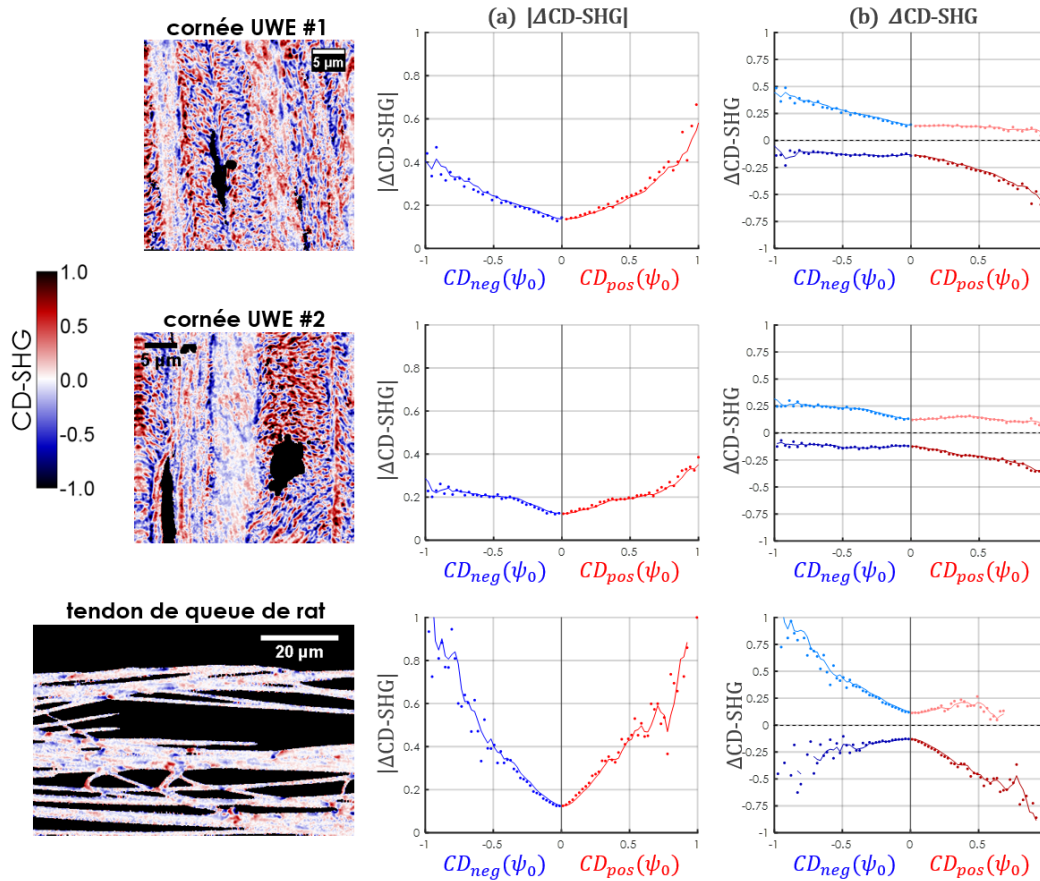


Figure V.27 – Expériences de CD-SHG avec une inclinaison de 10° de l'échantillon, sur 3 types d'échantillons. À gauche, images de CD-SHG à plat de l'échantillon concerné. (a) Valeur absolue de la variation de CD-SHG donnée par l'équation V.22, en fonction de la valeur de CD-SHG dans l'image à plat. Chaque point correspond à la moyenne sur tous les carreaux de la même classe. (b) Variations de CD-SHG positives (couleurs claires) et négatives (couleurs foncées), en fonction de la valeur de CD-SHG dans l'image à plat. Chaque point est la moyenne sur tous les carreaux de la même classe présentant une variation de même signe. Une moyenne glissante (trait plein) est effectuée sur chaque nuage de points, avec une fenêtre de 3 points.

de zéro et augmente pour des valeurs absolues de CD-SHG plus importantes. Cela correspond à un aplatissement de la courbe de CD-SHG au niveau des valeurs faibles de CD-SHG, autrement dit, les endroits "aplatis" de la courbe doivent être proches de l'axe d'annulation du CD-SHG. Ce résultat est cohérent avec les trois types de courbes présentés en figure V.23, donc en particulier n'entre pas en contradiction avec la courbe de type QP, orientée vers l'intérieur, sélectionnée à l'issue de la section précédente 4.2.

Revenons un instant sur notre méthode d'analyse : les points représentés en figure V.27 (a) ont pour coordonnées $(\text{CD}(\psi_0), \langle |\text{CD}'(\psi_0)| \rangle \Delta\psi)$, où $\langle |\text{CD}'(\psi_0)| \rangle$ est la moyenne des valeurs absolues des pentes calculées sur tous les carreaux d'une même classe, c'est à dire des carreaux k et j tels que $\text{CD}(\psi_0^k) = \text{CD}(\psi_0^j)$. Toutefois l'appartenance à la même classe est basée sur les valeurs de CD-SHG, et ne garantit pas l'égalité des angles hors-plan initiaux $\psi_0^k = \psi_0^j$! Et comme la courbe CD n'est *a priori* pas injective, il se peut que deux carreaux présentent la même valeur de CD-SHG initiale, et appartiennent donc à la même classe, mais contiennent des structures d'angles hors-plan différents. Un exemple de ce problème est visible en figure V.28 : deux carreaux d'angles hors-plan initiaux $\psi_0^{(1)} \neq \psi_0^{(2)}$ ont pourtant le même signal de CD-SHG initial, et les valeurs absolues de leurs pentes seront donc moyennées. C'est là la limite de notre méthode : on ne peut séparer le traitement de ces deux carreaux et nous moyennons des valeurs absolues de pentes à des ψ_0 différents. Toutefois, on remarque également que si la courbe est "assez" paire, les pentes pour un même signal de CD-SHG

sont quasi identiques (au signe près), ce qui rend alors notre analyse acceptable.

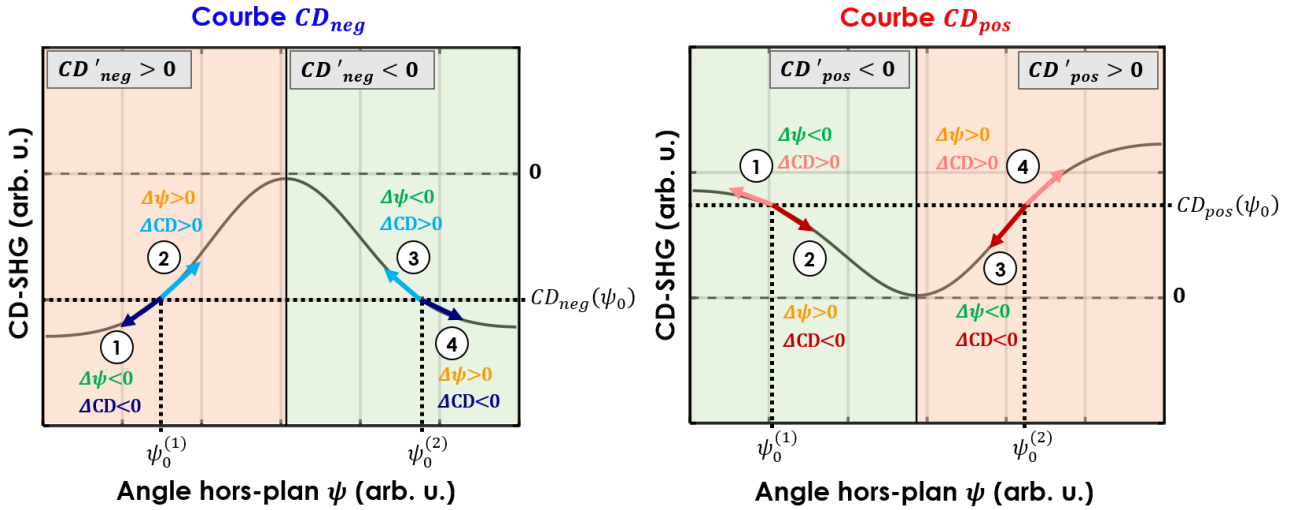


Figure V.28 – Courbes de type QP intérieure négative (à gauche) et de type QP intérieure positive (à droite), représentant le signal de CD-SHG en fonction de l'angle hors-plan ψ . Quatre pentes différentes peuvent correspondre à une même valeur non nulle de CD-SHG.

Une information supplémentaire peut être extraite de nos expériences. En effet, jusqu'à présent, nous ne nous sommes intéressé·e-s qu'à la valeur absolue de $\Delta\text{CD-SHG}$, puisque nous ne connaissons pas le signe de $\Delta\psi_i$ qui intervient dans son expression. Mais expérimentalement, nous mesurons bien les variations $\Delta\text{CD-SHG}$ avec leur signe, que nous pouvons alors exploiter. Si l'on s'intéresse aux signes de ces variations, quatre cas de figure peuvent se produire, représentés en figure V.28. Dans l'exemple d'une courbe QP négative CD_{neg} (le raisonnement est le même pour une courbe QP positive CD_{pos}), nous avons :

1. $\Delta\text{CD-SHG} < 0$, car la pente $CD'_{neg}(\psi_0^{(1)})$ est positive mais $\Delta\psi$ est négatif.
2. $\Delta\text{CD-SHG} > 0$, car la pente $CD'_{neg}(\psi_0^{(1)})$ et $\Delta\psi$ sont positifs.
3. $\Delta\text{CD-SHG} > 0$, car la pente $CD'_{neg}(\psi_0^{(2)})$ et $\Delta\psi$ sont négatifs.
4. $\Delta\text{CD-SHG} < 0$, car la pente $CD'_{neg}(\psi_0^{(2)})$ est négative mais $\Delta\psi$ est positif.

Lorsque l'on s'intéresse uniquement à $|\Delta\text{CD-SHG}|$ (Fig. V.27(a)), nous moyennons la pente de tous ces cas de figure, alors qu'en conservant le signe de $\Delta\text{CD-SHG}$, nous pouvons séparer les cas 1 et 4 des cas 2 et 3. Ces résultats sont représentés en figure V.27 (b) : pour chaque courbe CD_{pos} et CD_{neg} , nous avons tracé séparément les variations positives (couleurs claires) des variations négatives (couleurs foncées). On constate que si les variations négatives et positives sont similaires pour des petites valeurs de CD-SHG, une asymétrie s'installe pour des plus grandes valeurs de CD-SHG : les variations de CD-SHG positives sont plus fortes que les variations négatives pour CD_{neg} alors que CD_{pos} présente des variations négatives plus fortes que les positives. Autrement dit, nos résultats expérimentaux indiquent que pour les deux courbes, les cas 2 et 3 présentent des pentes plus importantes que les cas 1 et 4 (pour des valeurs de CD-SHG relativement fortes). Cette asymétrie est cohérente avec des courbes négative et positive de type QP intérieures que l'on visualise sur les schémas de la figure V.28. En effet, les cas de figure 1 et 4 correspondent tous deux à un $\Delta\psi$ orienté vers le "pied" de la courbe, c'est-à-dire dans une direction où la pente diminue. Au contraire, les cas de figure 2 et 3 correspondent à un $\Delta\psi$ orienté vers la "cloche" de la courbe, avec une pente plus grande. L'asymétrie trouvée entre les variations positives et les variations négatives du signal de CD-SHG confirme donc l'existence d'un point d'inflexion et d'un changement de concavité pour des grandes valeurs de CD-SHG (un aplatissement convexe pour CD_{neg} et concave pour CD_{pos}). Toutefois, cette propriété géométrique se retrouve aussi bien sur les courbes de type QP que sur les courbes de type QID.

En conclusion, nos expériences sur échantillons inclinés sont en cohérence avec le type de courbes conjecturé au terme de la section 4.2, au sens où elles sont compatibles avec des courbes de type QP intérieures, avec une "cloche" proche de l'axe d'annulation du CD-SHG, mais ne permettent pas d'exclure complètement le type QID. De plus, ces expériences se sont révélées très délicates, et les tendances obtenues sur $\Delta\text{CD-SHG}$ sont parfois assez faibles et difficilement discernable du bruit. Notre analyse est également imparfaite car, puisque nous ne connaissons pas le signe du $\Delta\psi$ imposé aux structures, nous ne pouvons pas séparer tous les cas de figure et nous moyennons des pentes sur des structures qui sont potentiellement à des angles hors-plan différents. Une idée pour contourner ce problème serait de coupler nos expériences de CD-SHG à des expériences d'interférométrie en SHG (I-SHG, présentée dans l'encadré II.2 du chapitre II et dans l'annexe B). L'I-SHG donne en effet la polarité des structures dans le plan de l'image, et permettrait donc de filtrer les carreaux selon le signe de $\Delta\psi$! Des premières tentatives ont été effectuées sur des cornées EFS, imagées en CD-SHG au LOB et en I-SHG chez nos collaborateurs à l'INRS Varennes (Montréal, Canada), démontrant qu'une telle corrélation est effectivement possible. Mais pour l'instant, les deux systèmes ont des résolutions axiales trop différentes (1.2 μm pour le système de CD-SHG contre 4 μm pour le système d'I-SHG) pour considérer exactement les mêmes structures. Un exemple des premiers essais de corrélation est donné en figure V.29.

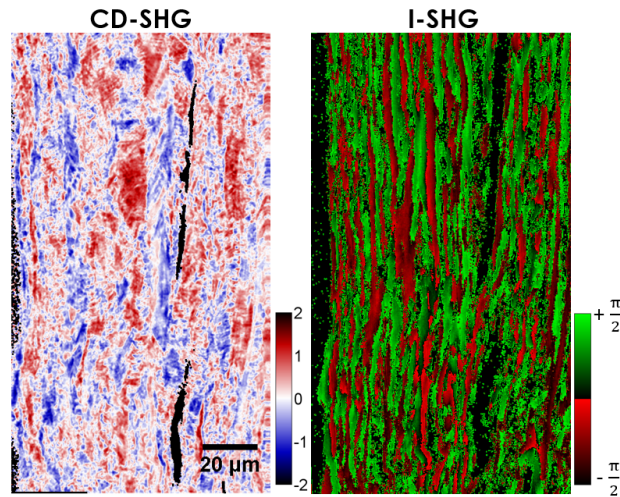


Figure V.29 – Images recalées d'une cornée EFS, en CD-SHG (à gauche) et en I-SHG (à droite). L'image de I-SHG donne la polarité dans le plan du collagène. Les structures sondées ne sont pas exactement les mêmes dans les deux images, du fait de la différence de résolution axiale entre les deux systèmes d'imagerie.

