



**HAL**  
open science

# Microscopie par génération de troisième harmonique résolue en polarisation pour l'imagerie de la myéline et des biocristaux

Joséphine Morizet

► **To cite this version:**

Joséphine Morizet. Microscopie par génération de troisième harmonique résolue en polarisation pour l'imagerie de la myéline et des biocristaux. Optique [physics.optics]. Institut Polytechnique de Paris, 2020. Français. NNT : 2020IPPAX011 . tel-03588543

**HAL Id: tel-03588543**

**<https://theses.hal.science/tel-03588543>**

Submitted on 25 Feb 2022

**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.



INSTITUT  
POLYTECHNIQUE  
DE PARIS

NNT : 2021PPAX011

Thèse de doctorat



# Microscopie par génération de troisième harmonique résolue en polarisation pour l'imagerie de la myéline et des biocristaux

Thèse de doctorat de l'Institut Polytechnique de Paris  
préparée à École polytechnique

École doctorale n°626 École doctorale de l'Institut Polytechnique de Paris (EDIPP)  
Spécialité de doctorat : Physique

Thèse présentée et soutenue à Palaiseau, le 24 février 2020, par

**JOSÉPHINE MORIZET**

Composition du Jury :

Mme Agnès MAITRE Professeur, Paris Sciences et Lettres	Présidente
M. Laurent BOURDIEU DR CNRS, Ecole Normale Supérieure	Rapporteur
Mme Alexandra FRAGOLA MC, Sorbonne Université	Rapporteuse
M. Bruno STANKOFF PU-PH, Sorbonne Université	Examineur
M. Emmanuel BEAUREPAIRE DR CNRS, IPParis	Directeur de thèse
Mme Chiara STRINGARI CR CNRS, IPParis	Co-directrice de thèse





---

## Remerciements

Ces quatre années passées au laboratoire ont été un temps riche en quêtes, interrogations et découvertes scientifiques indissociables des belles rencontres qui s’y sont faites. L’écriture du manuscrit a également été un bel et intense exercice de conceptualisation d’idées qui m’aidera - j’espère - à appréhender avec aisance d’autres champs de recherche !

Merci tout d’abord à mes directeurs de thèse - Chiara et Emmanuel - de m’avoir accordé votre confiance pour partir explorer ce beau sujet à la croisée de l’optique non-linéaire et de la biologie. Merci de m’avoir confié un microscope coopératif et d’avoir mis à ma disposition des ressources optiques et biologiques inépuisables tout au long de ma thèse. Merci surtout d’offrir cet exemple éblouissant d’imagination pour penser des projets merveilleux et ce précieux talent d’orfèvre pour ciseler avec justesse les mots et les idées.

Merci ensuite aux membres de mon jury d’avoir participé à ma soutenance et merci pour l’intérêt que vous avez manifesté pour mon travail de thèse : Agnès Maître - la présidente du jury - les rapporteurs Alexandra Fragola et Laurent Bourdieu - qui a également été membre de mon comité de suivi - et Bruno Stankoff, notre collaborateur. Merci pour vos remarques et suggestions pendant la discussion, le beau rapport que vous écrit et pour votre enthousiasme !

Merci à ceux avec lesquels j’ai eu l’occasion de travailler au cours de ma thèse : un merci particulier à Nicolas O. pour ce fabuleux travail de modélisation numérique qui donne toute sa profondeur à l’exploration des réponses polarimétriques sur des systèmes modèles et des structures biologiques. Merci pour les échanges scientifiques si intéressants et merci pour sa disponibilité !

Merci à nos collaborateurs de l’ICM - Anne, Marie-Stéphane et Bruno - qui ont eu la patience de nous partager leur connaissance sur la myéline, leur curiosité pour l’imagerie THG et avec qui j’ai été très heureuse de travailler.

Merci à tous les membres du laboratoire qui ont chacun participé à donner leurs couleurs aux journées passées à bord du navire du LOB.

Je voudrais remercier notre capitaine François Hache, directeur du LOB et directeur de l’école doctorale Interfaces, qui tient vaillamment la barre de l’embarcation du LOB.

Merci à l’ensemble des membres de l’équipe microscopie, Marie-Claire, pour son expertise tensorielle fantastique, à Gaël – qui m’a transmis son enthousiasme pour l’enseignement de l’optique, Pierre, le maître *es labview* universel, à Willy – l’expert des groupmeetings réels et virtuels, Anatole, Karsten, Guilhem, Nicolas D. et Debora.

Merci à Xavier qui a eu la gentillesse d’intervenir avec la vitesse de l’éclair lorsque j’avais besoin de ses conseils avisés, et à Jean-Marc à qui je dois les belles pièces de mon microscope ! Merci à Emilie qui prend soin des poissons et les sauve d’une hypoglycémie certaine en ces temps exceptionnels de covid ! Merci à Laure et Christelle qui m’ont gentiment dépatouillée d’imbroglios administratifs !

Merci à tous mes coéquipiers de bureau, à Thuy et au petit Léo qui grandit bien vite, à Lien à l’âme pleine de sagesse, à Lipsa l’entrepreneuse intrépide, à Guillaume l’amical flambeur impénitent, à Hélène la vraie docteure et à Paul qui a dépoussiéré le vieux débat French oder English.

---

Merci à tous les gentils moussaillons avec lesquels j'ai traversé la thèse, Romain – qui jamais (de mémoire de femme-homme) ne s'est départi de son calme légendaire et m'a gentiment aidé à compiler mon code latex, à Margaux – à la grande âme humaine et aventureuse, Mayla – qui nous a fait découvrir les pâtisseries libanaises et Yoann et Nicolas P qui se sont courageusement lancés dans une seconde carrière d'enseignement.

Merci aux anciens matelots qui étaient à bord à mon arrivée au laboratoire, merci à Guillaume D. pour sa bonne humeur et pour m'avoir transmis ses précieux programmes de commande de l'EOM, Mouna – la star des crêpes parties, Floriane, Claire, Marianne, Alice, Marco – avec des joyeux souvenirs de la conférence du SCOP, Olga et Chao.

Merci aux moussaillons arrivés ensuite, à Júlia dont l'immense enthousiasme sait métamorphoser des cumulonimbus photoniques en radieuses harmoniques bleutées, à Clothilde - au don magnifique de révéler l'éblouissante polychromie de la cornée, à Son - à l'exceptionnel pouvoir de focalisation lorsque je venais papoter dans son bureau, à Sophie - pour son incroyable gentillesse et son exquis chocolat-poire, à Arthur – grand maître du jeu, Kévin - chapeau pour son talent à mener de front plusieurs vies, Vincent - le défenseur des poissons attaqués avec des photons, Xiujun, Dam-Bé, Anastasia, Hugo, Maëlle, Seongbin, Bo, Fanny – merci pour les coquillages! - et à tous les nouveaux, à Auriane, Maxime et Bahar à qui je souhaite bon vent pour sa thèse! Merci à tous pour votre soutien pendant la période de rédaction! Et à ceux qui sont passés fugitivement sur le bateau, Oscar, Sem, Coline et Dale – the craziest pizza guy ever met.

A tous ceux qui dessinent courageusement un monde meilleur, à Antigoni et Robby qui œuvrent pour accorder le travail au féminin, à Ernan qui a eu la sacrée audace d'initier le labo à la permaculture et par là de nous engager dans une profonde réflexion sur une nécessaire transition sociale et écologique.

A la team du badminton, Roxane, Hubert, Guillaume et Stéphane avec laquelle j'ai partagé de chouettes moments!

Et à tous ceux que je n'ai pas encore remerciés, Rivo, Caroline, Hannu, Alexei, Stéphane, Michel, Jean-Christophe, Adeline, Cédric, Pascale, Manuel, Ursula, Marten et Isabelle.

A la team Lumedix, Gérald, Max et Pascal.

Merci à mes amis, à Eloi avec qui j'ai partagé un bout de chemin de vie, aux amis de supoptique, à Marie, Léo, Catherine, Liem, Lina, Claire, Sylvain et Alix, Robin, aux amis d'un temps plus lointain, Clémence, Ophélie, Robert, Giuliano, à mes voisins Julien, Alexandre, Magda, Stéphane et Françoise.

Merci à ma famille, à mes parents, à ma sœur Hélo, à mes grands-parents, à ma cousine Auriane, William, et à Anne pour leur affection, leur tendresse indéfectible et leurs encouragements lorsque mon courage venait à s'essouffler.

Merci à Séraphin.e à qui je dois quelques typos accidentelles par ses joyeux sautilllements sur les touches du clavier.

Une dernière et ultime petite pensée à tous les poissons et souris anonymes qui - malheureusement - n'ont pas pu sauver leur peau après des expériences.

# Introduction

Ce travail de thèse a été effectué sous la direction de Chiara Stringari et d’Emmanuel Beaurepaire au sein du laboratoire d’Optique et Biosciences (LOB), dans l’équipe “Microscopies avancées et physiologie des tissus” qui développe des méthodes d’imagerie quantitative des tissus en évolution, en particulier par microscopie multiphotonique.

Ce travail porte sur l’imagerie de biocristaux et de tissus biologiques myélinisés par génération de troisième harmonique (THG). Cette technique d’imagerie non-linéaire cohérente permet notamment de visualiser les interfaces, les hétérogénéités et les structures biréfringentes avec une résolution submicrométrique. Le contraste THG s’avère particulièrement intéressant pour l’imagerie des tissus myélinisés non marqués grâce à sa grande sensibilité aux interfaces entre des milieux lipidiques et aqueux. Cependant, bien que quelques preuves de principe aient été présentées dans la littérature, ces études restent préliminaires et qualitatives, notamment en ce qui concerne l’analyse du contraste THG.

Le but de ce travail a été de caractériser la réponse THG résolue en polarisation sur les axones myélinisés pour évaluer sa capacité à sonder la microstructure de la gaine de myéline. Cette étude s’inscrit dans la continuité d’un travail effectué au LOB et publié en 2013 par Zimmerley et al., qui avait montré l’intérêt du contraste THG polarimétrique (PTHG) pour sonder l’ordre moléculaire d’assemblées lipidiques multilamellaires. Pour comprendre plus précisément les contrastes THG et PTHG qui émergent des axones myélinisés de tissus normaux ou pathologiques, nous avons cherché à caractériser le contraste THG polarimétrique analytiquement, numériquement et expérimentalement. Nous avons également développé un système d’imagerie THG polarimétrique rapide adapté à l’imagerie d’échantillons *in vivo* et une méthode d’analyse de ces signaux par transformée de Fourier. Enfin, nous avons exploré les réponses THG et THG polarimétriques observées *in vivo* sur le poisson-zèbre entre deux et cinq jours, et *ex vivo* sur la souris en collaboration avec l’équipe de Bruno Stankoff à l’Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM), spécialisée dans les mécanismes de réparation et dégradation de la myéline dans les pathologies comme la sclérose en plaques.

Dans ce manuscrit, nous abordons des domaines complémentaires qui concernent les aspects fondamentaux de la THG polarimétrique, les aspects technologiques expérimentaux et les applications biologiques. Nous laissons le lecteur guider sa lecture selon ses centres d’intérêt : le chapitre I introduit le sujet avec une brève description des tissus myélinisés et du contraste THG. Le chapitre II présente une description théorique et expérimentale du contraste THG polarimétrique, le chapitre III décrit la mise en place de la microscopie P-THG rapide et ses applications, et enfin le chapitre IV présente un travail systématique de caractérisation des contrastes THG et PTHG émergeant de fibres myélinisées.

## Chapitre 1 :

Ce premier chapitre fait une brève introduction à la biologie des axones myélinisés et à la pathologie de la sclérose en plaques, qui serviront de toile de fond au manuscrit. Les deux parties suivantes passent en revue les techniques d’imagerie des tissus myélinisés et les techniques d’imagerie multiphotoniques appliquées à l’imagerie des tissus myélinisés. Enfin, une dernière partie introduit les aspects fondamentaux du mécanisme de contraste THG auxquels nous ferons référence dans les chapitres suivants.

## **Chapitre 2 :**

Le second chapitre s'intéresse au mécanisme de contraste THG résolu en polarisation généré sur des milieux anisotropes, qui permet en principe de sonder les propriétés d'organisation submicrométrique de ces structures. Le contraste THG repose en effet sur les propriétés d'anisotropie linéaires (indice optique  $n$ ) et non-linéaires (réponse THG) des échantillons à l'échelle du volume focal du laser d'excitation. Nous proposons un formalisme qui permet d'unifier les descriptions rapportées dans la littérature pour décrire les signaux générés dans le volume et sur les interfaces de matériaux anisotropes. Nous présentons ensuite des résultats expérimentaux et numériques qui rapportent la présence d'artefacts induits par les différences d'indices linéaires sur la réponse PTHG lorsque le faisceau se propage sur des interfaces parallèles à l'axe de propagation. Nous discutons enfin la capacité à détecter l'ordre moléculaire à partir du signal PTHG issu d'interfaces verticales pour la détermination de l'ordre moléculaire et de l'orientation cristalline. Ces résultats profitent à la caractérisation de la réponse PTHG sur la myéline qui est abordée dans le chapitre 4, mais également à la caractérisation de biominéraux, comme les otolithes brièvement abordés dans le chapitre 3.