Une dernière remarque peut également être soulevée quant à l'interprétation de nos données. Pour faciliter l'étude, nous avons considéré qu'une seule courbe CD_{neg} (resp. CD_{pos}) expliquait les valeurs de CD-SHG négatives (resp. positives) : c'est une simplification un peu drastique qui néglige la variabilité inter-pixel des tenseurs de susceptibilité (ou plutôt qui considère que seulement deux cas de figure sont possibles pour ces tenseurs, l'un aboutissant à CD_{neg} , l'autre à CD_{pos}). La réalité est sans doute plus compliquée et une multitude de courbes CD_{neg} ou CD_{pos} peuvent cohabiter, ce qui peut donc légèrement fausser le calcul des pentes des courbes (en pratique, cela diminue le contraste de $\Delta\text{CD-SHG}$, bruyant encore plus les tendances).

5 Discussion et conclusion sur le CD-SHG

Notre étude du dichroïsme circulaire en microscopie SHG (CD-SHG) se voulait tout d'abord dans la continuité des études trouvées dans la littérature actuelle mais a fini par remettre en cause l'approche standard pour proposer un nouveau cadre d'interprétation du CD-SHG. Les différentes étapes de ce chemin sinueux sont résumées et discutées dans la suite.

5.1 Récapitulation et analyse des étapes de travail

Nous avons commencé par dériver l'expression analytique du CD-SHG selon l'approche utilisée dans la littérature récente : l'approximation dipolaire électrique (ADE). Selon cette approche, deux conditions sont nécessaires pour obtenir un signal de CD-SHG non nul. Tout d'abord, le signal est théoriquement proportionnel à $\sin \psi$, où ψ est l'angle désignant l'orientation des fibrilles de collagène hors du plan d'imagerie. Il faut donc que ces fibrilles soient hors-plan pour être détectées en CD-SHG, et le signal de CD-SHG est d'autant plus fort que leur angle hors-plan est important. De plus, le signe du signal de CD-SHG correspond à la **polarité** hors-plan des fibrilles. Cette première condition est donc très intéressante car elle donne une information précise et quantifiable sur la structure 3D de l'échantillon étudié, l'angle orienté hors-plan entre $-\frac{\pi}{2}$ et $\frac{\pi}{2}$, qui n'est pas directement accessible avec d'autres techniques de SHG. La deuxième condition théorique pour obtenir du CD-SHG non nul est le déphasage entre les composantes chirales et achirales du tenseur de susceptibilité non-linéaire χ^{eee} (si l'on considère toutes les composantes achirales réelles, il faut alors que la partie imaginaire de χ_{yzx}^{eee} soit non nulle). Cette différence de phase nécessaire est en fait assez surprenante. En effet, la partie imaginaire du tenseur de susceptibilité χ^{eee} traduit l'absorption du milieu, ayant lieu à proximité des résonances du milieu. Toutefois l'absorption induite lors de telles résonances devraient ajouter une partie imaginaire à la fois aux composantes chirales **et** achirales du tenseur de susceptibilité. La partie imaginaire spécifiquement ajoutée aux composantes chirales est donc parfois interprétée dans la littérature comme la prise en compte des contributions magnétiques, un dipôle magnétique étant effectivement déphasé de $\frac{\pi}{2}$ par rapport à un dipôle électrique.

Différentes expériences de type *Up-Down* ont été conduites pour valider l'utilisation de l'ADE lors de la dérivation du signal de CD-SHG. Sur un cristal de $LiIO_3$, même si les tendances observées sont faibles, les résultats ne sont pas en contradiction avec l'ADE. Cela peut se comprendre en s'intéressant au type de chiralité du cristal : le $LiIO_3$ ne présentant pas de centre chiral asymétrique, sa chiralité est décrite par le modèle de Kuhn qui lie l'activité optique à un couplage excitonique (modèle des oscillateurs couplés). Le CD-SHG issu de ce type de structure est donc principalement d'origine dipolaire électrique [156]. En revanche, les expériences menées sur des tissus collagéniques, pour lesquels l'origine du CD-SHG est moins claire et fait également intervenir le modèle de Kauzmann, ont abouti à des résultats en désaccord avec l'ADE : le signal de CD-SHG mesuré ne change pas de signe avec $\sin \psi$. Cela nous a obligé à dériver une nouvelle expression analytique pour le CD-SHG, prenant cette fois en compte les contributions magnétiques à l'aide de nouveaux tenseurs de susceptibilité non-linéaire non locaux, χ^{mee} et χ^{em} , ce qui n'avait encore jamais été fait dans la littérature en microscopie SHG sur tissus biologiques. La nouvelle expression du CD-SHG, ainsi que des simulations numériques, ont été présentés en section 3 de ce chapitre, avant d'être comparés en section 4 à nos résultats expérimentaux.

Essayons de tirer quelques conclusions sur l'ensemble des éléments présentés dans ces deux dernières sections. Les calculs analytiques prenant en compte les contributions dipolaires magnétiques à la réponse de second harmonique ont permis de caractériser chaque contribution au signal de CD-SHG : c'est toujours un produit de composantes tensorielles achirales par des composantes chirales déphasées de $\frac{\pi}{2}$. Nos simulations numériques donnent de nombreux comportements possibles du CD-SHG en fonction de l'angle hors-plan ψ , aux propriétés mathématiques variées (nous voyons en particulier que la fonction reliant le CD-SHG à cet angle hors-plan n'est plus forcément impaire et bijective). Ces multiples comportements dépendent avant tout des valeurs des composantes tensorielles utilisées pour les tenseurs locaux et non locaux. Comme nous n'avons pas accès à des mesures précises de ces valeurs pour des tissus de collagène fibrillaire, nous ne pouvons pas connaître *a priori* la courbe exacte suivie par le CD-SHG en fonction de ψ . Nous avons alors adopté une nouvelle approche, en restreignant au maximum les formes de courbes autorisées au vu de nos résultats expérimentaux sur le CD-SHG. Les expériences déjà effectuées imposaient en effet trois contraintes : une distribution symétrique des valeurs de CD-SHG, aussi bien positive que négative à l'échelle d'une image, une non-inversion du signe du CD-SHG pour un même pixel lorsque l'angle ψ s'inverse, et des valeurs faibles de CD-SHG au maximum d'intensité SHG moyenne. Après confrontation des propriétés des courbes théoriques

possibles à ces contraintes révélées expérimentalement, nous avons abouti aux conclusions suivantes :

- les tenseurs de susceptibilité peuvent varier d'un pixel à l'autre et de ce fait le CD-SHG ne se comporte pas de la même façon en fonction de ψ pour tous les pixels d'une même image. Autrement dit, plusieurs courbes différentes interviennent pour expliquer le signal de CD-SHG au sein d'un même tissu.
- les courbes qui interviennent doivent être de type QP intérieur, de courbure négative si elles prennent des valeurs positives ou de courbure positive si elles prennent des valeurs négatives (c'est-à-dire orientées vers l'intérieur), avec le sommet de leur "cloche" proche de l'axe d'annulation du CD-SHG.

Des expériences supplémentaires sur échantillons inclinés ont également été conduites pour tenter de reconstruire expérimentalement *par morceaux* la courbe de CD-SHG. Finalement, principalement à cause de la variabilité inter-pixel des tenseurs de susceptibilité et parce que nous ne pouvions faire qu'un nombre limité de mesures sur nos échantillons fragiles, ces expériences n'ont pas apporté d'informations supplémentaires. Les résultats obtenus n'entrent toutefois pas en contradiction avec le type de courbes QP sélectionné, qui respecte les 3 contraintes sus-mentionnées.

Pour limiter l'étendue des situations possibles lors de nos simulations, nous avons laissé fixes les composantes achirales de tous les tenseurs (les valeurs sont données en légende de la figure V.23), et imposé un fort déphasage entre les composantes tensorielles locales d'une part (toutes quasi-réelles) et les composantes non locales d'autre part (toutes quasi-imaginaires pures). Ainsi, le déphasage entre les composantes magnétiques et électriques est proche de la théorie, et des phases semblables sont données à toutes les composantes électriques d'une part et toutes les composantes magnétiques d'autre part : il n'y a plus de déphasage inexplicé entre les composantes d'un même tenseur. Dans notre cas, nous trouvons une courbe de type QP intérieur positive avec des composantes chirales non locales χ_{xxx}^{mee} et χ_{xxx}^{eem} assez fortes (respectivement deux fois plus grande et du même ordre de grandeur que la composante chirale électrique χ_{yzz}^{eee} , et 3 fois plus grandes que les autres composantes chirales non locales). Cela indique que les ordres de grandeur des contributions chirales magnétiques et électriques sont équivalents, rejoignant ce qui avait été mesuré sur du collagène en SHG de surface [75]. La courbe s'inverse et prend des valeurs négatives (type QP intérieur négatif) en ne faisant varier quasiment que le module des composantes chirales non locales $\chi_{xyy}^{mee} = \chi_{yxy}^{mee}$, augmentant le rapport entre elles et χ_{xxx}^{mee} d'un facteur 5 (voir tableau V.7).

5.2 Discussion : variabilité spatiale de la réponse SHG

Nos simulations illustrent un nombre limité de cas, certains éléments étant choisis fixes, et nous n'excluons pas que d'autres phases ou d'autres rapports de modules avec les composantes achirales puissent aboutir aux mêmes types de courbes. Mais de manière générale, il semble nécessaire que les rapports de grandeur entre les modules des composantes tensorielles varient d'un pixel à l'autre, afin que des courbes aussi bien négatives que positives cohabitent sur une image.

Arrêtons-nous un instant sur cette dernière remarque. Comment expliquer une telle variation des tenseurs de susceptibilité non-linéaire au sein d'un même tissu collagénique, entre deux volumes de tissu voisins¹⁴ ? Nous savons que dans le volume focal (environ 400 nm x 400 nm x 1200 nm) se trouvent plusieurs fibrilles de collagène, constituées par un certain agencement de triples hélices. Les fibrilles sont séparées physiquement les unes des autres par des protéoglycanes, et nous pouvons alors considérer qu'il n'y a pas d'interactions électroniques inter-fibrilles. La réponse de second harmonique de chaque fibrille est décrite par des tenseurs de susceptibilité non-linéaire (local et non locaux), $\chi_{fib}^{(2)}$, de symétrie cylindrique. Les tenseurs totaux $\chi_{tot}^{(2)}$ décrivant la réponse du volume focal s'obtiennent en sommant "brutalement" les tenseurs $\chi_{fib}^{(2)}$, exprimés dans un même repère, de chaque fibrille en présence. Pour nos calculs analytiques et nos simulations numériques, nous avons supposé que l'ensemble des fibrilles contenues dans le volume focal vérifiait encore une symétrie cylindrique, de façon à garder

14. Accrochez-vous.

le même nombre de termes dans les tenseurs totaux $\chi_{tot}^{(2)}$. Cette hypothèse signifie que toutes les fibrilles ont la même orientation 3D, mais n'exclut pas que des fibrilles puissent présenter des polarités opposées, c'est-à-dire puissent s'agencer de manière tête-bêche les unes par rapport aux autres. Le schéma V.30 illustre l'effet de l'agencement des fibrilles entre elles sur les composantes du tenseur local χ_{tot}^{eee} . Pour un nombre de fibrilles constant dans le volume focal (ce que l'on peut supposer dans des tissus denses), les composantes achirales ont un module maximal lorsque toutes les fibrilles ont des polarités identiques et s'annulent lorsque les fibrilles sont tête-bêche (50 % avec une polarité dans un sens et 50 % dans l'autre sens). En revanche, le module des composantes chirales ne dépend pas de l'agencement des fibrilles. Cela indique que si le pourcentage de fibrilles de polarité identique varie d'un pixel à l'autre, alors le module des composantes tensorielles, en particulier le rapport des composantes achirales/chirales, change aussi d'un pixel à l'autre. Expérimentalement, des zones où le rapport des composantes achirales/chirales changent au sein d'une même image ont été visualisées sur des membranes de collagène fibrillaire par des mesures de P-SHG (voir l'annexe C). Elles correspondent bien à des zones entre lesquelles le signal de CD-SHG varie de manière importante (il change même de signe).

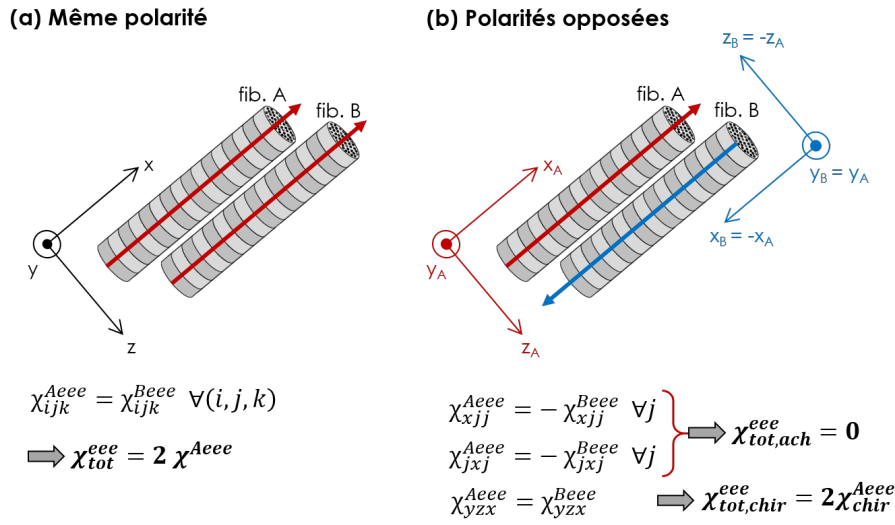


Figure V.30 – Effet de l'agencement des fibrilles entre elles sur les composantes du tenseur local χ_{tot}^{eee} , dans un cas simplifié où le volume focal ne contient que 2 fibrilles. (a) Les deux fibrilles ont la même polarité et le tenseur total χ_{tot}^{eee} est la simple somme des deux tenseurs χ_{fib}^{eee} . (b) Les fibrilles ont des polarités opposées. Le tenseur total χ_{tot}^{eee} est la somme des deux tenseurs χ_{fib}^{eee} exprimés dans le même repère de la fibrille A, ce qui conduit à l'annulation de ses composantes achirales mais pas de ses composantes chirales.

En pratique, on peut considérer que les composantes achirales locales sont prépondérantes sur les composantes achirales non locales (qui sont, elles, de l'ordre des composantes chirales locales et non locales) : la présence de polarités opposées au sein du volume focal joue donc surtout sur le module des composantes achirales locales. Dans le signal de CD-SHG, ces composantes achirales locales interviennent toujours en multipliant des composantes chirales déphasées, qui sont principalement dans notre cas les composantes chirales non locales. La variation des composantes achirales locales seules est donc équivalente à la variation des composantes chirales non locales seules, ce que nous avons effectivement fait dans nos simulations. Toutefois, il est impossible de simuler l'inversion (de positif à négatif) d'une courbe de type QP intérieur en faisant uniquement varier les modules de toutes les composantes chirales non locales *en bloc*, c'est-à-dire avec un facteur identique pour les modules de χ_{xxx}^{mee} , χ_{xyy}^{mee} , χ_{yxy}^{mee} , χ_{xxx}^{eem} , χ_{xyy}^{eem} , χ_{yxy}^{eem} et χ_{yyx}^{eem} . Comme mentionné plus haut, l'inversion est effectivement obtenue dans notre cas en changeant le rapport entre χ_{xxx}^{mee} et $\chi_{xyy}^{mee} = \chi_{yxy}^{mee}$. Ceci ne s'explique pas simplement par la variation du rapport achiral/chiral observée précédemment, et d'autres origines de variation des tenseurs de susceptibilité non-linéaire doivent être considérées.

Nous avons pour l'instant évoqué les seuls effets de l'agencement inter-fibrillaire dans le volume

focal, sur les tenseurs de susceptibilité non linéaire totaux. Pour cela, nous avons considéré que les tenseurs $\chi_{fib}^{(2)}$ étaient identiques pour chaque fibrille. Mais cela est peut-être une simplification, et $\chi_{fib}^{(2)}$ pourrait varier d'une fibrille à l'autre. En effet, chaque fibrille étant constituée d'un agencement *très dense* de triples hélices, les interactions électroniques entre triples hélices ne sont sans doute pas à négliger : le tenseur $\chi_{fib}^{(2)}$ n'est alors plus la simple somme des tenseurs $\chi_{TH}^{(2)}$ des triples hélices, et dépend de l'agencement intra-fibrillaire (ou nano-structuration). Cet agencement intra-fibrillaire est potentiellement différent d'une fibrille à l'autre, par exemple si les fibrilles sont hétérotypiques (présence de plusieurs types de collagène). Enfin, comme nous sommes sortis de l'approximation dipolaire électrique (en introduisant les tenseurs non locaux), le champ n'est pas vu de la même façon par toutes les triples hélices disposées sur une longueur d'onde, ce qui va avoir une influence supplémentaire sur $\chi_{fib}^{(2)}$, différente selon la nano-structuration. La sortie de l'ADE s'est faite en introduisant les tenseurs non locaux : ce sont donc eux qui, par définition, prennent en compte la non-localité du champ. Ainsi, χ_{fib}^{mee} et χ_{fib}^{em} seraient plus sensibles à l'environnement électronique, et présenteraient davantage de variations que χ_{fib}^{eee} . En résumé, en fonction des fibrilles présentes dans le volume focal et en fonction de leur nano-structuration, les tenseurs totaux $\chi_{tot}^{(2)}$ calculés en sommant les tenseurs $\chi_{fib}^{(2)}$, variables, pourraient changer. Dans ce cas, les composantes tensorielles peuvent toutes varier indépendamment (en particulier χ_{xxx} par rapport à χ_{xyy} , χ_{yxy} ou χ_{yyx}).

Finalement, deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer la variation des tenseurs de susceptibilité non-linéaire. Tout d'abord, des fibrilles de polarité opposées sont présentes au sein du volume focal, influant sur le rapport des composantes tensorielles achirales/chirales. De plus, l'environnement électronique lié à l'agencement intra-fibrillaire peut modifier les tenseurs $\chi_{fib}^{(2)}$ de chaque fibrille, avec une influence principalement sur les composantes des tenseurs non locaux. En ce qui concerne l'agencement des fibrilles au sein du volume focal, nous pouvons pousser le raisonnement un pas plus loin. En effet, nous avons pour l'instant supposé que l'ensemble des fibrilles contenues dans le volume focal vérifiait encore une symétrie cylindrique, mais s'il y a du désordre dans le volume focal, ou si le volume focal contient des interfaces entre des domaines d'orientations différentes (interface entre deux lamelles dans la cornée ou intersection de fibres dans le tendon par exemple), cette symétrie cylindrique n'est plus respectée. Les tenseurs $\chi_{fib}^{(2)}$ ont des orientations différentes et leur somme dans un même repère pour calculer les tenseurs totaux $\chi_{tot}^{(2)}$ va alors rajouter des composantes qui s'annuleraient auparavant avec la symétrie cylindrique. Les signaux de CD-SHG devraient être fortement affectés à ces endroits, définis par un agencement spécifique des fibrilles au sein du volume focal. Des simulations numériques sont en cours pour analyser le signal de CD-SHG avec d'autres symétries de tenseurs, et également lors de focalisation sur des interfaces.

5.3 Discussion : origine du CD-SHG et pertinence en imagerie

Nous pouvons désormais nous demander : est-ce que ces variations de tenseurs d'un pixel à l'autre expliqueraient à elles-seules les contradictions expérimentales observées dans l'ADE, sans qu'il soit nécessaire d'avoir recours à la prise en compte des contributions magnétiques¹⁵ ? En effet, avec certaines valeurs de composantes de χ^{eee} , le CD-SHG simulé dans l'approximation dipolaire électrique n'est plus injectif lorsque ψ varie de $-\frac{\pi}{2}$ à $\frac{\pi}{2}$ ¹⁶. Un tel exemple est donné par la courbe rouge en figure V.31 : plusieurs angles ψ correspondent aux mêmes valeurs de CD-SHG. On constate également que la fonction n'est plus parfaitement impaire, mais conserve une symétrie telle que $\text{sgn}(\text{CD-SHG}(-\psi)) = -\text{sgn}(\text{CD-SHG}(\psi))$ pour la grande majorité des angles ψ . Si l'ADE était valide, on devrait donc observer une inversion du CD-SHG lors des expériences *Up-Down* même avec une variabilité dans les tenseurs de susceptibilité. De plus, dans l'ADE, il est toujours indispensable, pour expliquer un signal de CD-SHG non nul, que les composantes chirales et achirales de χ^{eee} présentent un déphasage important, qu'on ne sait pas expliquer.

15. Le suspens est insoutenable, nous remettons ici en cause tout le travail de ce chapitre...

16. Plus précisément, avec $2|\chi_{xyy}^{eee}| < |\chi_{xxx}^{eee} - \chi_{xyy}^{eee}|$ et χ_{yxy}^{eee} du signe de $(\chi_{xyy}^{eee} - \chi_{xxx}^{eee})$

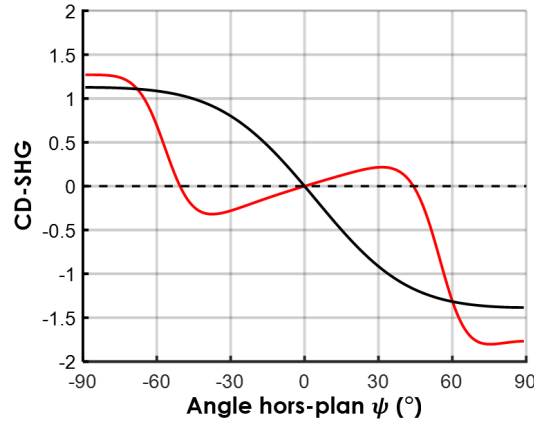


Figure V.31 – Signal de CD-SHG en fonction de l'angle hors-plan ψ , sous l'approximation dipolaire électrique (les tenseurs non locaux ne sont pas considérés). La courbe noire est la même que celle de la figure V.1 (b), obtenue avec les valeurs données en section 1.2 de ce chapitre. La courbe rouge utilise les mêmes valeurs pour les composantes tensorielles, sauf deux : $\chi_{xyy}^{eee} = 3$ et $\chi_{yxy}^{eee} = 0.3$.

Grâce à ces considérations de phase ainsi qu'aux résultats de nos expériences *Up-Down*, nous sommes donc en mesure d'affirmer que la prise en compte des contributions dipolaires magnétiques est indispensable pour décrire correctement le signal de dichroïsme circulaire en microscopie SHG¹⁷. Cependant, contrairement à l'ADE qui avait abouti à une relation très intéressante entre le signal de CD-SHG mesuré et l'angle hors-plan ψ des fibrilles, il ne semble pas possible, selon cette nouvelle approche, d'avoir accès à l'organisation 3D des fibrilles par une simple mesure de CD-SHG. En effet, d'après la seule forme autorisée pour la courbe du CD-SHG en fonction de ψ , un même signal de CD-SHG peut être mesuré pour deux angles hors-plan différents. De plus, la courbe étant différente d'un pixel à l'autre du fait de la variabilité des tenseurs, il n'est pas possible d'établir de lien quantitatif absolu entre la valeur du signal de CD-SHG et le degré de planéité de la structure dans le volume focal. En particulier, le signe du CD-SHG ne correspond pas au signe de l'angle hors-plan mais à une certaine structuration dans le volume focal. Seule la valeur absolue du CD-SHG est alors pertinente à mesurer, si l'on souhaite relier cette mesure à ψ : la courbe $\text{CD-SHG}(\psi)$ étant *a priori* bijective sur $[0, \frac{\pi}{2}]$, la mesure de $|\text{CD-SHG}|$ indiquerait donc un degré de planéité relatif (structure dans le plan pour $|\text{CD-SHG}|$ faible et de plus en plus hors-plan lorsque $|\text{CD-SHG}|$ augmente, sans quantification absolue possible). Si maintenant nous nous intéressons à la structuration des fibrilles dans le volume focal, et non plus à l'angle ψ uniquement, le signe du CD-SHG devient également pertinent au sens où il indique une variation de structure, voire de micro/nano-structure, à l'échelle du volume focal. Des variations de CD-SHG sur un échantillon de planéité homogène renseigneraient donc sur les hétérogénéités de structures, indiquant des spécificités de structurations intra-fibrillaires ou bien du désordre à l'échelle du volume focal. Ceci compléterait les informations obtenues en P-SHG, avec seulement 2 états incidents de polarisation (contre au moins une dizaine d'états en P-SHG). Le lien entre désordre, structuration intra-fibrillaire et CD-SHG dépasse le cadre de cette thèse, mais sera l'objet de notre future étude comprenant expériences et simulations numériques sur des interfaces et des volumes focaux désordonnés.

17. Ouf!

Conclusion générale

Le travail présenté dans ce manuscrit est centré sur l'utilisation de la microscopie SHG pour sonder l'architecture 3D du collagène dans différents tissus ou matériaux. Il a consisté à mettre en place et à appliquer de nouvelles modalités de SHG résolues en polarisation, c'est-à-dire avec des états de polarisation incidents linéaires ou circulaires contrôlés, afin d'obtenir des informations sur la structure hiérarchique du collagène. Il a inclus une phase d'optimisation du microscope, des protocoles expérimentaux et des programmes de traitement de données, une phase d'application de la P-SHG puis une phase d'étude expérimentale et théorique du CD-SHG. Nous résumons ici l'apport et les perspectives de ces deux dernières phases de travail.

Dans un premier temps, nous avons utilisé la modalité de P-SHG pour répondre à deux problématiques spécifiques dans les domaines des sciences du patrimoine d'une part et de l'ophtalmologie d'autre part. Dans ces deux domaines, il est nécessaire de développer des diagnostics quantitatifs non-invasifs offrant une résolution subcellulaire. La P-SHG a permis l'obtention de paramètres d'ordre multi-échelle, sondant l'organisation du collagène à l'échelle de l'image (entropie ou indice d'orientation) mais également à des échelles dépassant la résolution optique, les échelles fibrillaire et moléculaire. En particulier, l'organisation du collagène à ces deux dernières échelles peut correspondre respectivement à la dispersion d'orientation, ou désordre, des fibrilles au sein du volume focal et à l'état de dégradation du collagène (à l'état dénaturé par exemple). Les organisations à ces deux échelles ne sont pas sondées indépendamment mais regroupées sous un paramètre de désordre local appelé le paramètre d'anisotropie ρ .

Le but de la première application de la P-SHG était de pouvoir suivre l'état de conservation de parchemins historiques précieux sans contact ni prélèvement. Par des analyses sur des parchemins contemporains présentant différents stades de dégradation, nous avons démontré que la P-SHG est un outil puissant pour répondre à ce besoin. En effet, une dégradation avancée du collagène dans les parchemins s'accompagne d'une perte du signal SHG ainsi que d'une augmentation du signal de 2-PEF, ce qui se traduit par l'augmentation du rapport des intensités. L'apport spécifique de la P-SHG vient de la détection possible des premiers stades de dégradation grâce au suivi quantitatif de l'évolution du paramètre d'anisotropie ρ . Nos résultats sont en accord avec les analyses chimiques classiques pour évaluer la dégradation (DSC), mais contrairement aux techniques classiques qui sont destructives, ils ont été obtenus sans contact et sans prélèvement. Cela nous a donc permis d'étendre nos analyses à des parchemins médiévaux précieux issus du grand fonds des manuscrits de la médiathèque de Chartres.