## **Chapitre 3 :**

Le chapitre 3 décrit la mise en place d'un système de microscopie PTHG rapide qui a pour objectif d'élargir le champ d'applications de la microscopie PTHG - jusqu'ici restreint à des échantillons immobiles ou faiblement dynamiques - à l'imagerie *in vivo* d'échantillons mobiles. Nous décrivons dans un premier temps la mise en place du système de commutation rapide de la polarisation basé sur l'installation d'un modulateur électro-optique, puis le développement d'une nouvelle méthode d'analyse des signaux PTHG par transformée de Fourier (FT-PTHG). Enfin, nous présentons des preuves de principes d'applications biologiques qui tirent profit de cette implémentation, comme la caractérisation de la désorganisation de l'ordre moléculaire dans des structures lipidiques soumises à un échauffement, et la détection *in situ* du caractère biréfringent de biocristaux.

## **Chapitre 4 :**

Le dernier chapitre aborde l'imagerie THG de la myéline à différentes échelles, depuis le tissu jusqu'à la fibre individuelle. Nous avons cherché à décrire les caractéristiques du contraste THG émergent de tissus myélinisés à partir de l'imagerie de tissus fixés du CNS de souris. Nous avons ensuite caractérisé l'évolution des contrastes THG et PTHG *in vivo* sur les axones myélinisés de la moelle épinière de poisson-zèbre entre 2 et 5 jours, puis nous avons ensuite cherché à comprendre l'origine physique du signal THG sur la myéline avec des expériences et des simulations numériques sur des structures cylindriques modèles. Enfin, nous présentons une application à l'imagerie THG de tissus vivants de cervelet de souris.

# Table des matières

<b>Remerciements</b>	<b>i</b>
<b>Introduction</b>	<b>iii</b>
<b>1 Techniques d'imagerie des tissus myélinisés</b>	<b>1</b>
1.1 La myéline dans le système nerveux central . . . . .	3
1.2 Techniques d'imagerie de la myéline . . . . .	13
1.3 Imagerie multiphotons : principes et applications à l'imagerie de la myéline . . .	22
1.4 Microscopie par Génération de Troisième Harmonique (THG) . . . . .	31
<b>2 Microscopie THG résolue en polarisation</b>	<b>47</b>
2.1 Contraste THG polarimétrique . . . . .	51
2.2 Dispositif PTHG expérimental . . . . .	61
2.3 Influence du désaccord d'indice linéaire sur la réponse PTHG issue d'une interface verticale . . . . .	64
2.4 Caractérisation de l'ordre lipidique dans des structures organisées . . . . .	76
2.5 Effets d'interfaces . . . . .	78
2.6 Résumé du chapitre 2 . . . . .	79
<b>3 Microscopie THG polarimétrique rapide pour l'imagerie <i>in vivo</i></b>	<b>81</b>
3.1 Choix du dispositif d'imagerie PTHG rapide . . . . .	84
3.2 Intégration d'un système de commutation rapide de la polarisation dans le mi- croscope . . . . .	88
3.3 Développement d'un système d'acquisition XPY . . . . .	101
3.4 Calibration des modalités de commutation PTHG et C-L-THG . . . . .	103
3.5 Analyse de l'ordre moléculaire de structures biologiques . . . . .	105
3.6 Détection <i>in vivo</i> des domaines biréfringents dans les matériaux biologiques . . .	117
3.7 Conclusion du chapitre 3 . . . . .	123
<b>4 Imagerie THG multi-échelle des tissus myélinisés dans le CNS de la souris et du poisson-zèbre</b>	<b>124</b>
4.1 Caractérisation des contrastes THG et P-THG dans le CNS de souris et du poisson-zèbre . . . . .	126
4.2 Imagerie THG du cervelet de souris sur un modèle de sclérose en plaques . . . .	165
<b>5 Conclusion</b>	<b>186</b>
5.1 Conclusion du travail de thèse . . . . .	186
5.2 Travail futur . . . . .	188

<b>A</b>	<b>Expression de la polarisation non-linéaire induite</b>	<b>190</b>
A.1	Matériau avec une symétrie hexagonale . . . . .	190
A.2	Matériau isotrope . . . . .	192
<b>B</b>	<b>Solution THG de l'équation d'onde</b>	<b>194</b>
B.1	Equation d'onde . . . . .	194
B.2	Equation d'onde non-linéaire . . . . .	195
B.3	Equation d'onde d'ordre 3 dans l'approximation paraxiale . . . . .	195
B.4	Résolution de l'équation d'onde pour des faisceaux gaussiens . . . . .	196
<b>C</b>	<b>Modèle de simulation semi-analytique</b>	<b>200</b>
<b>D</b>	<b>Réglage précis des lames d'ondes</b>	<b>202</b>
<b>E</b>	<b>Evolution du diamètre des axones myélinisés et de l'épaisseur de la gaine de myéline</b>	<b>204</b>
<b>F</b>	<b>Estimation des <math>\chi^{(3)}</math> des liquides</b>	<b>206</b>
<b>G</b>	<b>Matériel et méthodes</b>	<b>209</b>

# Chapitre 1

## Techniques d'imagerie des tissus myélinisés

### Sommaire

1.1	La myéline dans le système nerveux central	3
1.2	Techniques d'imagerie de la myéline	13
1.3	Imagerie multiphotons : principes et applications à l'imagerie de la myéline	22
1.4	Microscopie par Génération de Troisième Harmonique (THG)	31



L'évolution spécifique du système nerveux des vertébrés vers un réseau neuronal interconnecté complexe et performant est indissociable de l'apparition et de l'augmentation progressive du volume relatif de matière blanche. Le volume de matière blanche atteint ainsi jusqu'à 40 % du volume global d'un cerveau humain [1]. La matière blanche est essentiellement composée de denses faisceaux d'axones entourés d'une membrane lipidique multilamellaire appelée **gaine de myéline**. Cette structure cellulaire joue un rôle essentiel dans le fonctionnement des systèmes nerveux centraux et périphériques en réalisant plusieurs fonctions. Elle assure, d'une part, un support fonctionnel indispensable pour une **communication neuronale rapide, fiable et efficace** en accélérant la propagation des influx nerveux tout en minimisant l'apport en énergie nécessaire pour leur transmission grâce à la conduction saltatoire. D'autre part, la myéline est impliquée dans l'interaction entre les cellules gliales et l'axone (unité axone-glie), cruciale pour le **maintien de la santé axonale**, en subvenant aux besoins nutritionnels et métaboliques de l'axone et à la régulation de son homéostasie ionique. Par ailleurs, elle joue un rôle clé dans la **plasticité** des fonctions du système nerveux à travers la modulation de ses caractéristiques structurelles en fonction des signaux neuronaux transmis par l'axone selon l'expérience du sujet.

Compte tenu de l'importance capitale de la myéline dans le système nerveux, sa dégradation - et plus largement la présence de perturbations dans l'unité gliale-axone - sont à l'origine de manifestations neurologiques graves. En l'absence de remyélinisation, la démyélinisation induit des défauts de transmission des influx nerveux, et peut conduire à terme à une **neurodégénérescence du système nerveux** (mort des neurones) associée à une perte fonctionnelle et à l'apparition de **déficits neurologiques moteurs, cognitifs et sensoriels** handicapants comme dans la pathologie de la **sclérose en plaques**.

Il existe un certain nombre de techniques d'imagerie capables de décrire la **structure des fibres myélinisées du système nerveux** à diverses échelles, depuis l'architecture globale de la matière blanche jusqu'à l'ultrastructure de la gaine de myéline. Certaines de ces techniques sont également utilisées pour **diagnostiquer des changements pathologiques** comme la démyélinisation ou la remyélinisation de domaines du système nerveux qui interviennent pendant la progression de maladies neurodégénératives, et pour **évaluer l'efficacité de traitements remyélinisants ou anti-inflammatoires**. Cependant, il existe peu de techniques adaptées à l'imagerie des fibres individuelles sur des tissus épais dont l'invasivité soit suffisamment limitée pour qu'il soit possible d'observer des aspects dynamiques de démyélinisation ou de remyélinisation sur des tissus vivants.

Entre l'**imagerie par résonance magnétique (IRM)** - qui permet d'observer *in vivo* des organes entiers mais avec une faible résolution spatiale - et la **microscopie électronique** - adaptée pour l'observation de l'ultrastructure de la myéline mais fortement invasive, la **microscopie multiphoton** se positionne comme une technique adaptée pour **visualiser *in vivo* des axones myélinisés individuels** tout en préservant l'intégrité des tissus même épais. Face à la difficulté et au manque de fiabilité du marquage de la myéline, la **microscopie par génération de troisième harmonique (THG)**, qui est un contraste multiphotonique basé sur les propriétés optiques d'échantillons non marqués, se présente comme une technique prometteuse pour l'observation de tissus vivants intacts du système nerveux grâce à sa **forte sensibilité sur la myéline**.

Comme cette étude exploratoire entame un nouveau cycle de travail sur l'imagerie de la myéline en contraste multiphoton au sein du laboratoire, nous proposons dans une première partie de fournir une description de la **myéline dans le système nerveux**, élargie aux propriétés

structurelles et fonctionnelles des axones myélinisés, et aux changements pathologiques et physiologiques qui affectent le système nerveux de sujets atteints de sclérose en plaques (SEP). Une seconde partie propose une revue des principales **techniques d'imagerie de la myéline** actuellement utilisées en recherche, depuis les méthodes d'imagerie par résonance magnétique et de microscopie électronique, jusqu'aux techniques d'imagerie optique, avant d'introduire dans une troisième partie les principes et les applications des différentes **modalités multiphotoniques**. Après avoir positionné la **microscopie par génération de troisième harmonique** (THG) par rapport aux autres techniques multiphotons, la dernière partie a pour objectif de présenter brièvement son mécanisme de contraste, ses applications principales en biologie et les récents développements polarimétriques dont elle a fait l'objet.

## 1.1 La myéline dans le système nerveux central

Dans cette première partie, nous rappelons quelques éléments généraux sur l'architecture du système nerveux, les propriétés structurelles et fonctionnelles des axones myélinisés et les caractéristiques pathologiques de la sclérose en plaques.

### 1.1.1 Architecture du système nerveux

Le système nerveux est constitué de plusieurs centaines de milliards de neurones répartis dans deux structures spécifiques :

- le **système nerveux central** (CNS, de l'anglais *Central Nervous System*) qui englobe la moelle épinière et le cerveau (ce dernier compte à lui seul environ 86 milliards de neurones [2]).
- le **système nerveux périphérique** (PNS, *Peripheral Nervous System*) qui comprend l'ensemble des nerfs et des ganglions situés à l'extérieur du CNS.

La structure du CNS est constituée de deux substances, une première connue sous le nom de substance blanche (SB), qui doit sa couleur blanchâtre à sa forte densité en axones myélinisés, et la seconde - appelée substance grise (SG) - qui paraît plus sombre à cause de sa faible teneur en myéline. La **substance blanche** est en effet constituée majoritairement de faisceaux d'**axones myélinisés** (46 % d'axones et 24 % de myéline dans le cerveau humain), de **cellules gliales** (17 %) parmi lesquelles des astrocytes, oligodendrocytes et des cellules microgliales, et de **vaisseaux sanguins** et fluides des tissus (13 %). Elle est présente principalement dans le corps calleux, les nerfs optiques, le cervelet, le striatum, et dans les colonnes ventrales et dorsales de la moelle épinière. La **substance grise** (SG) comporte les mêmes structures cellulaires que la matière blanche mais dans des proportions différentes, auxquelles il faut rajouter la présence additionnelle des **corps cellulaires des neurones** et leur **arborescence dendritique**. La matière grise est présente majoritairement dans le cortex, le tronc cérébral, le cervelet et les colonnes grises de la moelle épinière.

La figure 1.1 illustre de manière schématique les principales structures cellulaires présentes dans le système nerveux central. La fonction des cellules gliales est d'assurer le développement correct des neurones et les fonctionnalités des neurones matures. La **microglie** et les macrophages assurent la surveillance immunitaire du CNS, les **astrocytes** - dont les extrémités sont en contact avec les axones - protègent la myéline et les axones, tandis que les **oligodendrocytes myélinisants** (*Oligos : quelques, dendron : arbre, kutos : cellule*) - décrits pour la première fois par Rio-Hortega dans les années 1920 - forment les gaines de myéline. Le rôle des **vaisseaux sanguins** qui vascularisent l'ensemble du système nerveux central est d'apporter la majorité des nutriments et des ions utilisés. Les axones myélinisés seront décrits extensivement dans la sous-partie suivante.