La seconde étude en P-SHG portait sur la caractérisation de la structure du collagène dans la cornée dans des cas sains et pathologiques. Nos travaux sur coupes de cornées humaines saines et présentant un kératocône ont abouti à des résultats prometteurs : nous avons en effet montré une différence importante dans l'entropie de la distribution d'orientations des fibrilles de collagène. Il reste toutefois à valider ce diagnostic de manière significative sur davantage d'échantillons et sur différents types de kératocônes, car nous avons constaté que cette pathologie présente une grande variabilité. De plus, ces travaux préliminaires ont été conduits sur des coupes fixées et non pas sur le tissu intact dans sa forme physiologique. Une thèse en cours (Clothilde Raoux) poursuit ces travaux, tant sur des coupes histologiques que sur des cornées humaines entières, saines ou pathologiques, et vise à reconstituer un atlas complet de la structure de ce tissu en le sondant par P-SHG couplée à des essais mécaniques.

Ces deux applications ont illustré la pertinence d'étudier le collagène par P-SHG : d'une part pour le diagnostic de sa dénaturation (modification du collagène à l'échelle moléculaire), et d'autre part la caractérisation de son organisation tridimensionnelle (modification du collagène de l'échelle fibrillaire à l'échelle du tissu lors de pathologies structurelles).

Dans un second temps, nous avons contribué à la mise en place de la modalité de CD-SHG et à la compréhension de ces signaux, amorcées par la précédente doctorante à mon arrivée au LOB. Si cette modalité semblait apporter des informations intéressantes pour l'imagerie tridimensionnelle, l'origine du signal de CD-SHG ainsi que son expression théorique, et en particulier son lien avec l'orientation hors-plan de la structure dans le volume focal, n'avaient pas été clarifiées. Nous avons tout d'abord passé au crible les inconsistances expérimentales et résolu différents artéfacts pour obtenir des mesures de CD-SHG fiables. Cela nous a permis de conduire une série d'expériences *tests* et de mettre en évidence la faiblesse des approximations théoriques actuelles qui considèrent uniquement une description électrique du milieu. En effet, si les hypothèses actuelles imposent au signal de CD-SHG de changer de signe lorsque l'échantillon est retourné selon un axe appartenant au plan d'imagerie, les résultats expérimentaux observés sont tout autres.

Nous avons alors proposé une nouvelle approche théorique, prenant en compte non plus la simple description électrique des interactions, mais également les contributions magnétiques au signal de CD-SHG. Nous avons limité les cas théoriques possibles par comparaison avec des résultats expérimentaux, mais notre interprétation des signaux n'est pas encore complète car elle nécessite notamment une connaissance plus précise des réponses non locales. Elle montre toutefois que le CD-SHG n'est pas relié de manière absolue à l'angle hors-plan moyen des fibrilles dans le volume focal, comme supposé auparavant. Malgré cela, le CD-SHG reste intéressant pour l'imagerie tridimensionnelle car, le signal étant plus important pour des structures inclinées par rapport au plan d'imagerie, il indiquerait un degré de planéité relatif. Cet accès direct au degré d'orientation hors-plan à l'échelle d'un pixel unique peut s'avérer très avantageux sur des coupes de tissus 2D, sur des échantillons dont seule la surface peut être étudiée ou encore sur des échantillons denses. De plus, la variation du signe du CD-SHG au sein de l'image refléterait la variabilité des organisations locales d'un pixel à l'autre, apportant des informations complémentaires à celle donnée par le paramètre d'anisotropie ρ en P-SHG. Il serait alors maintenant très intéressant de comparer les informations délivrées par les deux modalités : notre système expérimental, permettant de passer rapidement d'une configuration de P-SHG à une configuration de CD-SHG, rend cette corrélation possible sans modification expérimentale.

Les premières clés de compréhension du signal de CD-SHG ont été obtenues ici de manière analytique et numérique en régime peu focalisé. Il faut désormais les renforcer par des simulations numériques en régime très focalisé, correspondant à notre véritable cadre expérimental avec des objectifs à forte ouverture numérique. De plus, intégrer à ces simulations d'autres symétries dans la réponse non-linéaire (présence d'interfaces ou désorganisation des fibrilles dans le volume focal) permettra de confirmer et de mieux estimer les effets de ce type de "désordre" sur le signal de CD-SHG.

En dernière remarque, on note que le travail présenté ici est principalement dédié au collagène, protéine ubiquitaire de haute importance. Toutefois, la microscopie SHG permet de sonder toute sorte de milieux non-centrosymétriques et s'est révélée utile pour observer des myofilaments dans les muscles, de l'amidon ou encore de la cellulose. Nos calculs de CD-SHG peuvent être appliqués à ce genre d'échantillons, à condition de modifier les composantes et les symétries des tenseurs de susceptibilité non-linéaire utilisés. Il serait intéressant d'étudier ces différents échantillons en CD-SHG pour une compréhension plus exhaustive des signaux, et d'étendre l'apport de la P-SHG à d'autres domaines. En particulier, la génération de second harmonique dans la cellulose ouvre la voie à d'importantes applications en biologie des plantes, voire en agronomie. Cela éclaire une dernière chose : le chemin est encore long avant d'épuiser le potentiel fabuleux de la microscopie SHG, et plus généralement de la microscopie non-linéaire.

Annexe A

Détail de l'expression analytique de l'intensité SHG $I^{2\omega}(\theta)$ excitée en polarisation linéaire

Nous avons dérivé au chapitre II, section 1.2.1, l'expression analytique de l'intensité SHG $I^{2\omega}(\theta)$, lorsque l'excitation est un champ polarisé linéairement selon θ . Nous avons obtenu une expression en fonction de l'intensité du champ incident I^ω , d'une constante de proportionnalité K et de 3 coefficients a_0 , a_2 et a_4 , constants par rapport à θ et dépendant de l'angle hors-plan ψ et du tenseur du collagène $\chi^{(2)}$ dans le repère (xyz) des fibrilles. Cette expression est donnée par l'équation II.17 :

$$I^{2\omega}(\theta) = K(I^\omega)^2 \cos^2(\psi) \times [a_0(\psi) + a_2(\psi) \cos(2(\theta - \varphi)) + a_4(\psi) \cos(4(\theta - \varphi))],$$

Nous n'avons pas détaillé les expressions complètes des 3 coefficients dans le corps du texte pour alléger le propos, mais nous les donnons ici.

On rappelle que $I^{2\omega}(\theta)$ s'obtient par l'équation II.16 :

$$I^{2\omega} \propto \mathcal{A}^2 + \mathcal{B}^2,$$

$$\begin{aligned} \text{avec } \mathcal{A}(\chi^{(2)}, \psi, \theta - \varphi) &= \mathcal{A}_1 + \cos(2(\theta - \varphi))\mathcal{A}_2 \\ &= \frac{\cos^3 \psi}{2} \chi_{xxx}^{(2)} + (2 - \frac{3}{2} \cos^2 \psi) \cos \psi \chi_{xyy}^{(2)} \\ &\quad + \cos(2(\theta - \varphi)) \left[\frac{\cos^3 \psi}{2} \chi_{xxx}^{(2)} + (1 - \frac{3}{2} \cos^2 \psi) \cos \psi \chi_{xyy}^{(2)} \right], \\ \text{et } \mathcal{B}(\chi^{(2)}, \psi, \theta - \varphi) &= \sin(2(\theta - \varphi)) \cos \psi \chi_{xyy}^{(2)}. \end{aligned}$$

Le carré de ces deux termes s'écrit :

$$\begin{aligned} \mathcal{A}^2 &= \mathcal{A}_1^2 + 2 \cos(2(\theta - \varphi))\mathcal{A}_1\mathcal{A}_2 + \frac{1}{2} (1 + \cos(4(\theta - \varphi))) \mathcal{A}_2^2, \\ \mathcal{B}^2 &= \frac{\cos^2 \psi}{2} (1 - \cos(4(\theta - \varphi))) \chi_{xyy}^{(2)2}. \end{aligned}$$

Cela nous permet d'exprimer les coefficients a_0 , a_2 et a_4 comme suit :

$$\begin{aligned} a_0 &= \mathcal{A}_1^2 + \frac{\mathcal{A}_2^2}{2} + \frac{\cos^2 \psi}{2} \chi_{xyy}^{(2)2}, \\ a_2 &= 2\mathcal{A}_1\mathcal{A}_2, \\ a_4 &= \frac{\mathcal{A}_2^2}{2} - \frac{\cos^2 \psi}{2} \chi_{xyy}^{(2)2}. \end{aligned}$$

Finalement, on obtient les expressions de chaque coefficient en fonction de l'angle hors-plan ψ et du

tenseur du collagène $\chi^{(2)}$ dans le repère (xyz) des fibrilles :

$$a_0(\psi) = \cos^2 \psi \left[\frac{3 \cos^4 \psi}{8} \chi_{xxx}^{(2)2} + \cos^2 \psi \left(\frac{5}{2} - \frac{9 \cos^2 \psi}{4} \right) \chi_{xxx}^{(2)} \chi_{xyy}^{(2)} + \left(5 - \frac{15 \cos^2 \psi}{2} + \frac{27 \cos^4 \psi}{8} \right) \chi_{xyy}^{(2)2} \right],$$

$$a_2(\psi) = 2 \cos^2 \psi \left[\frac{\cos^4 \psi}{4} \chi_{xxx}^{(2)2} + \frac{3 \cos^2 \psi}{2} (1 - \cos^2 \psi) \chi_{xxx}^{(2)} \chi_{xyy}^{(2)} + \left(2 - \frac{9 \cos^2 \psi}{2} + \frac{9 \cos^4 \psi}{4} \right) \chi_{xyy}^{(2)2} \right],$$

$$a_4(\psi) = \frac{\cos^2 \psi}{2} \left[\frac{\cos^4 \psi}{4} \chi_{xxx}^{(2)2} + \cos^2 \psi \left(1 - \frac{3 \cos^2 \psi}{2} \right) \chi_{xxx}^{(2)} \chi_{xyy}^{(2)} + \left(\frac{9 \cos^4 \psi}{4} - 3 \cos^2 \psi \right) \chi_{xyy}^{(2)2} \right].$$

Petite aide si vous voulez refaire les calculs¹ :

$$\mathcal{A}_1^2 = \cos^2 \psi \left[\frac{\cos^4 \psi}{4} \chi_{xxx}^{(2)2} + \cos^2 \psi \left(2 - \frac{3 \cos^2 \psi}{2} \right) \chi_{xxx}^{(2)} \chi_{xyy}^{(2)} + \left(4 - 6 \cos^2 \psi + \frac{9 \cos^4 \psi}{4} \right) \chi_{xyy}^{(2)2} \right],$$

$$\frac{\mathcal{A}_2^2}{2} = \frac{\cos^2 \psi}{2} \left[\frac{\cos^4 \psi}{4} \chi_{xxx}^{(2)2} + \cos^2 \psi \left(1 - \frac{3 \cos^2 \psi}{2} \right) \chi_{xxx}^{(2)} \chi_{xyy}^{(2)} + \left(1 - 3 \cos^2 \psi + \frac{9 \cos^4 \psi}{4} \right) \chi_{xyy}^{(2)2} \right].$$

1. De préférence, à faire vérifier par sa directrice de thèse pour l'occuper un dimanche matin.

Annexe B

Microscopie SHG interférométrique (I-SHG)

Durant ma thèse, j'ai eu l'opportunité de travailler sur la technique de SHG interférométrique, ou microscopie I-SHG, à l'occasion d'un échange de deux mois à l'INRS Varennes (Montréal, Canada). Le but premier était de corrélérer des mesures de I-SHG avec des mesures de CD-SHG, mais cet échange a également permis d'étudier l'apport du contraste interférométrique sur les mesures SHG, conduisant à une publication [177].

La microscopie I-SHG, a d'abord été implémentée au début des années 2000 sur des cristaux [178, 179], puis optimisée pour l'étude du collagène et de la myosine à partir de 2013 par le groupe de François Légaré à l'INRS Varennes [180–182].

Le dispositif expérimental est celui d'un microscope SHG conventionnel (laser impulsionnel, système de balayage, etc.). En amont de la focalisation dans l'échantillon, le faisceau incident (dans le proche infrarouge), d'intensité I^ω , est focalisé dans un cristal de BBO ou de quartz afin de générer un signal de SHG de référence, d'intensité $I_{\text{ref}}^{2\omega}$. Dans ce cas, la cohérence spatiale des deux impulsions à ω et à 2ω est automatique. De façon à conserver leur cohérence temporelle au niveau de l'échantillon, des blocs de calcite sont insérés dans le chemin optique pour introduire une dispersion négative (retard de l'impulsion à ω par rapport à l'impulsion à 2ω) et compenser la dispersion normale introduite par les différentes optiques du système lors de la propagation. Ainsi, après focalisation dans l'échantillon, le signal SHG de l'échantillon, d'intensité $I_{\text{ech}}^{2\omega}$, et le signal de référence $I_{\text{ref}}^{2\omega}$, de phase φ_{ref} connue, interfèrent. L'intensité totale mesurée s'écrit :

$$\mathcal{I}(\varphi_{\text{ref}}) = I_{\text{ref}}^{2\omega} + I_{\text{ech}}^{2\omega} + 2\sqrt{I_{\text{ref}}^{2\omega}I_{\text{ech}}^{2\omega}} \cos(\varphi_{\text{ech}} - \varphi_{\text{ref}}) \quad (\text{B.1})$$

La phase du faisceau incident est contrôlée par une lame de verre placée sur le trajet optique et d'orientation, *i.e.* d'épaisseur traversée par le faisceau, modulable. Deux mesures avec des phases de référence fixées et déphasées de π permettent d'obtenir à la fois la phase de l'échantillon φ_{ech} et le contraste interférométrique \mathcal{C} :

$$\begin{aligned} \mathcal{I}(\varphi_{\text{ref}}) - \mathcal{I}(\varphi_{\text{ref}} + \pi) &= \mathcal{C} \cos(\Delta\varphi) \\ &= 4\sqrt{I_{\text{ref}}^{2\omega}I_{\text{ech}}^{2\omega}} \cos(\varphi_{\text{ech}} - \varphi_{\text{ref}}) \end{aligned} \quad (\text{B.2})$$

La phase extraite nous permet de sonder la polarité relative dans le plan entre les dipôles : les phases de deux dipôles antiparallèles (de même orientation moyenne dans le plan mais de polarités opposées) seront déphasées de π . La connaissance de la polarité dans le plan peut s'avérer très utile pour des mesures en CD-SHG, en particulier dans le cadre des expériences sur échantillons collagéniques inclinés (section 4.3 du chapitre V) lors desquelles la variation locale du CD-SHG liée à l'inclinaison de l'échantillon dépend de la polarité des fibrilles dans le volume focal sondé. Nous avons alors réalisé une imagerie corrélative sur des coupes de cornées, démontrant la possibilité d'une telle imagerie corrélative. Toutefois, avant de pouvoir réellement exploiter cette corrélation, il reste à optimiser les résolutions expérimentales en I-SHG pour qu'elles soient identiques sur les deux systèmes. En effet, les résolutions du CD-SHG ont été spécifiquement améliorées pour permettre l'imagerie fine de la cornée, en particulier pour pouvoir visualiser le signal de CD-SHG au centre des lamelles et non à leurs interfaces où des signaux artéfactuels peuvent être produits.

Par ailleurs, le contraste interférométrique \mathcal{C} apporte également des informations. Lors d'un travail commun avec un doctorant de l'INRS, Maxime Pinsard, il a été montré que, dans une zone où le

signal SHG est supposé s'annuler (typiquement, une zone où les dipôles s'organisent de façon centrosymétrique), un signal de SHG peut parfois être tout de même détecté. Cela peut se produire dans un tissu ou un matériau complexe et diffusant, et est notamment lié à une ouverture numérique de détection trop faible. Il a alors été montré que le signal de SHG résiduel est principalement incohérent et interfère peu avec le signal SHG de référence. Ainsi, le contraste interférométrique \mathcal{C} est faible, ce qui permet de révéler la présence de dipôles organisés de façon centrosymétrique. Les principaux résultats de ce travail sont regroupés dans la publication [177].

Annexe C

Influence de la structuration locale sur le signal de CD-SHG

Dans cette annexe, des mesures de P-SHG sur une membrane de collagène fibrillaire sont corrélées avec des mesures de CD-SHG. Le signal de CD-SHG, et en particulier son signe, semble être lié à l'orientation dans le plan, φ , des fibrilles de collagène, alors que φ n'a théoriquement aucune influence sur le CD-SHG. Nous montrons ici que les angles φ extraits pour cet échantillon dépendent en fait de l'agencement des fibrilles au sein du volume focal, et ce sont ces changements de structuration locale qui influent sur le signal de CD-SHG.

La P-SHG sur un tissu composé de collagène fibrillaire permet d'extraire, entre autres, l'orientation principale dans le plan de l'image, φ , des fibrilles dans le volume focal. Cette orientation est obtenue grâce à la phase des coefficients de Fourier de l'intensité $I^{2\omega}(\theta)$ donnée par l'équation II.17 (le processus d'extraction exact est détaillé en section 3.2 du chapitre II). Toutefois, cette équation a été établie dans le cadre de la symétrie de Kleinman pour laquelle les composantes chirales s'annulent. Un calcul prenant en compte les composantes chirales du tenseur χ^{eee} est effectué dans la thèse de Claire Teulon [2], aboutissant à une expression de l'intensité SHG en fonction de l'orientation θ de la polarisation linéaire incidente légèrement différente :

$$I^{2\omega}(\theta) = (I^\omega)^2 \cos^2(\psi) \times [a_0(\psi) + a_2(\psi) \cos(2(\theta - \varphi)) + a_4(\psi) \cos(4(\theta - \varphi)) + b_2(\psi) \sin(2(\theta - \varphi)) + b_4(\psi) \sin(4(\theta - \varphi))], \quad (\text{C.1})$$

où b_2 et b_4 sont des paramètres supplémentaires faisant intervenir les composantes chirales du tenseur. Une telle équation se réécrit à l'aide des formules d'Euler :

$$I^{2\omega}(\theta) \propto a_0(\psi) + \frac{1}{2} \left((a_2(\psi) - ib_2(\psi))e^{2i(\theta-\varphi)} + (a_4(\psi) - ib_4(\psi))e^{4i(\theta-\varphi)} + c.c. \right) \\ \propto a_0(\psi) + \frac{1}{2} \left((a_2(\psi)e^{-2i\varphi} + b_2(\psi)e^{-2i(\varphi+\frac{\pi}{4})})e^{2i\theta} \right. \\ \left. + (a_4(\psi)e^{-4i\varphi} + b_4(\psi)e^{-4i(\varphi+\frac{\pi}{4})})e^{4i\theta} + c.c. \right). \quad (\text{C.2})$$

Nous voyons que la phase du k^e coefficient de Fourier tourne de φ à $\varphi + \frac{\pi}{4}$, selon le rapport $\frac{a_k}{b_k}$. Ce dernier est lié au rapport des composantes achirales/chirales :

- Si les fibrilles ont principalement la même polarité, les composantes achirales dominent les composantes chirales, et $a_k \gg b_k$: on extrait bien l'orientation principale dans le plan φ .
- Si les fibrilles sont presque toutes tête-bêche (environ 50 % polarisées dans un sens et 50 % dans l'autre), les composantes chirales dominent les composantes achirales, et $a_k \ll b_k$: l'orientation extraite est décalée de $\frac{\pi}{4}$.
- Si une polarité est faiblement majoritaire (55 % des fibrilles polarisées dans un sens et 45 % dans l'autre), les composantes chirales et achirales sont équivalentes, et $a_k \approx b_k$: l'orientation extraite est décalée de $\frac{\pi}{8}$.

La figure C.1 présente la corrélation entre la carte des orientations dans le plan φ , obtenues par P-SHG, d'une membrane de collagène fibrillaire et l'image de cette même membrane en CD-SHG.

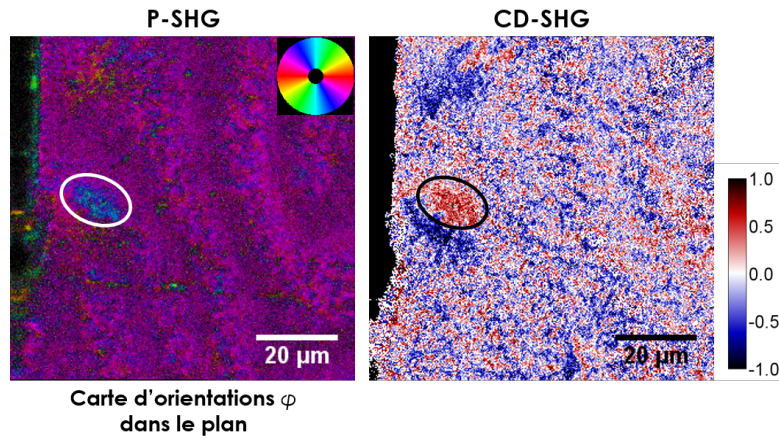


Figure C.1 – Imagerie corrélative P-SHG et CD-SHG. À gauche, carte des orientations φ dans le plan de l'image, obtenues par P-SHG, d'une membrane de collagène fibrillaire et, à droite, image de cette même membrane en CD-SHG. Le cercle délimite une zone où sont détectés à la fois un autre angle φ et un changement de signe dans le signal de CD-SHG.

L'orientation majoritaire dans la carte de φ est $-\frac{\pi}{4}$ (violet foncé), mais certaines zones ont une orientation à $-\frac{\pi}{8}$ (rouge/violet) ou à $-\frac{3\pi}{8}$ (bleu foncé). Ces décalages de $\frac{\pi}{8}$ correspondent aux cas décrit précédemment : les composantes chirales et achirales du tenseur sont équivalentes pour la plupart des pixels, sauf dans des cas ponctuels où les fibrilles s'arrangent soit principalement selon la même polarité (bleu), soit principalement tête-bêche (rouge), décalant l'angle de $\pm\frac{\pi}{8}$. Cette variation d'angle φ du bleu au rouge s'accompagne d'un changement de signe du CD-SHG : cela prouve l'influence de la structuration locale sur le signal de CD-SHG.

Ces mesures de P-SHG sur membranes de collagène fibrillaire ne remettent toutefois pas en cause les mesures de P-SHG sur des échantillons plus standards, comme le tendon, la cornée, ou la peau. En effet, de tels échantillons sont très organisés et il est possible d'imposer un facteur de qualité pour ne conserver que les pixels de forte intensité : nous sommes quasiment toujours dans le cas où les composantes achirales sont prépondérantes et où l'angle extrait φ est la véritable orientation dans le plan. La bonne adéquation entre l'angle extrait en P-SHG et l'orientation des fibrilles a déjà été confirmé par des travaux antérieurs sur la cornée [81], le tendon [79] ou encore la peau [96].

Bibliographie

- [1] S. Bancelin, *Imagerie Quantitative du Collagène par Génération de Seconde Harmonique*. Thèse de doctorat, École Polytechnique, Dec. 2013.
- [2] C. Teulon, *Imagerie Quantitative du Collagène par Génération de Second Harmonique résolue en polarisation*. Thèse de doctorat, Université Paris-Saclay, Oct. 2016.
- [3] S. Ricard-Blum, “The collagen family,” *CSH Perspect. Biol.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–19, 2011.
- [4] D. J. Prockop and K. I. Kivirikko, “Collagens : molecular biology, diseases, and potentials for therapy,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 64, pp. 403–434, 1995.
- [5] K. E. Kadler, C. Baldock, J. Bella, and R. P. Boot-Handford, “Collagens at a glance,” *J. Cell Sci.*, vol. 120, no. 12, pp. 1955–8, 2007.
- [6] P. Fratzl, “Collagen : structure and mechanics, an introduction,” in *Collagen*, pp. 1–13, Springer, 2008.
- [7] K. Beck and B. Brodsky, “Supercoiled protein motifs : the collagen triple-helix and the alpha-helical coiled coil,” *J. Struct. Biol.*, vol. 122, no. 1-2, pp. 17–29, 1998.
- [8] K. E. Kadler, D. F. Holmes, J. A. Trotter, and J. A. Chapman, “Collagen fibril formation,” *J. Biochem.*, vol. 316, pp. 1–11, 1996.
- [9] D. Hulmes, “Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures,” *J. Struct. Biol.*, vol. 137, pp. 2–10, 2002.
- [10] D. J. S. Hulmes, T. J. Wess, D. J. Prockop, and P. Fratzl, “Radial packing, order, and disorder in collagen fibrils,” *Biophys. J.*, vol. 68, no. 5, pp. 1661–70, 1995.
- [11] J. P. Orgel, A. Miller, T. C. Irving, R. F. Fischetti, A. P. Hammersley, and T. J. Wess, “The *in situ* supermolecular structure of type I collagen,” *Structure*, vol. 9, no. 1, pp. 1061–1069, 2001.
- [12] D. J. Prockop and A. Fertala, “The collagen fibril : The almost crystalline structure,” *J. Struct. Biol.*, vol. 122, no. 1-2, pp. 111–118, 1998.
- [13] M. Raspanti, M. Reguzzoni, M. Protasoni, and D. Martini, “Evidence of a discrete axial structure in unimodal collagen fibrils,” *Biomacromolecules*, vol. 12, no. 12, pp. 4344–4347, 2011.
- [14] K. M. Meek and C. Knupp, “Corneal structure and transparency,” *Prog. Ret. Eye Res.*, vol. 49, pp. 1–16, 2015.
- [15] N. Terai, F. Raiskup, M. Haustein, L. E. Pillunat, and E. Spoerl, “Identification of biomechanical properties of the cornea : the ocular response analyzer,” *Curr. Eye Res.*, vol. 37, no. 7, pp. 553–562, 2012.
- [16] D. M. Maurice, “The structure and transparency of the cornea,” *J. Physiol.*, vol. 136, pp. 263–286, 1957.

- [17] A. J. Quantock, M. Winkler, G. J. Parfitt, R. D. Young, D. J. Brown, C. Boote, and J. V. Jester, "From nano to macro : studying the hierarchical structure of the corneal extracellular matrix," *Exp. Eye Res.*, vol. 133, pp. 81–99, 2015.
- [18] T. Ushiki, "Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint," *Arch. Histol. Cytol.*, vol. 65, no. 2, pp. 109–126, 2002.
- [19] P. P. Purslow, T. J. Wess, and D. Hukins, "Collagen orientation and molecular spacing during creep and stress-relaxation in soft connective tissues," *J. Exp. Biol.*, vol. 201, no. 1, pp. 135–142, 1998.
- [20] C. J. Kennedy and T. J. Wess, "The structure of collagen within parchment—a review," *Restaurator*, vol. 24, no. 2, pp. 61–80, 2003.
- [21] T. J. Wess and J. P. Orgel, "Changes in collagen structure : drying, dehydrothermal treatment and relation to long term deterioration," *Thermochim. Acta*, vol. 365, no. 1-2, pp. 119–128, 2000.
- [22] P. Kronick and P. Buechler, "Fiber orientation in calfskin by laser light scattering or x-ray diffraction and quantitative relation to mechanical properties," *J. Am. Leather Chem. As.*, 1986.
- [23] P. Kozlov and G. Burdygina, "The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification," *Polymer*, vol. 24, no. 6, pp. 651–666, 1983.
- [24] G. Latour and L. Robinet, "La microscopie optique tridimensionnelle, de l'imagerie biomédicale à la caractérisation des objets du patrimoine," in *Instrumentation portable : quels enjeux pour l'archéométrie ?*, Collection Sciences archéologiques, C. Benech, N. Cantin, M.-A. Languille, A. Mazuy, L. Robinet et A. Zazzo ed., 2019.
- [25] P. Masson, "Some histological methods. Trichrome stainings and their preliminary technique," *J. Tech. Methods*, vol. 12, pp. 75–90, 1929.
- [26] F. Sweat, H. Puchtler, and S. Rosenthal, "Sirius red F3BA as a stain for connective tissues," *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 78, pp. 69–72, 1964.
- [27] R. Larsen, *Improved Damage Assessment of Parchment : IDAP : Assessment, Data Collection and Sharing of Knowledge*. Office for Official Publications of the European Communities, 2007.
- [28] P. F. Davison and E. J. Galbavy, "Fluorescent dyes demonstrate the uniform expansion of the growing rabbit cornea," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 26, no. 9, pp. 1202–1209, 1985.
- [29] K. N. Krahn, C. V. C. Bouten, S. Van Tuijl, M. A. M. J. Van Zandvoort, and M. Merckx, "Fluorescently labeled collagen binding proteins allow specific visualization of collagen in tissues and live cell culture," *Anal. Biochem.*, vol. 350, no. 2, pp. 177–185, 2006.
- [30] D. Huang, E. A. Swanson, C. P. Lin, J. S. Schuman, W. G. Stinson, W. Chang, M. R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C. A. Puliafito, *et al.*, "Optical coherence tomography," *Science*, vol. 254, no. 5035, pp. 1178–1181, 1991.
- [31] W. Drexler and J. G. Fujimoto, *Optical coherence tomography : technology and applications*. Springer Science & Business Media, 2008.
- [32] A. Dubois, *Handbook of Full-Field Optical Coherence Microscopy*. Pan Stanford, 2016.
- [33] F. O. Schmitt, C. E. Hall, and M. A. Jakus, "Electron microscope investigations of the structure of collagen," *J. Cell. Comp. Physiol.*, vol. 20, no. 1, pp. 11–33, 1942.