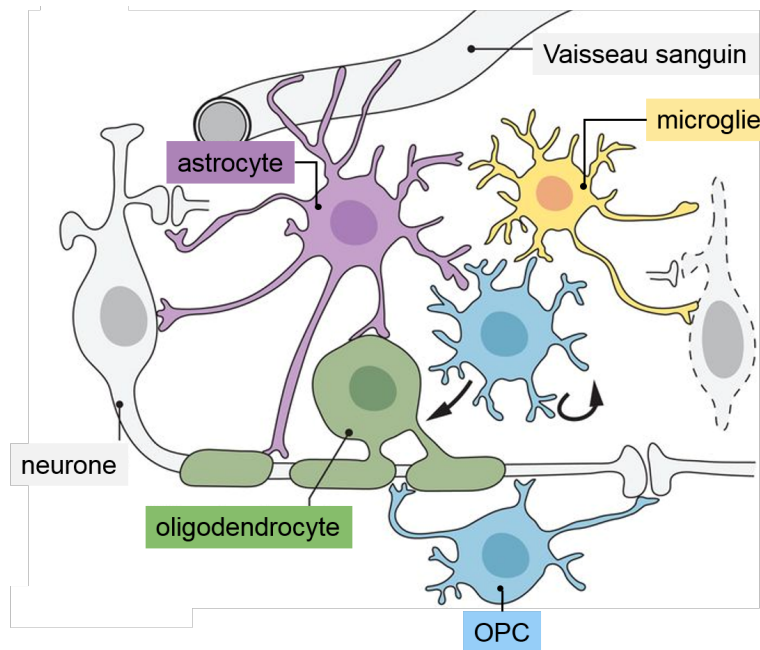


FIGURE 1.1 – Vue d'ensemble des interactions entre les cellules gliales, les neurones et les vaisseaux sanguins. Adapté de [3].

### 1.1.2 Structure et fonctions des axones myélinisés

La myéline est un enroulement de membrane lipidique présente autour des axones du CNS et du PNS des vertébrés. Nous allons ici décrire l'unité structurale des **axones myélinisés**, puis les **fonctions multiples de la gaine de myéline**, notamment son rôle dans l'isolation de l'axone avec le milieu environnant essentielle pour la conduction saltatoire des influx nerveux, sa fonction de support métabolique et de maintien de l'axone au sein de l'unité axone-gliale, et les processus de myélinisation intrinsèque et de myélinisation adaptative nécessaire à la plasticité neuronale. Nous nous limiterons ici à la description des caractéristiques des axones du CNS.

#### a) L'unité structurale des axones myélinisés

Dans ce paragraphe, nous allons rappeler les principales structures des axones myélinisés, en particulier le segment axonal initial, la gaine de myéline, les nœuds de Ranvier et l'axone, en nous appuyant sur le schéma de la figure 1.2.

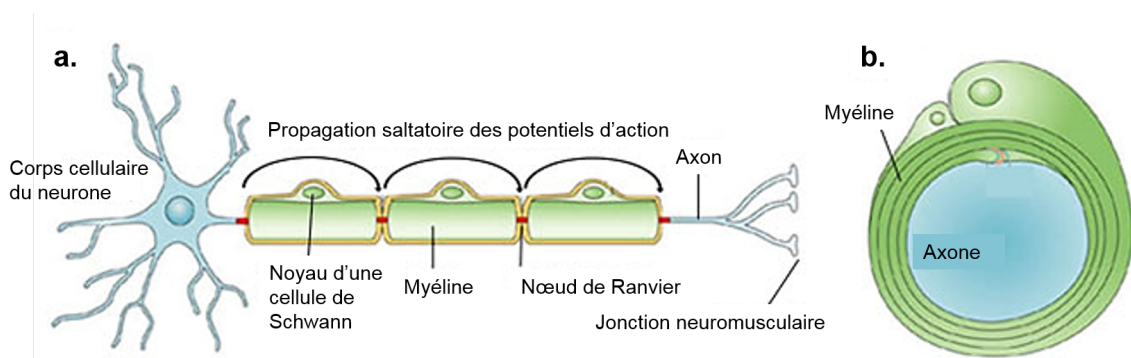


FIGURE 1.2 – Structure de l'axone myélinisé. Adapté de [4].

### - La gaine de myéline

Découverte par Virchow en 1854 [5], la gaine de myéline est une **structure multilamellaire riche en lipides** générée par des cellules myélinisantes appelées **oligodendrocytes** (dans le CNS). Elle est enroulée autour de l'axone sur lequel elle s'étend sous forme de segments appelés internœuds.

La myéline possède une composition unique, riche en lipides (70 % en masse sèche) et en protéines (30 %) [6]. Elle compte plus de 700 groupements lipidiques différents [7], parmi lesquels des **acides gras saturés**, des **phospholipides** qui forment la structure biomembranaire, du **cholestérol** qui joue un rôle dans l'assemblage et l'intégrité de la myéline et des lipides impliqués dans des mécanismes de signalisation. Parmi les protéines qui la composent, les principales sont la protéine basique de la myéline (MBP) essentielle à la compaction entre les membranes cytoplasmiques adjacentes, la protéine protéolipidique (PLP) qui joue un rôle dans l'apposition des bicouches via des interactions électrostatiques, et la glycoprotéine myéline-oligodendrocyte (MOG) qui assure l'intégrité structurelle de la gaine de myéline. Malgré une large conservation, la composition de la myéline présente de légères variations entre les espèces mammifères.

La microscopie électronique a donné accès à l'ultrastructure moléculaire de la gaine de myéline compacte, constituée d'un assemblage périodique de bicouches lipidiques (d'environ 4.5 nm d'épaisseur) et de deux couches protéiques adjacentes à la bicouche, l'une entre les surfaces cytoplasmiques (ligne dense principale d'épaisseur 3 nm), et l'autre entre les surfaces extracellulaires (ligne intrapériode d'épaisseur 3 nm), ce qui conduit à un motif de 15 nm d'épaisseur [8].

On peut enfin noter que même si l'ultrastructure de la myéline possède une forte capacité à se maintenir malgré des défauts dans ses lipides ou protéines, elle reste particulièrement vulnérable aux attaques répétées du système immunitaire dont elle est la cible dans les maladies auto-immunes et qui conduisent à sa destruction.

### - Les nœuds de Ranvier

Les nœuds de Ranvier correspondent à des **interruptions périodiques de la gaine de myéline** le long de l'axone sur de courtes portions de 0.8 – 1.1  $\mu\text{m}$ . Comme nous le verrons plus tard, ces domaines présentent une forte concentration en canaux sodiques (*Nav*) sensibles au voltage qui jouent un rôle primordial dans la conduction saltatoire des influx nerveux.

### - Axone

Le **cytosquelette axonal** est constitué de **filaments d'actine**, de **microtubules** et de **neurofilaments**. Les **filaments d'actine** s'organisent en faisceaux parallèles à l'axe de l'axone et lui confèrent ses propriétés d'élasticité et de stabilité. Les neurofilaments et les microtubules sont orientés parallèlement à l'axe de l'axone, leur diamètre est respectivement de 9 – 10 nm et 23 – 26 nm [9] et ils mesurent environ 100  $\mu\text{m}$  de long. Les **neurofilaments** - caractérisés par une structure semi-rigide - servent essentiellement à la croissance radiale de l'axone pendant le développement, le maintien du calibre de l'axone et la propagation des influx nerveux [10]. Les **microtubules** servent de matrice au transport axonal [11].

Le cytoplasme contenu dans l'axone - appelé **axoplasme** - contient des organelles membranaires. Parmi elles, les **mitochondries** sont orientées parallèlement à l'axone, leur diamètre est compris entre 0.1 et 0.3  $\mu\text{m}$  et mesurent jusqu'à 10  $\mu\text{m}$  de long. Elles occupent une fraction constante de 1.5 % du volume des axones de plus de 0.7  $\mu\text{m}$ .

Les axones du CNS présentent une grande dispersion de calibres entre  $0.1 \mu m$  et jusqu'à  $10 \mu m$  [4]. Les faisceaux du corps calleux, du nerf optique et de la moelle épinière contiennent majoritairement des axones de petit diamètre. Cette diversité de diamètres a été attribuée à la quantité d'informations véhiculée par l'axone [12]. Il existe également une variabilité du diamètre axonal sur la longueur de l'axone, notamment au niveau des nœuds de Ranvier où le diamètre axonal rétrécit [12].

### b) Transmission rapide des influx neuronaux via la conduction nerveuse saltatoire

La capacité des axones myélinisés à conduire les influx nerveux avec une vitesse 100 fois supérieure à celle des axones non myélinisés [13] rend compte de l'aptitude de la myéline à accélérer la transmission des potentiels d'action. En effet, la gaine de myéline tire ses **propriétés d'isolant** de sa structure, de sa composition et de son épaisseur, et confère ainsi aux internœuds une grande résistance associée à une faible conductance en confinant les canaux potassiques aux juxtaparanodes et les canaux sodiques au niveau des nœuds de Ranvier qui sont les domaines où l'axone est en contact avec le milieu environnant. Par conséquent, la transmission de l'impulsion électrique est accélérée en sautant de nœuds en nœuds, ce qui correspond à une **conduction nerveuse saltatoire**.

Il a été rapporté que la vitesse de conduction des axones myélinisés augmente proportionnellement avec le diamètre axonal du fait de la diminution de la résistance axiale et d'une augmentation du courant ionique à l'intérieur de l'axone. Il a également été montré que ce gain de vitesse de conduction n'est significatif que pour les fibres de diamètres supérieurs à  $0.2 \mu m$ . De plus, la capacité de conduction des potentiels d'action à haute fréquence dépend également du diamètre des axones.

Par ailleurs, la présence de la myéline limite les pertes de courant dans l'axone, rendant la conduction plus efficace avec de faibles besoins en énergie.

### c) Support métabolique et maintien de l'axone *via* la gaine de myéline

Les oligodendrocytes myélinisants régulent non seulement la myélinisation mais ils fournissent également un **soutien métabolique** aux neurones isolés du milieu extracellulaire riche en nutriments [14]. Ce couplage métabolique entre les oligodendrocytes et l'axone s'effectue *via* la gaine de myéline qui délivre des substrats métaboliques (*lactate*, *pyruvate*) à travers les canaux cytoplasmiques. Lorsque les oligodendrocytes détectent une activité axonale, ils réagissent en fournissant des substrats métaboliques aux axones actifs et en forte demande énergétique.

La gaine de myéline assure également le **maintien** de l'axone situé à une grande distance du corps cellulaire *via* des canaux myéliniques riches en cytoplasme - conservés après la compaction de la myéline - et *via* les boucles paranodales. Ces derniers assurent le transport de molécules et d'organelles nécessaires à l'axone [15].

### d) Formation et plasticité de la gaine de myéline

La formation des gaines de myéline (myélinisation) présente deux aspects : une myélinisation développementale - qui permet d'accélérer la transmission des influx nerveux et de maintenir la santé des axones - et une seconde qualifiée d'adaptative qui assure la plasticité neuronale en lien avec l'expérience. Nous allons décrire ces deux aspects dans les paragraphes suivants.



## - Myélinisation initiale

### *Temporalité de la myélinisation*

Chez les humains, le processus de myélinisation débute au cinquième mois du développement fœtal, présente un pic pendant la première année, et se poursuit pendant l'enfance jusqu'à l'âge adulte [16]. La myélinisation survient plus ou moins tard après que les axones ont établi une connexion avec leur cible. Elle progresse suivant un schéma chronologique et topographique fixe, depuis les régions qui contrôlent des fonctions simples du système nerveux (ex : nerf optique) vers des domaines associés à des tâches plus complexes (ex : cortex frontal) [17], depuis une région proximale vers une région distale et depuis une région centrale vers les pôles. On peut noter que les axones avec les diamètres les plus larges sont souvent les premiers à être myélinisés.

### *Processus de myélinisation*

Dans le CNS, les oligodendrocytes se développent à partir des **cellules précurseurs des oligodendrocytes** (OPCs) aussi appelées cellules progéniteurs des oligodendrocytes. Les OPCs sont des cellules multipotentes qui - une fois activés - prolifèrent et sont recrutés par les axones non-myélinisés. Après un processus de maturation des cellules précurseurs des oligodendrocytes, les **oligodendrocytes** matures se connectent aux axones via un premier enroulement d'une extension d'aspect plat et triangulaire. Le recouvrement de la membrane de myéline procède ensuite par la progression active du bord de la bicouche membranaire intérieure en contact avec l'axone sous la membrane déposée précédemment. Dans le même temps, les bords latéraux des bicouches s'étendent latéralement jusqu'à atteindre leur dimension internodale finale en glissant les unes sur les autres. Les bords latéraux des couches de myéline présentent des boucles membranaires riches en cytoplasme en contact avec la surface axonale qui s'étendent jusqu'au nœud de Ranvier où elles forment les boucles paranodales.

La compaction des plis cytoplasmiques des bicouches lipidiques débute dès les premiers enroulements et progresse depuis les couches les plus externes vers l'intérieur. Elle est réalisée grâce à la protéine de base de la myéline (MBP) qui agit comme une « colle » électrostatique entre les bicouches de lipides chargées négativement et les groupes d'acides aminés chargés positivement pour chasser le cytoplasme. Une fois que la protéine MBP est liée aux deux surfaces cytoplasmiques adjacentes de la bicouche de myéline, elle polymérise en un réseau fibreux qui fournit la force et qui est à la base de cette compaction membranaire unidirectionnelle.

### *Régulation de la myélinisation*

La régulation du nombre d'axones myélinisés, de l'épaisseur et de l'étendue de la myéline formée par les oligodendrocytes le long de l'axone influence considérablement la vitesse de conduction et la synchronisation des potentiels d'action entre les axones.