-
- [34] B. R. Williams, R. A. Gelman, D. C. Poppke, and K. A. Piez, "Collagen fibril formation. optimal in vitro conditions and preliminary kinetic results," *J. Biol. Chem.*, vol. 253, no. 18, pp. 6578–6585, 1978.
- [35] D. A. D. Parry and A. S. Craig, "Quantitative electron-microscope observations of collagen fibrils in rat-tail tendon," *Biopolymers*, vol. 16, no. 5, pp. 1015–1031, 1977.
- [36] Y. Shen, *The principles of nonlinear optics*. Wiley-Interscience, 2003.
- [37] R. W. Boyd, *Nonlinear Optics*. Academic Press, 3e ed., 2007.
- [38] F. Hache, *Optique non linéaire*. EDP Sciences, 2017.
- [39] J. D. Jackson, *Classical electrodynamics*. John Wiley and sons, Inc., 3e ed., 1998.
- [40] P. A. Franken, A. E. Hill, C. W. Peters, and G. Weinreich, "Generation of optical harmonics," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 7, no. 4, pp. 118–119, 1961.
- [41] M. N. Polyanskiy, "Refractive index database." <http://refractiveindex.info>.
- [42] I. Gusachenko, *Polarization-resolved Second Harmonic Microscopy in collagenous tissues : theoretical and experimental developments, and application to microstructural imaging during biomechanical assays in tendon*. Thèse de doctorat, École Polytechnique, Oct. 2012.
- [43] M. Göppert-Mayer, "Über Elementarakte mit zwei Quantenspruengen," *Annal. Physik*, vol. 401, no. 3, pp. 273–294, 1931.
- [44] W. Kaiser and C. Garrett, "Two-Photon Excitation in CaF₂ :Eu²⁺," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 7, no. 6, pp. 229–231, 1961.
- [45] C. Sheppard and R. Kompfner, "Resonant scanning optical microscope," *Appl. Opt.*, vol. 17, no. 18, pp. 2879–2882, 1978.
- [46] W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb, "Two-photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy," *Science*, vol. 248, no. April, pp. 73–76, 1990.
- [47] M. Drobizhev, S. Tillo, N. Makarov, T. Hughes, and A. Rebane, "Absolute two-photon absorption spectra and two-photon brightness of orange and red fluorescent proteins," *J. Phys. Chem. B*, vol. 113, no. 4, pp. 855–859, 2009.
- [48] N. Olivier, D. Débarre, and E. Beaupaire, "THG microscopy of cells and tissues : contrast mechanisms and applications," in *Second Harmonic Generation Imaging* (F. S. . Pavone and P. J. . Campagnola, eds.), pp. 51–80, Taylor & Francis, 2013.
- [49] C. L. Evans and X. S. Xie, "Coherent anti-stokes raman scattering microscopy : chemical imaging for biology and medicine," *Annu. Rev. Anal. Chem.*, vol. 1, pp. 883–909, 2008.
- [50] W. Min, C. W. Freudiger, S. Lu, and X. S. Xie, "Coherent nonlinear optical imaging : beyond fluorescence microscopy," *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 62, pp. 507–530, 2011.
- [51] W. R. Zipfel, R. M. Williams, and W. W. Webb, "Nonlinear magic : multiphoton microscopy in the biosciences," *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, no. 11, p. 1369, 2003.
- [52] A. Vogel and V. Venugopalan, "Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues," *Chem. Rev.*, vol. 103, no. 2, pp. 577–644, 2003.
- [53] F. S. Labella and G. Paul, "Structure of collagen from human tendon as influenced by age and sex," *J. Gerontol.*, vol. 20, no. 1, pp. 54–59, 1965.
-

- [54] D. Fujimoto, K.-y. Akiba, and N. Nakamura, "Isolation and characterization of a fluorescent material in bovine achilles tendon collagen," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 76, no. 4, pp. 1124–1129, 1977.
- [55] R. Richards-Kortum and E. Sevick-Muraca, "Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis," *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 47, no. 1, pp. 555–606, 1996.
- [56] P. Odetti, A. Borgoglio, and R. Rolandi, "Age-related increase of collagen fluorescence in human subcutaneous tissue," *Metabolism*, vol. 41, no. 6, pp. 655–658, 1992.
- [57] W. R. Zipfel, R. M. Williams, R. Christie, A. Y. Nikitin, B. T. Hyman, and W. W. Webb, "Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 100, no. 12, pp. 7075–7080, 2003.
- [58] A. Deniset-Besseau, P. D. S. Peixoto, G. Mosser, and M.-C. Schanne-Klein, "Nonlinear optical imaging of lyotropic cholesteric liquid crystals," *Opt. Express*, vol. 18, no. 2, pp. 1113–1121, 2010.
- [59] G. Latour, L. Robinet, A. Dazzi, F. Portier, A. Deniset-Besseau, and M.-C. Schanne-Klein, "Correlative nonlinear optical microscopy and infrared nanoscopy reveals collagen degradation in altered parchments," *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 26344, 2016.
- [60] Z. Deyl, K. Macek, M. Adam, *et al.*, "Studies on the chemical nature of elastin fluorescence," *BBA-Protein Struct.*, vol. 625, no. 2, pp. 248–254, 1980.
- [61] S. Roth and I. Freund, "Second harmonic generation in collagen," *J. Chem. Phys.*, vol. 70, no. 4, p. 1637, 1979.
- [62] Y. Guo, P. Ho, H. Savage, D. Harris, P. Sacks, S. Schantz, F. Liu, N. Zhadin, and R. Alfano, "Second-harmonic tomography of tissues," *Opt. Lett.*, vol. 22, no. 17, pp. 1323–1325, 1997.
- [63] P. J. Campagnola, A. C. Millard, M. Terasaki, P. E. Hoppe, C. J. Malone, and W. A. Mohler, "Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues," *Biophys. J.*, vol. 82, no. 1, pp. 493–508, 2002.
- [64] P. Stoller, K. Reiser, P. Celliers, and A. Rubenchik, "Polarization-modulated second harmonic generation in collagen," *Biophys. J.*, vol. 82, no. 6, pp. 3330–3342, 2002.
- [65] A. Zoumi, A. Yeh, and B. J. Tromberg, "Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 99, no. 17, pp. 11014–11019, 2002.
- [66] K. Koenig and I. Riemann, "High-resolution multiphoton tomography of human skin with sub-cellular spatial resolution and picosecond time resolution," *J. Biomed. Opt.*, vol. 8, no. 3, pp. 432–440, 2003.
- [67] G. Cox, E. Kable, A. Jones, I. Fraser, F. Manconi, and M. D. Gorrell, "3-dimensional imaging of collagen using second harmonic generation," *J. Struct. Biol.*, vol. 141, no. 1, pp. 53–62, 2003.
- [68] E. Brown, T. McKee, E. diTomaso, A. Pluen, B. Seed, Y. Boucher, and R. Jain, "Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumors in vivo using second-harmonic generation," *Nat. Med.*, vol. 9, no. 6, pp. 796–800, 2003.
- [69] S. V. Plotnikov, A. Millard, P. Campagnola, and W. Mohler, "Characterization of the myosin-based source for second-harmonic generation from muscle sarcomeres," *Biophys. J.*, vol. 90, p. 693–703, 2006.

-
- [70] A. E. Tuer, S. Krouglov, N. Prent, R. Cisek, D. Sandkuijl, K. Yasufuku, B. C. Wilson, and V. Barzda, “Nonlinear Optical Properties of Type I Collagen Fibers Studied by Polarization Dependent Second Harmonic Generation Microscopy,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 115, no. 44, pp. 12759–12769, 2011.
- [71] A. Deniset-Besseau, J. Duboisset, E. Benichou, F. Hache, P.-F. Brevet, and M.-C. Schanne-Klein, “Measurement of the second-order hyperpolarizability of the collagen triple helix and determination of its physical origin,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 113, no. 40, pp. 13437–13445, 2009. PMID : 19754079.
- [72] F. Tiaho, G. Recher, and D. Rouède, “Estimation of helical angle of myosin and collagen by second harmonic generation imaging microscopy,” *Opt. Express*, vol. 15, no. 19, pp. 12286–12295, 2007.
- [73] A. E. Tuer, M. K. Akens, S. Krouglov, D. Sandkuijl, B. C. Wilson, C. M. Whyne, and V. Barzda, “Hierarchical model of fibrillar collagen organization for interpreting the second-order susceptibility tensors in biological tissue,” *Biophys. J.*, vol. 103, no. 10, pp. 2093–2105, 2012.
- [74] J. Duboisset, D. Ait-Belkacem, M. Roche, H. Rigneault, and S. Brasselet, “Generic model of the molecular orientational distribution probed by polarization-resolved second-harmonic generation,” *Phys. Rev. A*, vol. 85, no. 4, p. 043829, 2012.
- [75] A. M. Pena, T. Boulesteix, T. Dartigalongue, and M. C. Schanne-Klein, “Chiroptical effects in the second harmonic signal of collagens I and IV,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 29, pp. 10314–10322, 2005.
- [76] M. Strupler, M. Hernest, C. Fligny, J.-L. Martin, P.-L. Tharaux, and M.-C. Schanne-Klein, “Second harmonic microscopy to quantify renal interstitial fibrosis and arterial remodeling,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 13, no. 5, pp. 054041–054041–10, 2008.
- [77] X. Y. Chen, O. Nadiarynk, S. Plotnikov, and P. J. Campagnola, “Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure,” *Nat. Protocols*, vol. 7, no. 4, pp. 654–669, 2012.
- [78] S. Bancelin, B. Lynch, C. Bonod-Bidaud, G. Ducourthial, S. Psilodimitrakopoulos, P. Dokládál, J.-M. Allain, M.-C. Schanne-Klein, and F. Ruggiero, “Ex vivo multiscale quantitation of skin biomechanics in wild-type and genetically-modified mice using multiphoton microscopy,” *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 17635, 2015.
- [79] I. Gusachenko, V. Tran, Y. Goulam Houssen, J.-M. Allain, and M.-C. Schanne-Klein, “Polarization-resolved second-harmonic generation in tendon upon mechanical stretching,” *Biophys. J.*, vol. 102, pp. 2220–9, may 2012.
- [80] R. Genthial, E. Beaurepaire, M.-C. Schanne-Klein, F. Peyrin, D. Farlay, C. Olivier, Y. Bala, G. Boivin, J.-C. Vial, D. Débarre, *et al.*, “Label-free imaging of bone multiscale porosity and interfaces using third-harmonic generation microscopy,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 3419, 2017.
- [81] G. Latour, I. Gusachenko, L. Kowalczyk, I. Lamarre, and M.-C. Schanne-Klein, “In vivo structural imaging of the cornea by polarization-resolved second harmonic microscopy,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 3, no. 1, pp. 1–15, 2012.
- [82] J. R. Lakowicz, “Fluorescence anisotropy,” in *Principles of fluorescence spectroscopy*, pp. 291–319, Springer, 1999.
-

- [83] A. Benoit, G. Latour, M.-C. Schanne-Klein, and J.-M. Allain, “Simultaneous microstructural and mechanical characterization of human corneas at increasing pressure,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 60, pp. 93–105, 2016.
- [84] A. Golaraei, L. Kontenis, R. Cisek, D. Tokarz, S. J. Done, B. C. Wilson, and V. Barzda, “Changes of collagen ultrastructure in breast cancer tissue determined by second-harmonic generation double stokes-mueller polarimetric microscopy,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 7, no. 10, pp. 4054–4068, 2016.
- [85] X. Chen, C. Raggio, and P. J. Campagnola, “Second-harmonic generation circular dichroism studies of osteogenesis imperfecta,” *Opt. Lett.*, vol. 37, no. 18, pp. 3837–9, 2012.
- [86] H. Lee, M. J. Huttunen, K.-J. Hsu, M. Partanen, G.-Y. Zhuo, M. Kauranen, and S.-W. Chu, “Chiral imaging of collagen by second-harmonic generation circular dichroism,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 4, no. 6, pp. 909–16, 2013.
- [87] G.-Y. Zhuo, M.-Y. Chen, C.-Y. Yeh, C.-L. Guo, and F.-J. Kao, “Fast determination of three-dimensional fibril orientation of type-I collagen via macroscopic chirality,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 110, no. 2, p. 023702, 2017.
- [88] S. Psilodimitrakopoulos, I. Amat-Roldan, P. Loza-Alvarez, and D. Artigas, “Estimating the helical pitch angle of amylopectin in starch using polarization second harmonic generation microscopy,” *J. Opt.*, vol. 12, no. 8, p. 084007, 2010.
- [89] M. Alizadeh, D. Merino, G. Lombardo, M. Lombardo, R. Mencucci, M. Ghotbi, and P. Loza-Alvarez, “Identifying crossing collagen fibers in human corneal tissues using pSHG images,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 10, pp. 3875–3888, Aug 2019.
- [90] C. Teulon, A. Tidu, F. Portier, G. Mosser, and M.-C. Schanne-Klein, “Probing the 3D structure of cornea-like collagen liquid crystals with polarization-resolved SHG microscopy,” *Opt. Express*, vol. 24, no. 14, pp. 16084–16098, 2016.
- [91] I. Gusachenko, G. Latour, and M.-C. Schanne-Klein, “Polarization-resolved second harmonic microscopy in anisotropic thick tissues,” *Opt. Express*, vol. 18, no. 18, pp. 19339–19352, 2010.
- [92] C. Teulon, I. Gusachenko, G. Latour, and M.-C. Schanne-Klein, “Theoretical , numerical and experimental study of geometrical parameters that affect anisotropy measurements in polarization-resolved SHG microscopy,” *Opt. Express*, vol. 23, no. 7, pp. 10168–10176, 2015.
- [93] Y. Suzaki and A. Tachibana, “Measurement of the μm sized radius of gaussian laser beam using the scanning knife-edge,” *Appl. Opt.*, vol. 14, no. 12, pp. 2809–2810, 1975.
- [94] P. Mahou, G. Malkinson, É. Chaudan, T. Gacoin, E. Beaurepaire, and W. Supatto, “Metrology of Multiphoton Microscopes Using Second Harmonic Generation Nanoprobes,” *Small*, vol. 13, no. 42, 2017.
- [95] G. R. Fowles, *Introduction to modern optics*. New-York : Dover publications, 1975.
- [96] G. Ducourthial, J. S. Affagard, M. Schmeltz, X. Solinas, M. Lopez-Poncelas, C. Bonod-Bidaud, R. Rubio-Amador, F. Ruggiero, J. M. Allain, E. Beaurepaire, and M. C. Schanne-Klein, “Monitoring dynamic collagen reorganization during skin stretching with fast polarization-resolved second harmonic generation imaging,” *J. Biophotonics*, no. September 2018, pp. 1–9, 2019.
- [97] I. Amat-Roldan, S. Psilodimitrakopoulos, P. Loza-Alvarez, and D. Artigas, “Fast image analysis in polarization SHG microscopy,” *Opt. Express*, vol. 18, no. 16, pp. 17209–17219, 2010.

-
- [98] P. Réfrégier, M. Roche, and S. Brasselet, “Precision analysis in polarization-resolved second harmonic generation microscopy,” *Opt. Lett.*, vol. 36, no. 11, pp. 2149–2151, 2011.
- [99] V. Wasik, P. Réfrégier, M. Roche, and S. Brasselet, “Precision of polarization-resolved second harmonic generation microscopy limited by photon noise for samples with cylindrical symmetry,” *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 32, no. 8, pp. 1437–1445, 2015.
- [100] M. Förderer, T. Georgiev, M. Mosqueira, R. H. Fink, and M. Vogel, “Functional second harmonic generation microscopy probes molecular dynamics with high temporal resolution,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 7, no. 2, pp. 525–541, 2016.
- [101] X. Y. Dow, E. L. DeWalt, S. Z. Sullivan, P. D. Schmitt, J. R. Ulcickas, and G. J. Simpson, “Imaging the nonlinear susceptibility tensor of collagen by nonlinear optical stokes ellipsometry,” *Biophys. J.*, vol. 111, no. 7, pp. 1361–1374, 2016.
- [102] R. Larsen, D. V. Poulsen, F. Juchauld, H. Jerosch, M. Odlyha, J. de Groot, T. Wess, J. Hiller, G. Della Gatta, E. Badea, *et al.*, “Damage assessment of parchment : complexity and relations at different structural levels,” *14th ICOM-CC Preprints*, vol. 1, pp. 199–208, 2005.
- [103] G. Della Gatta, E. Badea, R. Ceccarelli, T. Usacheva, S. Coluccia, *et al.*, “Assessment of damage in old parchments by DSC and SEM,” *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 82, no. 3, pp. 637–649, 2005.
- [104] R. Larsen, D. V. P. Sommer, and M. Vest, “The hydrothermal stability (shrinkage activity) of parchment measured by the micro hot table method (mht),” in *Microanalysis of parchment*, pp. 55–62, Archetype Publications Ltd., 2002.
- [105] R. Larsen, D. V. P. Sommer, M. Vest, and A. L. Jensen, “Amino acid analysis of new and historical parchments,” in *Microanalysis of parchment*, pp. 93–99, Archetype Publications Ltd., 2002.
- [106] M. Bicchieri, M. Monti, G. Piantanida, F. Pinzari, and A. Sodo, “Non-destructive spectroscopic characterization of parchment documents,” *Vib. Spectrosc.*, vol. 55, no. 2, pp. 267–272, 2011.
- [107] A. Možir, M. Strlič, T. Trafela, I. K. Cigić, J. Kolar, V. Deselnicu, and G. de Bruin, “On oxidative degradation of parchment and its non-destructive characterisation and dating,” *Appl. Phys. A*, vol. 104, no. 1, pp. 211–217, 2011.
- [108] H. Liang, M. G. Cid, R. G. Cucu, G. Dobre, A. G. Podoleanu, J. Pedro, and D. Saunders, “En-face optical coherence tomography-a novel application of non-invasive imaging to art conservation,” *Opt. Express*, vol. 13, no. 16, pp. 6133–6144, 2005.
- [109] G. Latour, J.-P. Echard, M. Didier, and M.-C. Schanne-Klein, “In situ 3d characterization of historical coatings and wood using multimodal nonlinear optical microscopy,” *Opt. Express*, vol. 20, no. 22, pp. 24623–24635, 2012.
- [110] M.-L. Yang, C.-W. Lu, I.-J. Hsu, and C. Yang, “The use of optical coherence tomography for monitoring the subsurface morphologies of archaic jades,” *Archaeometry*, vol. 46, no. 2, pp. 171–182, 2004.
- [111] P. Targowski, B. Rouba, M. Wojtkowski, and A. Kowalczyk, “The application of optical coherence tomography to non-destructive examination of museum objects,” *Stud. Conserv.*, vol. 49, no. 2, pp. 107–114, 2004.
-

- [112] I. G. Cormack, P. Loza-Alvarez, L. Sarrado, S. Tomás, I. Amat-Roldan, L. Torner, D. Artigas, J. Guitart, J. Pera, and J. Ros, “Lost writing uncovered by laser two-photon fluorescence provides a terminus post quem for roman colonization of hispania citerior,” *J. Archaeol. Sci.*, vol. 34, no. 10, pp. 1594–1600, 2007.
- [113] G. Filippidis, E. J. Gualda, K. Melessanaki, and C. Fotakis, “Nonlinear imaging microscopy techniques as diagnostic tools for art conservation studies,” *Opt. Lett.*, vol. 33, no. 3, pp. 240–242, 2008.
- [114] T. E. Villafana, W. P. Brown, J. K. Delaney, M. Palmer, W. S. Warren, and M. C. Fischer, “Femtosecond pump-probe microscopy generates virtual cross-sections in historic artwork,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 111, no. 5, pp. 1708–1713, 2014.
- [115] P. Samineni, A. deCruz, T. E. Villafana, W. S. Warren, and M. C. Fischer, “Pump-probe imaging of historical pigments used in paintings,” *Opt. Lett.*, vol. 37, no. 8, pp. 1310–1312, 2012.
- [116] L. Robinet, S. Thao, M.-C. Schanne-Klein, and G. Latour, “The influence of manufacturing and alterations on skin-based artifacts as characterized by nonlinear optical microscopy,” in *ICOM-CC 18th Triennial Conference Preprints*, J. Bridgland, ed., 2017.
- [117] F. Pottier, A. Michelin, and L. Robinet, “Recovering illegible writings in fire-damaged medieval manuscripts through data treatment of uv-fluorescence photography,” *J. Cult. Herit.*, vol. 36, pp. 183–190, 2019.
- [118] L. Robinet, M. Schmeltz, and G. Latour, “Cartographier l’altération des parchemins - Émergence d’une nouvelle technique de microscopie,” in *Actes de la journée d’étude « Les rescapés du feu : l’imagerie scientifique au service des manuscrits de Chartres »*, Société Archéologique d’Eure-et-Loir, 2017.
- [119] L. Robinet, F. Pottier, M. Schmeltz, S. Heu-Thao, D. Poirel, C. Rabel, M.-C. Schanne-Klein, G. Latour, and A. Michelin, “Ces manuscrits que l’on croyait perdus – la renaissance des manuscrits de chartres,” *Support tracé*, vol. 18, pp. 12–21, 2018.
- [120] P. Budrugaec, E. Badea, G. Della Gatta, L. Miu, and A. Comănescu, “A DSC study of deterioration caused by environmental chemical pollutants to parchment, a collagen-based material,” *Thermochim. Acta*, vol. 500, no. 1-2, pp. 51–62, 2010.
- [121] E. Badea, G. Della Gatta, and T. Usacheva, “Effects of temperature and relative humidity on fibrillar collagen in parchment : a micro differential scanning calorimetry (micro DSC) study,” *Polym. Degrad. Stabil.*, vol. 97, no. 3, pp. 346–353, 2012.
- [122] C. A. Miles, N. C. Avery, V. V. Rodin, and A. J. Bailey, “The increase in denaturation temperature following cross-linking of collagen is caused by dehydration of the fibres,” *J. Mol. Biol.*, vol. 346, no. 2, pp. 551–556, 2005.
- [123] Y. K. Lin and D. C. Liu, “Comparison of physical–chemical properties of type i collagen from different species,” *Food Chem.*, vol. 99, no. 2, pp. 244–251, 2006.
- [124] B. Thomas, D. McIntosh, T. Fildes, L. Smith, F. Hargrave, M. Islam, T. Thompson, R. Layfield, D. Scott, B. Shaw, *et al.*, “Second-harmonic generation imaging of collagen in ancient bone,” *Bone Rep.*, vol. 7, pp. 137–144, 2017.
- [125] J. P. Whitcher, M. Srinivasan, and M. P. Upadhyay, “Corneal blindness : a global perspective,” *Bull. World Health Organ.*, vol. 79, pp. 214–221, 2001.

-
- [126] N. Pinnamaneni and J. L. Funderburgh, “Concise review : stem cells in the corneal stroma,” *Stem cells*, vol. 30, no. 6, pp. 1059–1063, 2012.
- [127] J. V. Jester, W. M. Petroll, and H. D. Cavanagh, “Corneal stromal wound healing in refractive surgery : the role of myofibroblasts,” *Prog. Retin. Eye Res.*, vol. 18, no. 3, pp. 311–356, 1999.
- [128] Y. S. Rabinowitz, “Keratoconus,” *Surv. Ophthalmol.*, vol. 42, no. 4, pp. 297–319, 1998.
- [129] K. M. Meek, S. J. Tuft, Y. Huang, P. S. Gill, S. Hayes, R. H. Newton, and A. J. Bron, “Changes in collagen orientation and distribution in keratoconus corneas,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 46, no. 6, pp. 1948–1956, 2005.
- [130] N. Morishige, A. J. Wahlert, M. C. Kenney, D. J. Brown, K. Kawamoto, T.-i. Chikama, T. Nishida, and J. V. Jester, “Second-harmonic imaging microscopy of normal human and keratoconus cornea,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 48, no. 3, pp. 1087–1094, 2007.
- [131] N. Morishige, H. Azumi, H. Ohta, Y. Morita, N. Yamada, K. Kimura, A. Takahara, K.-H. Sonoda, *et al.*, “Quantitative analysis of collagen lamellae in the normal and keratoconic human cornea by second harmonic generation imaging microscopy,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 55, no. 12, pp. 8377–8385, 2014.
- [132] R. Mercatelli, F. Ratto, F. Rossi, F. Tatini, L. Menabuoni, A. Malandrini, R. Nicoletti, R. Pini, F. S. Pavone, and R. Cicchi, “Three-dimensional mapping of the orientation of collagen corneal lamellae in healthy and keratoconic human corneas using SHG microscopy,” *J. Biophotonics*, vol. 10, no. 1, pp. 75–83, 2017.
- [133] A. Batista, H. G. Breunig, A. König, A. Schindele, T. Hager, B. Seitz, and K. König, “High-resolution, label-free two-photon imaging of diseased human corneas,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 23, no. 3, p. 036002, 2018.
- [134] M. Bied, *Étude de la structure du stroma cornéen par microscopie par génération de seconde harmonique résolue en polarisation dans le cadre de la recherche sur le kératocône*. Rapport de stage m1 au lob, Univ. Paris-Sud, 2019.
- [135] C. Schmucker and F. Schaeffel, “A paraxial schematic eye model for the growing c57bl/6 mouse,” *Vis. Res.*, vol. 44, no. 16, pp. 1857–1867, 2004.
- [136] E.-P. Zhang, S. Schründer, and F. Hoffmann, “Orthotopic corneal transplantation in the mouse—a new surgical technique with minimal endothelial cell loss,” *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 234, no. 11, pp. 714–719, 1996.
- [137] S. Hayes, C. Boote, J. Lewis, J. Sheppard, M. Abahussin, A. J. Quantock, C. Purslow, M. Votruba, and K. M. Meek, “Comparative study of fibrillar collagen arrangement in the corneas of primates and other mammals,” *Anat. Rec.*, vol. 290, no. 12, pp. 1542–1550, 2007.
- [138] K. M. Meek and D. W. Leonard, “Ultrastructure of the corneal stroma : a comparative study,” *Biophys. J.*, vol. 64, no. 1, pp. 273–280, 1993.
- [139] M. Winkler, G. Shoa, S. T. Tran, Y. Xie, S. Thomasy, V. K. Raghunathan, C. Murphy, D. J. Brown, and J. V. Jester, “A comparative study of vertebrate corneal structure : the evolution of a refractive lens,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 56, no. 4, pp. 2764–2772, 2015.
- [140] A. Tidu, D. Ghoubay-Benallaoua, B. Lunch, B. Haye, C. Illoul, J.-M. Allain, V. Borderie, and Mosser, “Development of human corneal epithelium on organized fibrillated transparent collagen matrices synthesized at high concentration Aurélien,” *Acta Biomaterialia*, 2015.
-