La corrélation entre la dimension des fibres et la présence d'une gaine de myéline autour de ces axones a été mise en évidence par une étude conduite sur des oligodendrocytes mis en culture avec des fibres de polystyrène de diamètres différents mimant des axones, qui montre que seules les fibres de plus de  $0.4 \mu\text{m}$  sont myélinisées [18]. Dans le CNS, les oligodendrocytes sont incapables de myéliniser les axones de diamètres inférieurs à  $0.2 \mu\text{m}$  à cause de leurs rayons de courbure trop élevés, tandis que la grande majorité des axones avec un calibre supérieur à  $0.8 \mu\text{m}$  sont myélinisés. En revanche, les axones entre  $0.2$  et  $0.8 \mu\text{m}$  de diamètre présentent une grande disparité de myélinisation qui peut être imputée à des facteurs de répulsion électrostatique ou à des molécules qui contrôlent la myélinisation.

Le nombre d'enroulements formés par les oligodendrocytes dépend à la fois du calibre et des besoins de l'axone. Plus son diamètre est important, plus sa gaine de myéline est épaisse. Des

études théoriques ont démontré que le rapport entre le diamètre axonal seul et le diamètre de l'axone myélinisé - appelée g-ratio - qui maximise la vitesse de propagation des influx nerveux est compris entre 0.6 – 0.7 [19].

Similairement, la longueur des internœuds est corrélée avec le diamètre des axones et varie selon les régions du CNS. Des expériences de myélinisation sur des microfibres de différents diamètres par différentes populations d'oligodendrocytes mettent en évidence une auto-régulation de la longueur des internœuds, spécifique aux différentes populations d'oligodendrocytes [20]. Typiquement, la longueur des internœuds se situe dans l'intervalle [150 – 200  $\mu m$ ] [21].

### ***Remyélinisation***

Le CNS humain possède une faible capacité de régénération des axones, cependant il dispose tout au long de l'existence d'une capacité importante à les remyéliniser dans le cas où les gaines de myéline sont endommagées. Cette faculté repose sur la présence permanente dans les tissus du CNS d'OPCs qui ont la capacité de se diviser et de se différencier en oligodendrocytes matures jusqu'au stade adulte. Les gaines de myéline formées présentent des propriétés légèrement différentes des gaines formées à des stades précoces avec un plus grand nombre d'internœuds de plus courte longueur.

### **- Myélinisation adaptative**

Bien que la plupart des gaines de myéline formées par les oligodendrocytes autour des axones répondent à des critères d'optimisation de la vitesse de transmission - comme au niveau du nerf optique, de la moelle épinière, etc - d'autres se forment ou voient leur propriétés structurelles (longueur, épaisseur) modifiées de manière plastique en fonction de l'activité des neurones afin de soutenir la fonction d'un réseau neuronal plus étendu. C'est le cas notamment des axones du cortex cérébral. Soumis à une activité neuronale spécifique, ces derniers remodelent leur gaines de myéline pour privilégier une **synchronisation des temps d'arrivée** des potentiels d'action au niveau des terminaux présynaptiques et pour **moduler leur fréquence** de manière appropriée aux besoins spécifiques des différents circuits. De cette façon, l'expérience pendant le développement et dans la vie adulte régule l'étendue de la formation des gaines de myéline de manière dynamique [22]. Contrairement à la myélinisation intrinsèque, cette myélinisation adaptative présente une grande variabilité entre les individus.

## **1.1.3 Un cas de maladie neurodégénérative : la sclérose en plaques (SEP)**

La **sclérose en plaques** est la maladie neurologique chronique la plus répandue parmi les groupes d'âge jeunes et intermédiaires de la population devant d'autres pathologies telles que le syndrome de Guillain-Barré, la neuromyéélite optique, l'encéphalomyélite aiguë disséminée etc. Elle affecte environ 1.1 million d'individus à travers le monde dont 2/3 de femmes. Décrite pour la première fois en 1880 par Charcot, cette maladie auto-immune chronique comporte deux composantes évolutives, d'une part une composante **inflammatoire** avec des attaques immunitaires répétées sur le CNS, et d'autre part une composante **neurodégénérative** caractérisée par la mort de neurones au sein de lésions focales dans la matière blanche du CNS, consécutive à la dégradation de leur gaine de myéline. Des études récentes ont mis en évidence la présence additionnelle de lésions dans la matière grise et l'existence d'une inflammation et d'une neurodégénérescence diffuses dans l'intégralité du CNS. La forte altération de la capacité de transmission des messages nerveux - induite par la dégénérescence des axones du CNS - conduit à l'apparition de divers types de handicaps neurologiques ponctuels ou permanents.

## a) Pathologie de la myéline

**- Infiltration de cellules inflammatoires dans le CNS**

Le processus d'inflammation - décrit sur la figure 1.3 - est considéré comme le moteur initial de la maladie. Il correspond initialement à une activation du système immunitaire dans le compartiment périphérique, c'est-à-dire en dehors du système nerveux, avec la présence de lymphocytes T et B et des cellules plasmiques. Suite à la reconnaissance anormale d'une cible localisée sur la myéline des axones du CNS, les cellules immunitaires activées franchissent la frontière entre le sang et le cerveau - communément appelée barrière hématoencéphalique - normalement inaccessible au système immunitaire. Ces infiltrats inflammatoires diffus et présents dans l'espace périvasculaire vont induire une première démyélinisation périveineuse.

La réponse immunologique est ensuite amplifiée à l'intérieur du système nerveux central à travers la libération de médiateurs comme les cytokines par les cellules T activées. Ces médiateurs induisent une activation diffuse des cellules microgliales qui deviennent toxiques pour la gaine de myéline. Ce processus conduit à la destruction de la myéline (démyélinisation) sous la forme de lésions qui sera décrite plus en détail dans les paragraphes suivants.

L'inflammation agit également de manière indirecte par des infiltrations d'inflammation dans les méninges et les espaces intravasculaires qui produisent des facteurs solubles à l'origine d'une démyélinisation indirecte par l'activation de la microglie qui s'accompagne de stress oxydatif et de dommages mitochondrial et aboutissent à une hypoxie virtuelle.

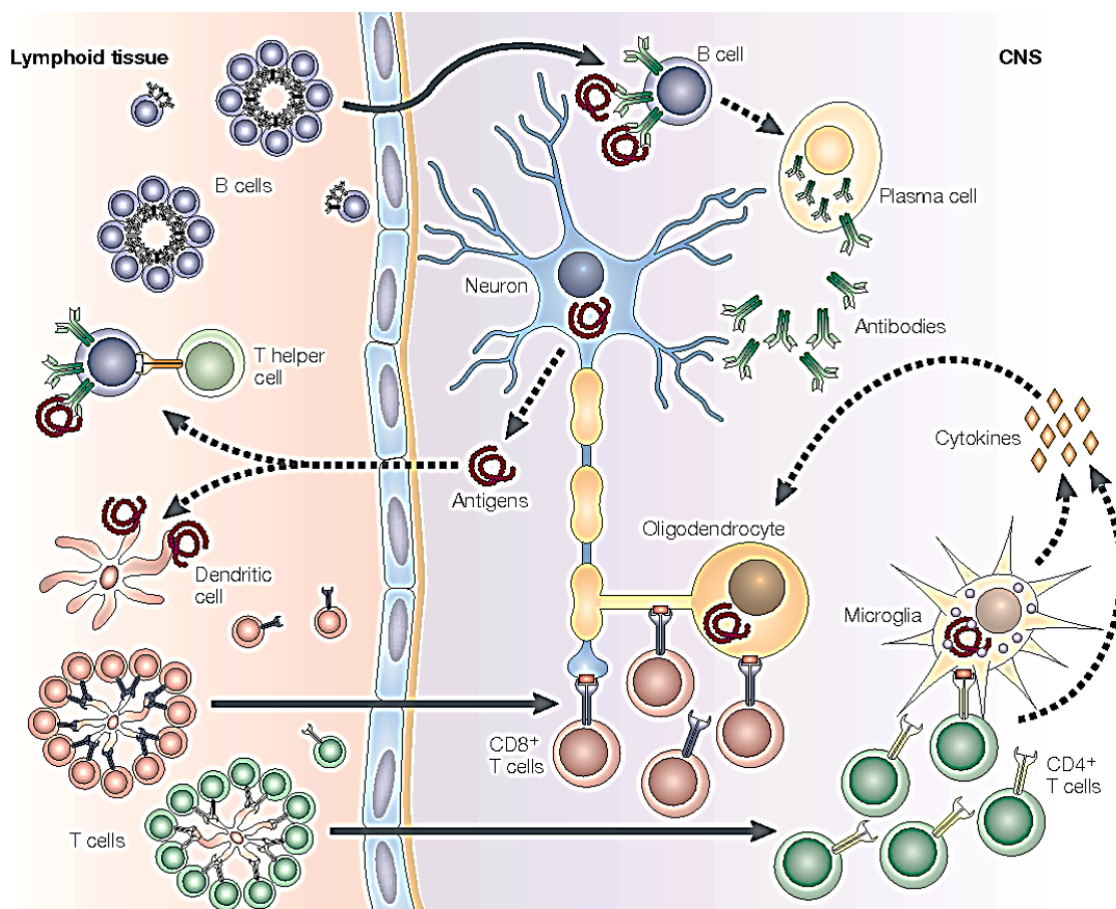


FIGURE 1.3 – Schéma de la réponse immunitaire dans les lésions associées à la sclérose en plaques. Adapté de [23].



## - Démyélinisation et neurodégénérescence dans le CNS

Dans la sclérose en plaques, le processus d'inflammation est relayé par un processus de démyélinisation puis de neurodégénérescence au sein de lésions dans le CNS mais qui agissent aussi de manière diffuse dans la matière blanche d'apparence normale du CNS. L'évolution des lésions est retracée dans le paragraphe suivant.

### *Stades d'évolution des lésions*

Les lésions induites suivent une séquence évolutive qui s'étend sur plusieurs mois voire plusieurs années depuis le stade préphagocyttaire initial jusqu'au stade final des lésions démyélinisées inactives, avec la possibilité d'être remyélinisées (plaques « shadow »). Dans les paragraphes suivants, nous allons récapituler les spécificités des différents stades d'évolution des lésions, illustrés sur la figure 1.4.

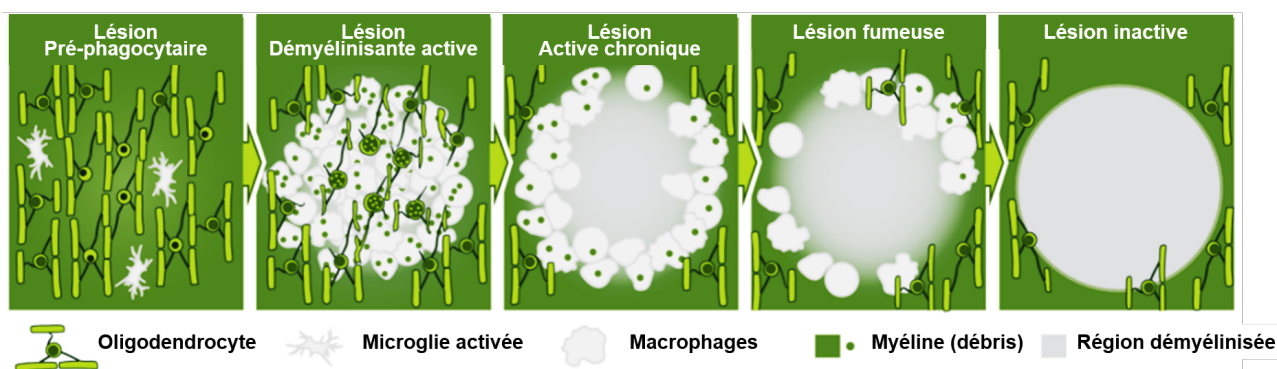


FIGURE 1.4 – Description schématique de l'évolution des lésions focales dans la sclérose en plaques. Adapté de [24].

Les lésions apparaissent dans le CNS sous un état « **préphagocyttaire** » qui est associé à une activation des cellules microgliales présentes dans la lésion mais où le processus de phagocytose des gaines de myéline n'a pas encore eu lieu. Les oligodendrocytes sont encore présents en grand nombre dans la lésion.

A ce stade initial succède un stade - où la lésion est appelée « **démyélinisante active classique** » ou « **démyélinisante inflammatoire focale** » - caractérisé par une infiltration de macrophages. Les cellules microgliales activées et les macrophages attaquent les gaines de myéline présentes dans la lésion. Ces cellules phagocytaires présentent une distribution spatiale caractéristique avec une majorité de macrophages contenant des produits de dégradation de myéline au centre de la lésion, et la plupart des cellules microgliales activées situées à la périphérie de la lésion. Les macrophages et la microglie expriment un fort stress oxydatif qui diminue dans les stades plus tardifs de la lésion active, après que les macrophages ont ramassé les débris de myéline [25]. Il a également été rapporté que cette infiltration de macrophages s'accompagne d'une infiltration de quelques lymphocytes B [26] et cellules plasmiques. Bien que les lésions démyélinisantes actives conservent une densité d'oligodendrocytes quasi-normale avec une légère diminution du nombre d'OPC [27], le degré de dommage et de destruction axonales est extrêmement variable d'un sujet à l'autre.