- [141] S. Mi and C. J. Connon, “The formation of a tissue-engineered cornea using plastically compressed collagen scaffolds and limbal stem cells,” in *Corneal Regenerative Medicine*, pp. 143–155, Springer, 2013.
- [142] D. Ghoubay-Benalloua, *Traitement des pathologies cornéennes par thérapie cellulaire et bioingénierie tissulaire*. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie, Déc. 2017.
- [143] G. Ducourthial, P. Leclerc, T. Mansuryan, M. Fabert, J. Brevier, R. Habert, F. Braud, R. Batrin, C. Vever-Bizet, G. Bourg-Heckly, *et al.*, “Development of a real-time flexible multiphoton microendoscope for label-free imaging in a live animal,” *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 18303, 2015.
- [144] L. Pasteur and P. Vallery-Radot, *Œuvres de Pasteur : Dissymétrie moléculaire. 1922*, vol. 1. Masson et cie, 1922.
- [145] L. Friedman and J. G. Miller, “Odor incongruity and chirality,” *Science*, vol. 172, no. 3987, pp. 1044–1046, 1971.
- [146] S. L. Miller, “Production of some organic compounds under possible primitive earth conditions,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 77, no. 9, pp. 2351–2361, 1955.
- [147] R. S. Bhatnagar and C. A. Gough, *Circular Dichroism of Collagen and Related Polypeptides*, pp. 183–199. Boston, MA : Springer US, 1996.
- [148] N. Sreerama and R. W. Woody, *Circular dichroism of peptides and proteins*. Wiley-VCH, 2000.
- [149] J. Hicks and T. Petralli-Mallow, “Nonlinear optics of chiral surface systems,” *Appl. Phys. B*, vol. 68, no. 3, pp. 589–593, 1999.
- [150] T. Petralli-Mallow, T. Wong, J. Byers, H. Yee, and J. Hicks, “Circular dichroism spectroscopy at interfaces : a surface second harmonic generation study,” *J. Phys. Chem.*, vol. 97, no. 7, pp. 1383–1388, 1993.
- [151] M. Kauranen, S. Verbiest, J. J. Maki, and A. Persoons, “Second-harmonic generation from chiral surfaces,” *J. Chem. Phys.*, vol. 101, no. 9, pp. 8193–8199, 1994.
- [152] J. D. Byers, H. I. Yee, T. Petralli-Mallow, and J. M. Hicks, “2nd-harmonic generation circular-dichroism spectroscopy from chiral monolayers,” *Phys. Rev. B*, vol. 49, no. 20, pp. 14643–14647, 1994.
- [153] J. Byers, H. Yee, and J. Hicks, “A second harmonic generation analog of optical rotatory dispersion for the study of chiral monolayers,” *J. Chem. Phys.*, vol. 101, no. 7, pp. 6233–6241, 1994.
- [154] J. J. Maki, M. Kauranen, and A. Persoons, “Surface second-harmonic generation from chiral materials,” *Phys. Rev. B*, vol. 51, no. 3, p. 1425, 1995.
- [155] M.-C. Schanne-Klein, F. Hache, A. Roy, C. Flytzanis, and C. Payraastre, “Off resonance second order optical activity of isotropic layers of chiral molecules : observation of electric and magnetic contributions,” *J. Chem. Phys.*, vol. 108, pp. 9436–9443, 1998.
- [156] F. Hache, H. Mesnil, and M. C. Schanne-Klein, “Application of classical models of chirality to surface second harmonic generation,” *J. Chem. Phys.*, vol. 115, no. 14, pp. 6707–6715, 2001.
- [157] T. Verbiest, M. Kauranen, Y. Van Rompaey, and A. Persoons, “Optical activity of anisotropic achiral surfaces,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 77, no. 8, p. 1456, 1996.

-
- [158] M. J. Huttunen, M. Virkki, M. Erkiñtalo, E. Vuorimaa, A. Efimov, H. Lemmetyinen, and M. Kauranen, "Absolute probe of surface chirality based on focused circularly polarized light," *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 1, no. 12, pp. 1826–1829, 2010.
- [159] G. Y. Zhuo, H. Lee, K. J. Hsu, M. J. Huttunen, M. Kauranen, Y. Y. Lin, and S. W. Chu, "Three-dimensional structural imaging of starch granules by second-harmonic generation circular dichroism," *J. Microsc.*, vol. 253, no. 3, pp. 183–90, 2014.
- [160] M. J. Huttunen, M. Partanen, G. Bautista, S.-W. Chu, and M. Kauranen, "Nonlinear optical activity effects in complex anisotropic three-dimensional media," *Opt. Mater. Express*, vol. 5, no. 1, p. 11, 2015.
- [161] K. R. Campbell and P. J. Campagnola, "Wavelength-Dependent Second Harmonic Generation Circular Dichroism for Differentiation of Col I and Col III Isoforms in Stromal Models of Ovarian Cancer Based on Intrinsic Chirality Differences," *J. Phys. Chem. B*, vol. 121, no. 8, pp. 1749–1757, 2017.
- [162] M. Schmeltz, C. Teulon, G. Latour, D. Ghoubay, V. Borderie, C. Aimé, and M.-C. Schanne-Klein, "Implementation of artifact-free circular dichroism SHG imaging of collagen," *Opt. Express*, vol. 27, pp. 22685–22699, Aug 2019.
- [163] P.-J. Su, W.-L. Chen, Y.-F. Chen, and C.-Y. Dong, "Determination of collagen nanostructure from second-order susceptibility tensor analysis," *Biophys. J.*, vol. 100, pp. 2053–62, apr 2011.
- [164] X. Y. Dow, E. L. DeWalt, S. Z. Sullivan, P. D. Schmitt, J. R. W. Ulcickas, and G. J. Simpson, "Imaging the nonlinear susceptibility tensor of collagen by nonlinear optical stokes ellipsometry," *Biophys. J.*, vol. 111, no. 7, pp. 1361–1374, 2016.
- [165] V. G. Dmitriev, G. G. Gurzadyan, and D. N. Nikogosyan, *Handbook of Nonlinear Optical Crystals*, vol. 45. Springer, 3d edition ed., 1999.
- [166] S. Bancelin, C. Aimé, I. Gusachenko, L. Kowalczyk, G. Latour, T. Coradin, and M.-C. Schanne-Klein, "Determination of collagen fibril size via absolute measurements of second-harmonic generation signals," *Nat. Commun.*, vol. 5, 2014.
- [167] F. Gobeaux, G. Mosser, A. Anglo, P. Panine, P. Davidson, M.-M. Giraud-Guille, and E. Belamie, "Fibrillogenesis in dense collagen solutions : a physicochemical study," *J. Mol. Biol.*, vol. 376, no. 5, pp. 1509–1522, 2008.
- [168] I. Bergman and R. Loxley, "Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline," *Anal. Chem.*, vol. 35, no. 12, pp. 1961–1965, 1963.
- [169] A. Golaraei, *Polarimetric Second-Harmonic Generation Microscopy for Histopathology*. Phd thesis, University of Toronto, 2018.
- [170] G. Wagnière, *Linear and Nonlinear Optical Properties of Molecules*. Helvetica Chimica Acta, Helvetica Chimica Acta, 1993.
- [171] T. P. Petralli-Mallow, T. M. Wong, J. D. Byers, H. I. Yee, and J. M. Hicks, "Circular dichroism spectroscopy at interfaces : a surface second harmonic generation study," *J. Phys. Chem.*, vol. 97, pp. 1383–1388, 1993.
- [172] M. Kauranen, T. Verbiest, and A. Persoons, "Chiral materials in second-order nonlinear optics," *J. Nonlinear Opt. Phys.*, vol. 8, no. 02, pp. 171–189, 1999.
- [173] M.-C. Schanne-Klein, F. Hache, T. Brotin, C. Andraud, and A. Collet, "Magnetic chiroptical effects in surface second harmonic reflection," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 338, pp. 159–166, 2001.

- [174] M.-C. Schanne-Klein, T. Boulesteix, F. Hache, M. Alexandre, G. Lemerrier, and C. Andraud, “Strong chiroptical effects in surface second harmonic generation obtained for molecules exhibiting excitonic coupling chirality,” *Chem. Phys. Lett.*, vol. 362, pp. 103–108, 2002.
- [175] M. Kauranen, J. J. Maki, T. Verbiest, S. Van Elshocht, and A. Persoons, “Quantitative determination of electric and magnetic second-order susceptibility tensors of chiral surfaces,” *Phys. Rev. B*, vol. 55, pp. R1985–R1988, Jan 1997.
- [176] P. Thevenaz, U. E. Ruttimann, and M. Unser, “A pyramid approach to subpixel registration based on intensity,” *IEEE Trans. Image Process.*, vol. 7, no. 1, pp. 27–41, 1998.
- [177] M. Pinsard, M. Schmeltz, J. van der Kolk, S. A. Patten, H. Ibrahim, L. Ramunno, M.-C. Schanne-Klein, and F. Légaré, “Elimination of imaging artifacts in second harmonic generation microscopy using interferometry,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 10, pp. 3938–3952, Aug 2019.
- [178] P. Rechsteiner, J. Hulliger, and M. Flörsheimer, “Phase-sensitive second harmonic microscopy reveals bipolar twinning of markov-type molecular crystals,” *Chem. Mater.*, vol. 12, no. 11, pp. 3296–3300, 2000.
- [179] S. Yazdanfar, L. H. Laiho, and P. T. So, “Interferometric second harmonic generation microscopy,” *Opt. Express*, vol. 12, no. 12, pp. 2739–2745, 2004.
- [180] M. Rivard, C.-A. Couture, A. K. Miri, M. Laliberté, A. Bertrand-Grenier, L. Mongeau, and F. Légaré, “Imaging the bipolarity of myosin filaments with Interferometric Second Harmonic Generation microscopy,” *Biom. Opt. Express*, vol. 4, no. 10, pp. 2078–86, 2013.
- [181] M. Rivard, K. Popov, C.-A. Couture, M. Laliberté, A. Bertrand-Grenier, F. Martin, H. Pépin, C. P. Pfeffer, C. Brown, L. Ramunno, and F. Légaré, “Imaging the noncentrosymmetric structural organization of tendon with Interferometric Second Harmonic Generation microscopy,” *J. Biophotonics*, vol. 7, no. 8, pp. 638–646, 2014.
- [182] S. Bancelin, C. A. Couture, K. Légaré, M. Pinsard, M. Rivard, C. Brown, and F. Légaré, “Fast interferometric second harmonic generation microscopy,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 7, no. 2, pp. 399–408, 2016.

Titre : Microscopie de second harmonique résolue en polarisations linéaire et circulaire pour caractériser l'organisation 3D du collagène

Mots clés : Microscopie SHG, Dichroïsme Circulaire, Polarisation, Collagène, Cornée, Parchemin.

Résumé : Le collagène est un élément majeur de l'architecture des organes chez les mammifères où il forme diverses structures tridimensionnelles propres à chaque tissu. La visualisation de cette organisation 3D multi-échelle est cruciale pour comprendre la structuration d'organes tels que la cornée ou la peau et ainsi guider l'ingénierie de tissus artificiels, qui doivent être structurés de manière appropriée pour être fonctionnels. De plus, la caractérisation quantitative de désordres tissulaires lors de pathologies constitue un enjeu biomédical majeur. La microscopie SHG est reconnue depuis plusieurs années comme la technique de référence pour imager in situ et avec un excellent contraste le collagène fibrillaire dans des tissus sans marquage. Cette thèse présente la mise en place et l'application de nouvelles modalités de microscopie SHG fondées sur la polarisation, visant à obtenir des paramètres fiables et quantitatifs pour décrire plus précisément la structure tridimensionnelle du collagène.

Tout d'abord, nous présentons une modalité utilisant des polarisations incidentes linéaires (P-SHG) pour analyser l'organisation multi-échelle du collagène dans divers tissus, sains et pathologiques. D'une part, tirant parti du caractère non invasif de cette modalité, nous caractérisons

la dégradation du collagène dans des parchemins (constitués de collagène de peaux animales), précieux objets d'art et d'Histoire, démontrant ainsi l'intérêt de la microscopie SHG dans le domaine du patrimoine, notamment pour des diagnostics de l'état de conservation des objets riches en collagène. D'autre part, une imagerie quantitative de cornées humaines saines est présentée, et comparée à des cornées présentant un kératocône, pathologie courante aujourd'hui. Des modèles murins de kératocônes cornéens sont également étudiés, dans le but de valider leur pertinence.

Enfin, une modalité utilisant des polarisations incidentes circulaires pour mesurer des signaux de dichroïsme circulaire (CD-SHG) est exposée. Dans un premier temps, nous présentons la mise en place expérimentale rigoureuse de cette modalité, en identifiant et corrigeant des artefacts typiques de cette technique. Dans un second temps, nous proposons une nouvelle approche théorique pour décrire les signaux de CD-SHG. Les simulations numériques de l'expression analytique obtenue sont comparées aux résultats expérimentaux, dans le but de comprendre l'évolution des signaux de CD-SHG en fonction de l'architecture 3D du collagène.

Titre : Linear and circular polarization-resolved SHG microscopy to characterize the 3D organization of collagen

Keywords : SHG Microscopy, Circular Dichroism, Polarization, Collagen, Cornea, Parchment.

Abstract : Collagen is a major component of organ architecture in mammals where it forms various three-dimensional structures specific to each tissue. The visualization of this multi-scale 3D organization is crucial to decipher the structure of organs such as the cornea or the skin and to guide the engineering fully functional tissue substitutes. Moreover, a quantitative characterization of tissue disorders occurring in diseases is a major biomedical issue. SHG microscopy has been recognized for several years as the gold-standard technique to image fibrillar collagen in situ in unmarked tissues with excellent contrast. This thesis presents the development and the application of new polarization-based SHG microscopy modalities to obtain reliable and quantitative parameters in order to more accurately describe the three-dimensional structure of collagen.

First, we present a modality using linear incident polarizations (P-SHG) to analyze the multi-scale organization of collagen in various tissues, healthy and pathological. On one hand, taking advantage of the non-invasive nature

of this modality, we characterize the degradation of collagen in ancient parchments (made of collagen from animal skins), precious objects of art and history. This proves the interest of SHG microscopy in the field of cultural heritage, particularly to decipher the state of conservation of objects rich in collagen. On the other hand, quantitative imaging of healthy human corneas is presented, and compared to corneas with keratoconus, a common pathology today. Murine models of corneal keratoconus are also being studied to validate their relevance.

Finally, a modality using circular incident polarizations to measure circular dichroism signals (CD-SHG) is exposed. First, we present the rigorous experimental implementation of this modality, by identifying and correcting typical artifacts of this technique. Secondly, we propose a new theoretical approach to describe CD-SHG signals. Numerical simulations of the obtained analytical expression are compared to experimental results in order to understand the evolution of CD-SHG signals with the 3D architecture of collagen.