Cette dernière catégorie de lésions évolue parfois vers des **lésions actives chroniques** (ou active en expansion lente) caractérisées par un centre démyélinisé entouré d'un bord actif qui connaît une expansion lente et graduelle. Ce bord actif contient un nombre variable de débris de myéline et de produits de dégradation de la myéline dans les phagocytes et cellules

microgliales activées présentes. Les macrophages sont très rares voire absents, tandis que des infiltrats de cellules T sont fréquemment présents mais dispersés et localisés en région péri-vasculaire. Il a été rapporté que les lésions actives présentent également une augmentation du nombre d'oligodendrocytes prémyélinisants et myélinisants malgré l'absence ou la rareté des régions remyélinisantes.

Les **lésions démyélinisées inactives chroniques** caractérisent le stade final de l'évolution des lésions incluant l'absence de réaction immunitaire et de phagocytose de la myéline à l'intérieur et sur le bord de la lésion. Elles se distinguent des états de lésions plus précoces par leurs contours nets caractéristiques liés à la rareté des résidus de gaines de myéline. Dans ces lésions inactives, la réduction axonale peut atteindre jusqu'à 80 % [28] et l'espace entre les axones démyélinisés est rempli par une cicatrice fibrillaire dense. En outre, le nombre d'oligodendrocytes matures, de cellules microgliales et d'OPCs est considérablement réduit.

Les **plaques « shadow »** - décrites pour la première fois par Marburg en 1906 [29] - sont des régions remyélinisées dans des lésions aussi bien anciennes que récentes [30] qui s'étendent sur l'intégralité des lésions ou parfois seulement sur quelques points focaux à l'intérieur ou sur le bord des lésions. En lumière blanche, ces domaines ont un aspect « ombré » (d'où leur nom), distinct du contraste provenant des régions myélinisées à cause de la plus grande finesse des gaines de myéline formées au cours du processus de remyélinisation en comparaison des gaines issues de la myélinisation initiale [31]. Elles font également apparaître des bords clairement délimités comme c'est le cas pour les lésions inactives, et qui les différencient des lésions préphagocytaires au contraste ombré. Comme le mécanisme de remyélinisation repose sur la myélinisation des fibres par des oligodendrocytes récemment différenciés, le degré de remyélinisation des lésions dépend de la présence d'OPCs dans le tissu ainsi que de leur potentiel à se différencier en oligodendrocytes matures myélinisants. Il dépend également de la présence et de la fonctionnalité des axones mais aussi de la fréquence des cycles de démyélinisation/remyélinisation ayant déjà eu lieu.

### ***Lésions dans la matière grise***

La matière grise subit également une démyélinisation importante dans le cerveau antérieur, le cervelet et la moelle épinière avec des caractéristiques distinctes de celles des lésions qui affectent la matière blanche. Il a notamment été rapporté l'absence de cellules T et B mais une activation importante de la microglie. Il semble que la proximité de la matière grise avec le fluide cébrospinal, son exposition aux antigènes des méninges et la plus grande perméabilité vasculaire prédisposent la matière grise au développement de lésions.

La démyélinisation de la surface du cortex présente un aspect spécifique de la sclérose en plaques avec la présence de bandes démyélinisées étendues depuis la surface extérieure du cortex jusqu'aux couches profondes. Par ailleurs, il a été rapporté que la démyélinisation du cortex affecte jusqu'à 60 % de l'aire corticale totale [32].

### ***Neurodégénérescence diffuse dans la matière blanche d'apparence normale***

De manière partiellement indépendante de la neurodégénérescence focale au sein de lésions, une perte axonale survient de manière diffuse dans l'ensemble du CNS [33]. Elle s'accompagne d'une diminution des boutons présynaptiques, des structures postsynaptiques et des substrats de connectivité neuronale, et est associée à la présence d'infiltrats de lymphocytes T et à une activation diffuse de la microglie. Des données obtenues par IRM ont mis en évidence une atrophie globale de la matière blanche et de la matière grise qui ne peut pas être expliquée

exclusivement par la présence des lésions focales présentées précédemment. Ces résultats soutiennent la présence d'une neurodégénérescence diffuse à l'échelle du CNS, ce qui fait considérer la sclérose en plaque comme une pathologie du cerveau entier.

### b) Formes de la sclérose en plaques, caractéristiques cliniques et pathologiques

La maladie se présente sous trois formes différentes - **rémittente** (RRMS), **progressive-primaire** (PPMS) et **progressive-secondaire** (SPMS) - liées à des pathologies plus ou moins identifiées.

Au début de la maladie, environ 80 % des malades sont atteints par la forme **rémittente** caractérisée par une série de poussées-rémissions marquée par l'apparition et la disparition rapide de symptômes. Les symptômes sont spécifiques de la région affectée par la démyélinisation : un premier symptôme fréquent est associé à un trouble de la vision (névrite optique) lorsque le nerf optique est touché, mais des symptômes moteurs peuvent également apparaître lorsque le cortex est atteint ou des symptômes sensoriels avec une sensation d'engourdissement ou de décharge électrique dans un membre ou dans le dos lorsque le cortex sensoriel est affecté. La grande majorité des lésions sont des lésions démyélinisantes actives classiques de la matière blanche. La démyélinisation du cortex sous la pie-mère est également un des premiers événements de la SEP ([34], [35]). On peut noter que la remyélinisation se produit naturellement au cours des stades précoces de la sclérose en plaques.

Après une durée allant de 10 à 15 ans, cette première forme rémittente est généralement suivie par une forme **progressive-secondaire** marquée par l'apparition de handicaps irréversibles. Une minorité de patients - environ 15 % - développent une forme progressive sans rémission dès l'apparition de la maladie, appelée forme **progressive-primaire**. Dans les phases progressives, la maladie se manifeste par des troubles moteurs permanents associés à une perte du contrôle des mouvements, et par des troubles cognitifs marqués par des déficiences dans la perception sensorielle, la mémoire et la parole. La permanence des troubles s'explique par l'évolution de certaines lésions démyélinisantes actives classiques vers des lésions chroniques démyélinisantes actives (15 – 20 % des lésions [36]) et démyélinisées inactives. Ces lésions se situent majoritairement au niveau de la matière blanche des nerfs optiques, des ventricules et du subcortex, les pédoncles cérébelleux, le tronc cérébral, de la moelle épinière et des couches corticales. La remyélinisation a fréquemment échoué dans ces lésions pendant ces phases progressives.

### c) Origine et traitements

L'origine de la sclérose en plaques n'est pas clairement identifiée mais la combinaison de certains éléments semblent favoriser son apparition, notamment des facteurs environnementaux, une susceptibilité génétique, des affections par des virus spécifiques, de faibles niveaux en vitamine D, une obésité infantile, etc. La méconnaissance de l'étiologie précise de la maladie freine encore le développement d'un traitement curatif.

Les thérapies actuelles visent à supprimer la réponse auto-immune inflammatoire contre les gaines de myéline du CNS pour ralentir la progression de la maladie. Cependant, l'efficacité de ces traitements anti-inflammatoires est limitée dans la phase progressive de la maladie - dominée par la composante démyélinisante. Les recherches actuelles visent - d'une part - à améliorer les traitements anti-inflammatoires avec de nouveaux agents immunomodulateurs et - d'autre part - à promouvoir la remyélinisation des tissus du CNS par le biais de traitements pharmacologiques favorisant le processus régénératif endogène ([37], [38], [39]) ou par la greffe de cellules neurales souches dans les lésions focales ([40],[41]).

## 1.2 Techniques d'imagerie de la myéline

L'observation de la myéline est indispensable pour comprendre le développement du système nerveux et détecter d'éventuels changements pathologiques et/ou réparations apparus pendant la progression de maladies neurodégénératives. Les techniques d'imagerie comptent notamment l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la tomographie par émission de positrons (PET), la microscopie optique et la microscopie électronique (TEM).

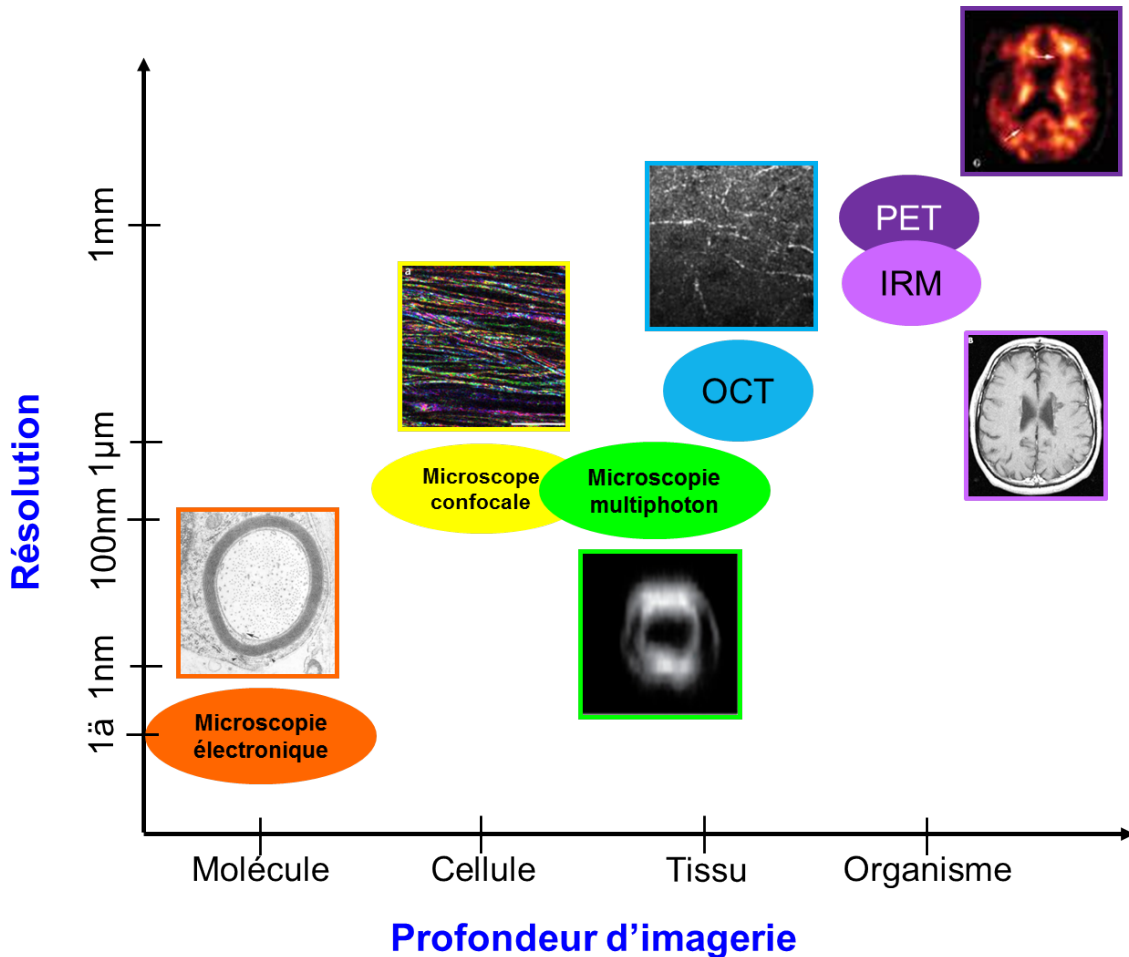


FIGURE 1.5 – Techniques d'imagerie des tissus myélinisés classées en fonction de leurs propriétés de résolution spatiale et de profondeur d'imagerie.

Comme on peut le voir sur la figure 1.5, elles se distinguent les unes des autres en offrant des compromis différents au paradigme opposant **résolution** *versus* **profondeur d'imagerie**, qui se traduit par le fait qu'un gain de résolution spatiale est associé à une diminution de la profondeur d'imagerie maximale atteignable, impliquant davantage d'invasivité sur les tissus. L'imagerie par résonance magnétique et ses dérivés sont ainsi adéquats pour observer la matière blanche dans des organes entiers, mais leur résolution - limitée à plusieurs centaines de microns ou au millimètre - est insuffisante pour visualiser des axones myélinisés individuels. A l'opposé, la microscopie électronique est adaptée pour décrire la microstructure des axones myélinisés grâce à sa résolution atomique, mais requiert des tissus traités de quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur. De manière intéressante, la microscopie optique se positionne comme un outil intermédiaire entre les deux techniques précédentes, avec une résolution micrométrique

idéale pour l'observation de structures cellulaires et subcellulaires, associée à un caractère faiblement invasif propice à l'observation de processus dynamiques jusqu'à plusieurs centaines de microns de profondeur dans des tissus vivants. Parmi les techniques d'imagerie optique, la microscopie multiphoton - qui sera notre technique de prédilection dans les chapitres suivants - présente une capacité unique à combiner plusieurs modalités de contraste pour accéder à des informations complémentaires [42]. On peut ajouter que les récents développements - concernant la microscopie de fluorescence excitée à trois photons (3PEF) et l'imagerie grand volume en contraste électronique et en contraste de fluorescence - sont venus remettre en question les limitations intrinsèques de ces techniques en terme de profondeur d'imagerie, en proposant des reconstructions d'organes entiers à forte résolution.

Dans cette partie, nous proposons une présentation des principales techniques d'imagerie de la myéline actuellement utilisées en clinique et en recherche et de leurs applications, depuis les méthodes adaptées à l'imagerie d'organes entiers, jusqu'aux plus fortement résolues au caractère invasif.

### 1.2.1 Techniques d'imagerie non-invasives du système nerveux

#### a) Imagerie par résonance magnétique (IRM)

Développée dans les années 70, l'imagerie par résonance magnétique est la technique d'imagerie de référence pour visualiser *in vivo* l'anatomie du cerveau avec une résolution spatiale submillimétrique (jusqu'à 0.2 mm). Elle repose sur l'utilisation d'un premier champ magnétique  $\vec{B}_0 \parallel \vec{z}$  intense et homogène pour induire une magnétisation selon l'axe  $z$  des moments magnétiques de spin des noyaux d'hydrogène présents dans les molécules d'eau. L'axe des moments dipolaires est ensuite écarté de l'axe  $z$  grâce à des ondes radios électromagnétiques qui oscillent à la fréquence de Larmor [43]. Lorsque le champ oscillant est interrompu, les moments magnétiques reviennent à l'équilibre en se réalignant suivant l'axe  $z$  avec des dynamiques qui dépendent de la nature du tissu. Un premier paramètre généralement mesuré caractérise le temps de relaxation de la magnétisation longitudinale (T1), c'est-à-dire le temps nécessaire aux moments magnétiques pour se réaligner suivant l'axe longitudinal  $z$ . Un second paramètre classiquement déterminé correspond au temps de relaxation transversal (T2) qui mesure la disparition de l'aimantation transversale.

La diversité des contrastes T1 et T2 observés sur des tissus myélinisés provient de la propriété des atomes d'hydrogène des lipides à revenir plus rapidement à l'équilibre que ceux des domaines aqueux, ce qui implique un temps relaxation T1 plus court sur la matière blanche que sur la matière grise, à l'inverse du temps T2. Les images IRM qui sont des représentations spatiales des temps de relaxation présentent un hypersignal T1 au niveau des domaines de matière blanche et d'un hyposignal sur les régions plus faiblement myélinisées, ainsi qu'une inversion de ces dépendances pour le contraste T2.

Sur des sujets atteints de maladies neurodégénératives, il a été démontré que l'IRM est capable de distinguer des **lésions focales disséminées** caractérisées par une perte locale de l'hypersignal T1 associée à l'apparition d'un hypersignal T2. Grâce à sa forte sensibilité, l'IRM est très largement utilisée pour **diagnostiquer la sclérose en plaques** et pour **suivre *in vivo* l'évolution des lésions**.



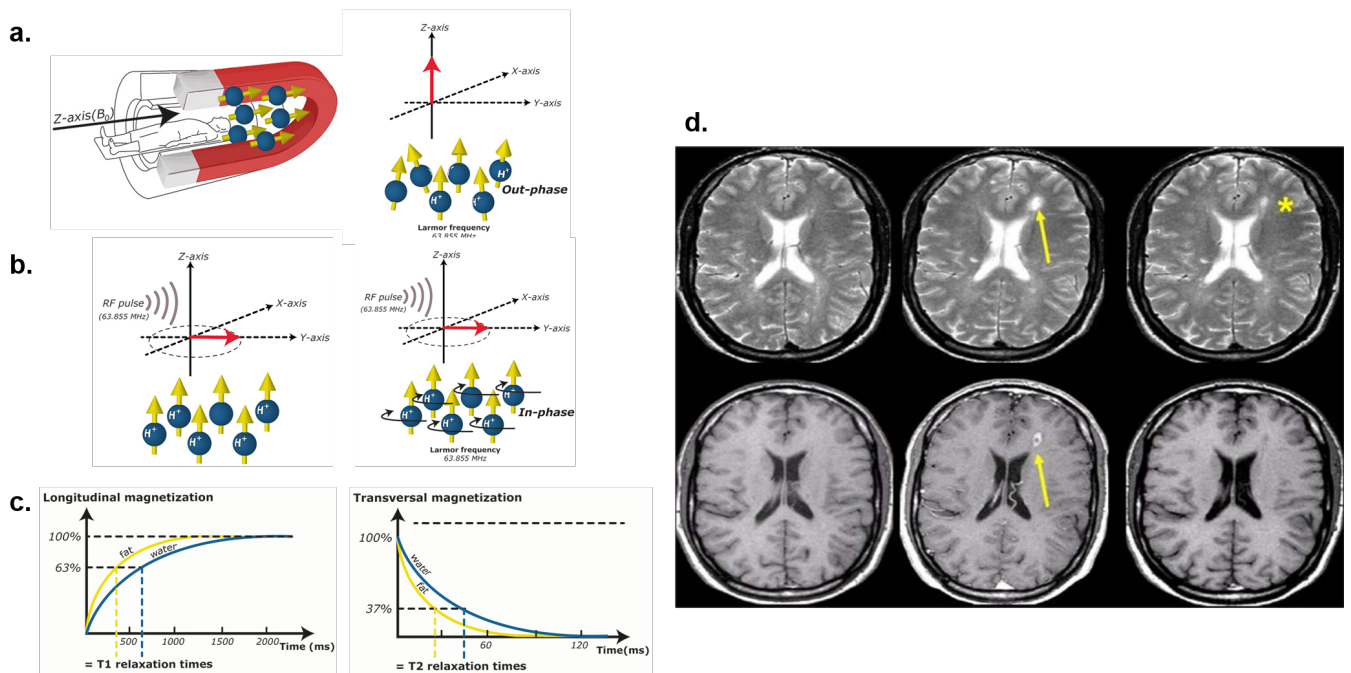


FIGURE 1.6 – Contraste IRM sur des tissus myélinisés. a. Alignement de la magnétisation des protons parallèlement au champ magnétique de l'appareil d'IRM. b. Rotation de la magnétisation des protons induite par les ondes électromagnétiques à la fréquence de Larmor. c. Temps de relaxation T1 et T2 des protons dans les lipides et dans l'eau. Adapté du site web *startradiology.com*. d. Contrastes T2 (en haut) et T1 (en bas) en imagerie IRM obtenues à plusieurs mois d'intervalle sur un patient atteint de sclérose en plaques (les flèches indiquent la formation d'une nouvelle lésion). Adapté de [44].

### b) Imagerie par tenseur de diffusion (dIRM)

L'imagerie par tenseur de diffusion (dIRM) est une technique d'imagerie dérivée de l'IRM, introduite par P. Basser en 1994 [45]. Elle repose sur une mesure de la dynamique des molécules d'eau du tissu en s'appuyant la propriété d'anisotropie de diffusion des molécules d'eau de la myéline. Les molécules d'eau coincées entre les bicouches de lipides de la myéline diffusent en effet selon une direction privilégiée parallèle aux fibres de matière blanche. Pour détecter *in vivo* l'orientation de la diffusion, le dIRM utilise une paire d'impulsions courtes de champ magnétique qui sondent le déplacement des noyaux d'hydrogène entre deux instants. Les images dIRM utilisent généralement une représentation basée sur un code couleur relatif à la direction de la plus grande diffusivité locale.

Malgré son caractère récent, l'imagerie dIRM est déjà utilisée en clinique pour cartographier la connectivité structurelle du cerveau. Elle permet également de détecter des lésions ainsi que des anomalies pathologiques de la myéline dans la matière blanche d'apparence normale [46] sur des sujets atteints de sclérose en plaques, en s'appuyant sur les modifications des propriétés d'anisotropie de diffusion des molécules d'eau qui apparaissent sur la myéline endommagée.

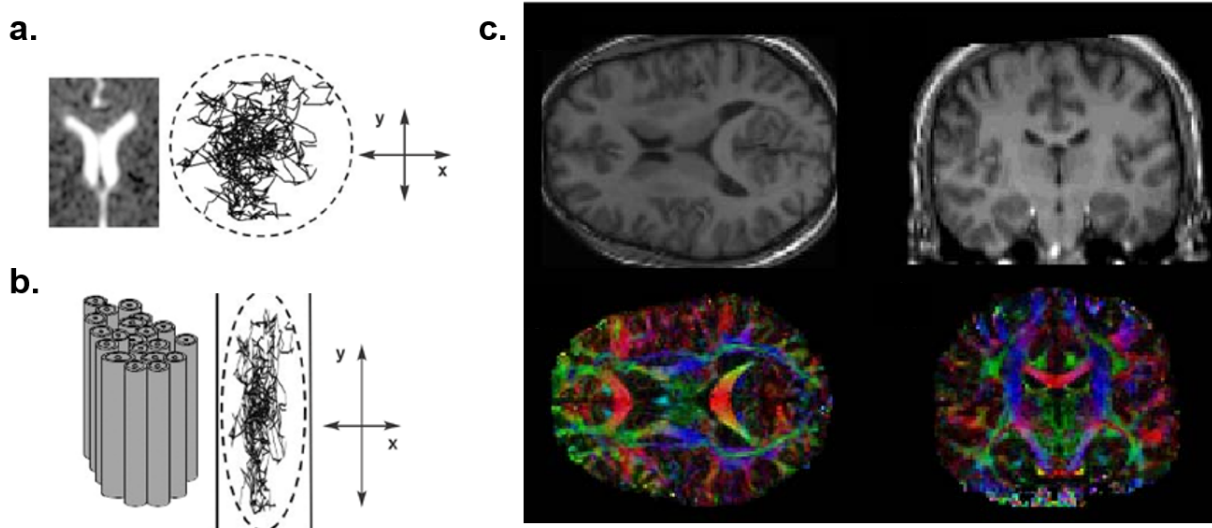


FIGURE 1.7 – Contraste dIRM sur des tissus myélinisés. a. Diffusion isotrope des molécules d'eau (mouvement brownien). b. Diffusion anisotrope des molécules d'eau dans les faisceaux de fibres de la matière blanche. Adapté de [47]. c. Images anatomiques en contraste T1 de coupes axiale et coronale. Cartes colorées en contraste dIRM. Adapté de [48].

### c) Tomographie par émission de positron (PET)

L'imagerie par tomographie par émission de positrons est une technique non-invasive avec une résolution spatiale de  $1\text{ mm}$  utilisée pour observer la structure de l'ensemble du cerveau. A la différence de l'IRM et des techniques associées, elle possède une grande spécificité sur la myéline grâce à l'utilisation d'un agent de contraste radioactif exogène. Elle permet notamment de visualiser la substance grise, les lésions démyélinisées et remyélinisées. L'imagerie PET permet également de distinguer des plaques « shadow » correspondant à des degrés de remyélinisation distincts des lésions démyélinisées et de la substance blanche d'apparence normale ([49], [50], [51]).

Bien que les techniques d'IRM, dIRM et PET soient très efficaces pour visualiser *in vivo* et en 3D des anomalies de la substance blanche dans le cadre d'applications cliniques, leur résolution spatiale - limitée à l'échelle submillimétrique - est insuffisante pour visualiser des défauts de la myéline sur des axones individuels, des mécanismes cellulaires et subcellulaires de myélinisation et de remyélinisation. De plus, leur manque de sensibilité dans la matière grise rend difficile l'identification de certaines lésions causées par la sclérose en plaques dans le cortex ou le cervelet.

### 1.2.2 Microscopie électronique par transmission (TEM)

La microscopie électronique par transmission (TEM) se distingue des techniques précédentes par sa résolution spatiale de l'ordre de l'angström. Les images TEM ont permis de dévoiler pour la première fois l'**ultrastructure de la gaine de myéline** caractérisée par une organisation périodique avec une alternance de couches sombres (denses en électrons) associées aux protéines et des couches claires (faibles en électrons) correspondant aux lipides.

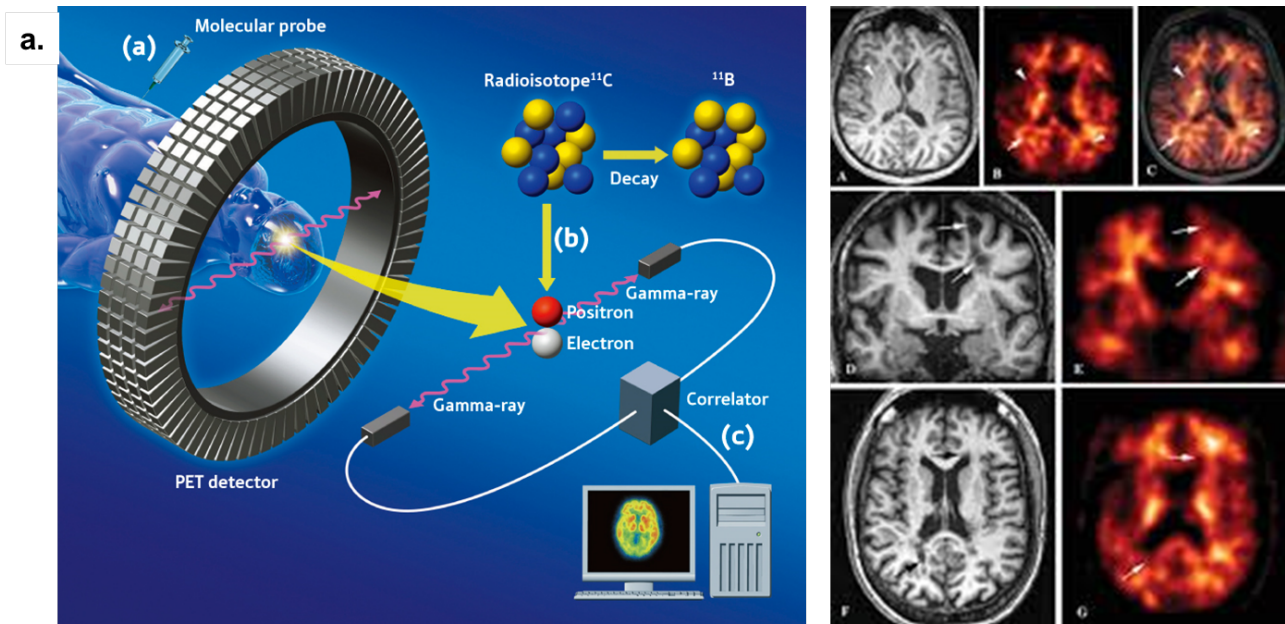


FIGURE 1.8 – Contraste PET sur des tissus myélinisés. a. Schéma explicatif du processus de génération et de détection du contraste PET. Adapté du site web *medicalxpress.com*. b. Imagerie PET avec marquage  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  sur un patient atteint de sclérose en plaques. Adapté de [49].

Un inconvénient de l'imagerie TEM provient du traitement classique (fixation chimique dans une solution aqueuse, coloration, déshydratation, enrobage plastique ou dans de la paraffine) requis pour imager les tissus qui engendre des artefacts importants, tels que des dommages sur les structures cellulaires, comme les mitochondries et la myéline compacte, et des modifications de l'épaisseur des tissus (réduction des espaces intercellulaires) qui compliquent l'extraction de mesures morphométriques à partir des images brutes (ex : g-ratio). Une technique récente de cryopréparation combine une congélation à haute pression et un système de substitution de congélation et permet de préserver la structure des échantillons dans un état proche de son état naturel, en particulier la myéline et les régions riches en cytoplasme [52].

Par ailleurs, ces traitements fortement invasifs sur des tissus sectionnés empêchent de suivre des processus dynamiques (myélinisation, démyélinisation) *in vivo* sur les tissus.

Les modalités d'imagerie présentées ci-dessus sont limitées pour l'observation *in vivo* de structures sub-cellulaires ou cellulaires, soit par leur faible résolution (IRM, dIRM, PET), soit par leur caractère destructif de l'échantillon (microscopie électronique). La **microscopie optique** - qui sera l'objet de la prochaine sous-partie - présente les avantages conjugués d'une **résolution latérale micrométrique** et d'une **absence de destruction de l'échantillon**.

### 1.2.3 Microscopie optique linéaire

La microscopie optique est adéquate pour imager des processus dynamiques dans des structures biologiques microscopiques avec une résolution subcellulaire. Le contraste de ces techniques repose sur les phénomènes d'absorption, de diffusion, de réfraction ou de réflexion. Parmi les modalités existantes, nous allons rappeler quelques techniques qui ont amené des résultats intéressants sur la myéline : la **microscopie en lumière blanche**, la **microscopie confocale par fluorescence**, la **microscopie confocale par réflectance spectrale (SCoRe)** et la **tomographie par cohérence optique (OCT)**.



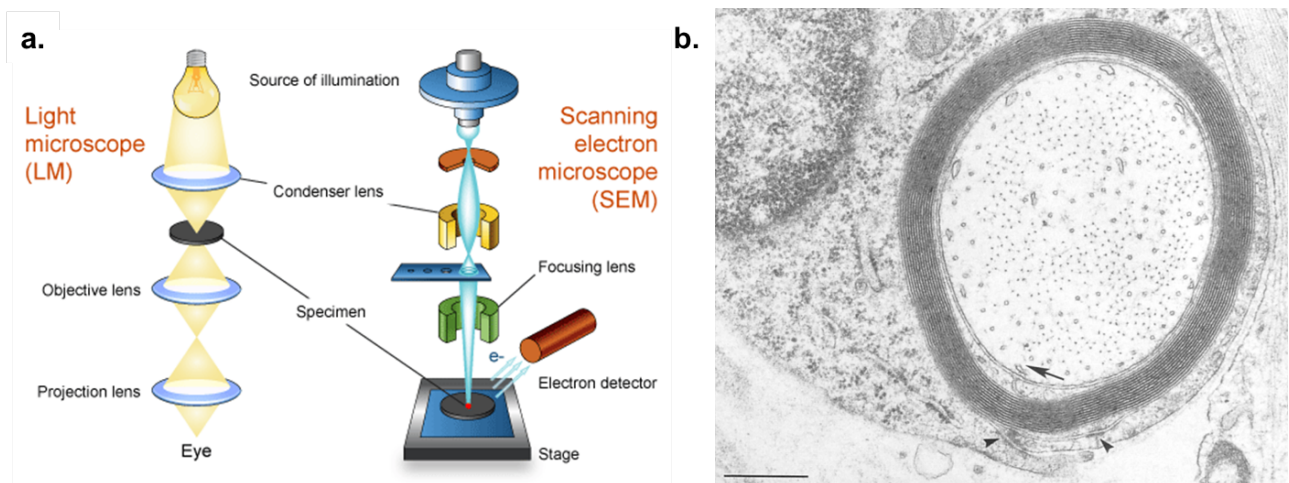


FIGURE 1.9 – Contraste TEM sur des tissus myélinisés. a. Comparaison entre les dispositifs d'imageries optiques et électroniques. Adapté de *microbiologyinfo.com*. b. Imagerie TEM d'une coupe transverse d'un axone myélinisé de moelle épinière en culture. Adapté de [53].

### a) Imagerie des coupes histologiques en lumière blanche

La technique optique la plus utilisée pour observer des tissus myélinisés consiste à préparer des sections histologiques avec un colorant de la myéline, puis à les observer en lumière blanche. Le *Luxol fast blue* (LFB) est le colorant classiquement utilisé pour la myéline. La densité optique du colorant permet d'identifier les domaines de matière blanche, de matière grise et la présence éventuelle de lésions démyélinisées. Cette technique est fréquemment utilisée comme référence pour valider les contrastes obtenus par d'autres techniques d'imagerie.

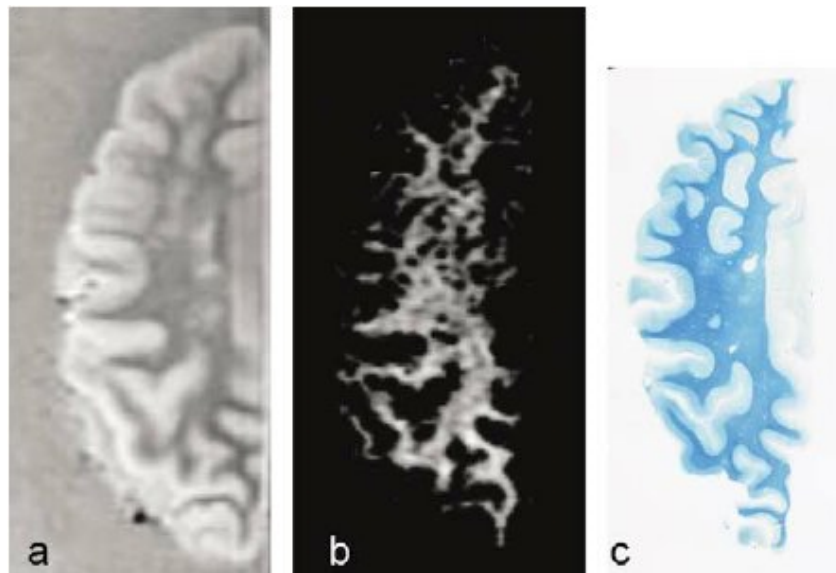


FIGURE 1.10 – Corrélation entre (a) le contraste IRM T2 (b) le contraste issu de l'eau de la myéline et (c) le marquage de la myéline avec le colorant *Luxol fast blue* sur des tissus de cerveau humain. Adapté de [54].

## b) Microscopie confocale

La microscopie confocale se distingue de la microscopie classique en lumière blanche par sa capacité à imager en 3D le signal de fluorescence provenant de cellules en culture et de tissus biologiques minces marqués ou colorés. Cette technique de fluorescence linéaire à « un-photon » repose sur l'absorption d'un photon d'excitation unique par la molécule d'un fluorophore - passant ainsi de son niveau d'énergie fondamental vers un état excité - puis sur sa désexcitation vers l'état fondamental avec émission d'un photon que l'on vient collecter.

La lumière incidente sur l'échantillon est monochromatique et généralement dans le domaine visible. Elle est focalisée sur le milieu à imager grâce à un objectif dont l'ouverture numérique détermine la résolution latérale du volume focal. Comme le milieu est excité sur l'ensemble du cône de propagation du faisceau incident, un diaphragme - placé devant le détecteur au niveau du plan conjugué au plan focal - est utilisé pour sélectionner le signal de fluorescence provenant exclusivement du plan focal. Les résolutions latérale et axiale de l'image sont ainsi limitées par la diffraction, ce qui permet d'obtenir une résolution 3D micrométrique en utilisant un objectif à forte focalisation. Pour réaliser une imagerie tridimensionnelle, l'échantillon est ensuite balayé par le volume focal grâce à des miroirs. La profondeur d'imagerie maximale atteinte en microscopie confocale est généralement limitée à une centaine de microns.

Cette technique a été largement utilisée pour visualiser des cellules individuelles ou des populations de cellules d'intérêt qui sont sélectionnées dans des tissus biologiques grâce à une coloration ou un marquage. Une première technique consiste à colorer la matière blanche des tissus - généralement des sections postmortem - avec des colorants exogènes (colorants lipophiliques  $DiOC_6$  pour la coloration de la myéline). Un inconvénient de cette technique provient de la possibilité de former des liaisons non-spécifiques, une diffusion inefficace du colorant qui fausse l'analyse des données ou encore une destruction de la structure de la myéline.

Une seconde technique plus fréquente consiste à construire des lignées d'animaux transgéniques dans lesquels des protéines fluorescentes sont exprimées sous le contrôle de promoteurs protéiques spécifiques par des populations cellulaires d'intérêt. Par exemple, la lignée transgénique de souris *mbp-gfp* a été développée pour visualiser la myéline grâce à l'expression de la protéine verte *gfp* par le promoteur *mbp* [55].

Grâce au grand rendement du processus à 1 photon, cette méthode non-invasive fournit un fort contraste sur les structures imagées et est adéquate pour des imageries *in-vivo* qui s'inscrivent sur le long terme. La microscopie confocale par fluorescence a notamment eu une contribution décisive dans la compréhension de la dynamique du développement des cellules gliales qui forment la gaine de myéline (oligodendrocytes et cellules de Schwann).

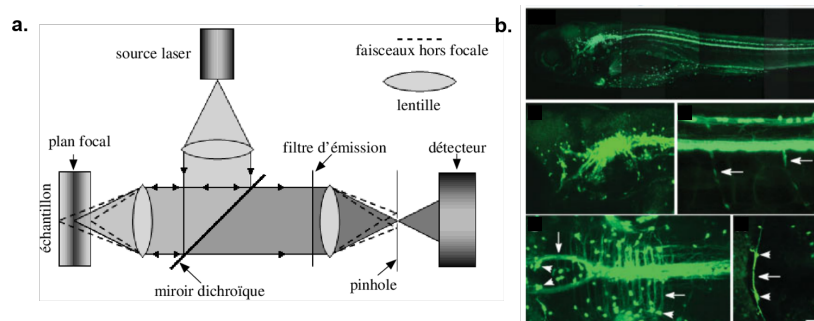


FIGURE 1.11 – Contraste confocal sur des tissus myélinisés. a. Dispositif d'imagerie confocale. b. Images en contraste 1PEF sur un poisson-zèbre *Tg(mbp:egfp)*, vues latérales et dorsales de la moelle épinière. Adapté de [55].

Face au manque de stratégies de marquage *in vivo* des structures cellulaires (dont la myéline), d'autres techniques sans marquage ont émergé pour s'affranchir des difficultés inhérentes à la microscopie confocale : le SCoRe, l'OCT et les techniques d'imagerie multiphotonique que nous allons présenter dans la partie suivante.

### c) Microscopie confocale par réflectance spectrale (SCoRe)

Cette technique d'imagerie sans marquage à haute résolution - dérivée de la microscopie confocale - repose sur la superposition des signaux réfléchis par l'échantillon issus de plusieurs lasers monochromatiques ou d'un laser supercontinuum. Son principe simple et relativement facile à implémenter sur un système confocal à balayage classique équipé d'un système de détection multi-spectrale la rend particulièrement attractive pour l'obtention d'informations structurales dans des échantillons fortement réfléchissants et éventuellement en complément d'autres techniques d'imagerie telles que la microscopie confocale par fluorescence ou la microscopie à deux photons.

Schain et al. [56] ont fait la première démonstration en 2014 de l'imagerie *in vivo* en contraste SCoRe de la structure du réseau des axones myélinisés dans les couches corticales I et V à travers une fenêtre crânienne dans une souris anesthésiée. Les signaux de réflexion importants émanant des axones myélinisés trouvent leur origine dans les fortes propriétés de réflexion de la gaine de myéline. Ils ont également imagé la moelle épinière et le nerf périphérique de souris et ont identifié des caractéristiques structurales telles que les noeuds de Ranvier et les incisions de Schmidt-Lanterman. La profondeur d'imagerie est limitée par l'utilisation de longueurs d'onde dans le domaine visible ; cependant l'imagerie SCoRe permet parfois d'atteindre quelques centaines de microns dans les tissus et notamment d'imaginer les axones du cortex dans la souris. Un aspect intéressant de cette technique repose sur l'unicité des motifs colorés de chaque fibre myélinisée, qui facilite le tracage dans les régions denses.

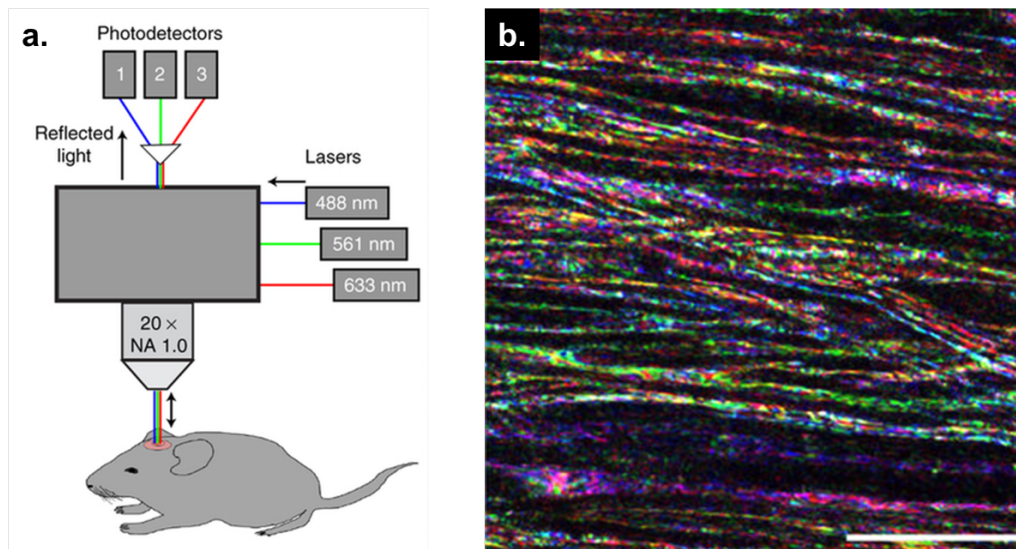


FIGURE 1.12 – Contraste SCoRe sur des tissus myélinisés. a. Dispositif d'imagerie SCoRe équipé de 3 sources monochromatiques et de 3 photodétecteurs permettant la détection multispectrale simultanée des signaux réfléchis par l'échantillon. b. Images SCoRe multicolore révélant des structures de myéline distinctes dans la moelle-épineière *in vivo*. Adapté de [56].

### d) Tomographie par contraste optique (OCT)

Le principe de la tomographie par cohérence optique repose sur le sectionnement transverse d'un plan d'imagerie par interférence entre un faisceau réfléchi par l'échantillon et un faisceau de référence issu d'une source d'excitation à faible cohérence temporelle. Ce dispositif permet également d'amplifier le faible signal réfléchi par l'échantillon grâce au phénomène d'interférence. Un avantage de l'OCT par rapport à la microscopie confocale est sa meilleure profondeur de pénétration dans les milieux diffusants (jusqu'à  $> 300 \mu m$  sur des tissus myélinisés en configuration *in vivo* [57]). En revanche, sa résolution spatiale axiale est limitée par la longueur de cohérence de la source (une dizaine de microns) et sa résolution latérale par l'ouverture numérique de l'objectif (quelques microns). Plusieurs approches ont été proposées pour améliorer sa résolution latérale jusqu'au micron avec un système d'optique adaptative, de combiner l'imagerie par OCT avec un système confocal [58] ou un système plein champ avec CCD [59].

L'imagerie par OCT s'appuie sur la lumière rétro-diffusée grâce aux propriétés de réflexion de l'échantillon. C'est donc une technique très efficace pour observer la rétine qui possède d'importantes applications biomédicales en ophtalmologie. L'OCT est également utilisé pour l'imagerie de la cornée, de l'artère coronale, de l'épiderme, etc.

La première démonstration d'imagerie de fibres myélinisées longitudinales par OCT plein champ (*deep-OCM*) a été réalisée par Ben Arous et al. en 2011 [57]. En s'appuyant sur le fort signal endogène rétro-diffusé par la myéline, ils ont montré la capacité à imager *in vivo* des fibres myélinisées individuelles dans une région corticale et sur un nerf sciatique de rat. L'imagerie par OCT a récemment été couplée à une excitation résolue en polarisation (PS-OCT) pour venir sonder les propriétés optiques de biréfringence du nerf sciatique de rat après une lésion [60].

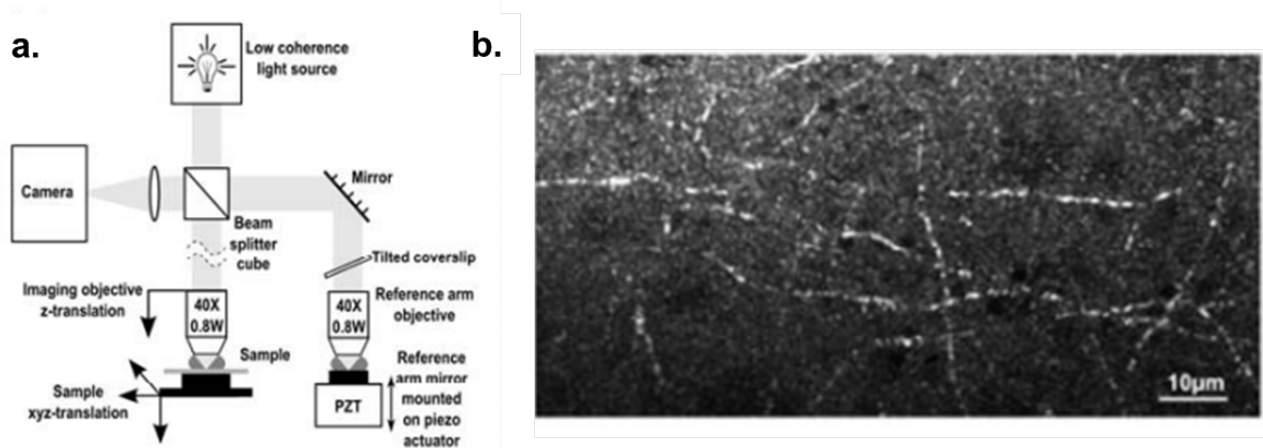


FIGURE 1.13 – Contraste OCT sur les tissus myélinisés. a. Dispositif d'imagerie OCT plein champ optimisé pour l'acquisition à forte résolution et en profondeur d'images sur des tissus biologiques diffusants (*deep-OCM*). b. Projection d'une pile d'images en contraste OCT sur une tranche de cortex de rat. Adapté de [57].



## 1.3 Imagerie multiphotons : principes et applications à l'imagerie de la myéline

La **microscopie non-linéaire ou multiphotons** contourne les limitations inhérentes à l'imagerie linéaire - en permettant notamment d'atteindre des profondeurs de pénétration plus élevées - ce qui lui a valu de devenir un outil incontournable en microscopie depuis les années 2000. L'association des processus multiphotons avec un microscope à balayage - décrite pour la première fois par Sheppard et al. en 1978 [61] - a été implémentée pour la première fois par Denk et al. en 1990 pour la fluorescence excitée à deux photons (2PEF) [62].

La microscopie multiphotons repose sur des processus optiques nonlinéaires qui doivent leur nom au fait que l'intensité du signal émis dépend des puissances (carré, cube, etc.) de l'intensité d'excitation. Les mécanismes à l'origine du contraste multiphotons sont de deux types : **incohérents** s'ils sont liés à un processus d'absorption par les fluorophores exogènes ou endogènes de l'échantillon - comme la fluorescence excitée à deux photons (2PEF) ou à trois photons (3PEF) - et **cohérents** s'ils trouvent leur origine dans les propriétés structurales ou chimiques du milieu - tels que la génération de seconde harmonique (SHG), de troisième harmonique (THG) et de diffusion Raman cohérente (CARS, SRS).

Dans les paragraphes suivants, nous allons décrire les principes de l'excitation multiphotons et les applications des principales techniques nonlinéaires pour l'imagerie des axones myélinisés en neurosciences.

### 1.3.1 Principes de l'excitation multiphotonique

#### a) Réponse non-linéaire du milieu

Lorsqu'un champ électrique faible est appliqué sur un matériau diélectrique, le potentiel des électrons polarisables qu'il contient est assimilable à un potentiel harmonique dans lequel les électrons oscillent linéairement avec une faible amplitude. Le dipôle induit  $\vec{p} = q \times \Delta \vec{x}(t)$  oscille à une seule fréquence  $\omega$  qui est celle du champ électro-magnétique appliqué. La grandeur macroscopique associée à l'ensemble des dipôles induits dans le milieu diélectrique - appelée polarisation - s'écrit :  $\vec{P} = \epsilon_0 \underline{\chi}^{(1)} \vec{E}$ , où  $\epsilon_0$  est la permittivité du vide et  $\underline{\chi}^{(1)}$  est la réponse électrique linéaire du matériau.

En revanche, lorsqu'ils sont soumis à un **champ électromagnétique intense**, le caractère anharmonique de leur potentiel ne peut plus être négligé et les électrons oscillent non-linéairement dans le potentiel avec une plus grande amplitude.

Les dipôles induits présentent maintenant une réponse non-linéaire qui se traduit à l'échelle macroscopique par une réponse non-linéaire de la polarisation induite avec des nouvelles composantes fréquentielles :

$$\vec{P} = \vec{P}(w) + \vec{P}(2w) + \vec{P}(3w) + \dots \quad (1.1)$$

avec :

$$\begin{cases} P_i(w) = \sum_j \epsilon_0 \chi_{ij}^{(1)} E_j(w) \\ P_i(2w) = \sum_{jk} \epsilon_0 \chi_{ijk}^{(2)} E_j(w) E_k(w) \\ P_i(3w) = \sum_{jkl} \epsilon_0 \chi_{ijkl}^{(3)} E_j(w) E_k(w) E_l(w) \end{cases} \quad (1.2)$$

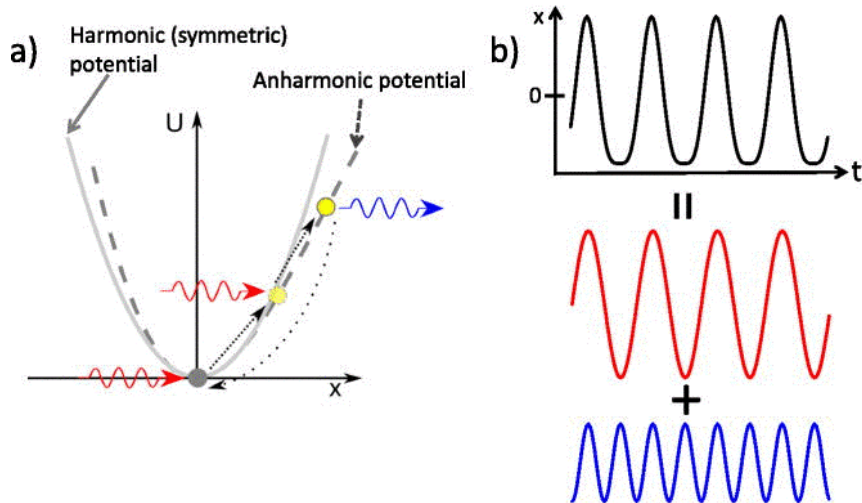


FIGURE 1.14 – a. Puits de potentiel harmonique et anharmonique. b. Fréquences du champ généré. Adapté de [63].

où  $\chi^{(2)}$  et  $\chi^{(3)}$  sont les susceptibilités non-linéaires d'ordre 2 et 3 respectivement.

Les nouvelles composantes fréquentielles de la polarisation sont à l'origine de **champs électromagnétiques avec des nouvelles composantes fréquentielles**. Parmi les nouvelles fréquences apparues, on trouve des sommes de la fréquence d'excitation, appelées harmoniques (ex : seconde harmonique, troisième harmonique), et des soustractions de fréquences qui sont à la base du mécanisme de diffusion Raman stimulée par exemple.

Les états d'énergie mis en jeu par ces mécanismes sont traditionnellement représentés sur des diagrammes de Jablonski (cf. figure 1.15). Les traits continus y représentent des états électroniques vibrationnels et ceux en pointillés correspondent à des états électroniques virtuels.

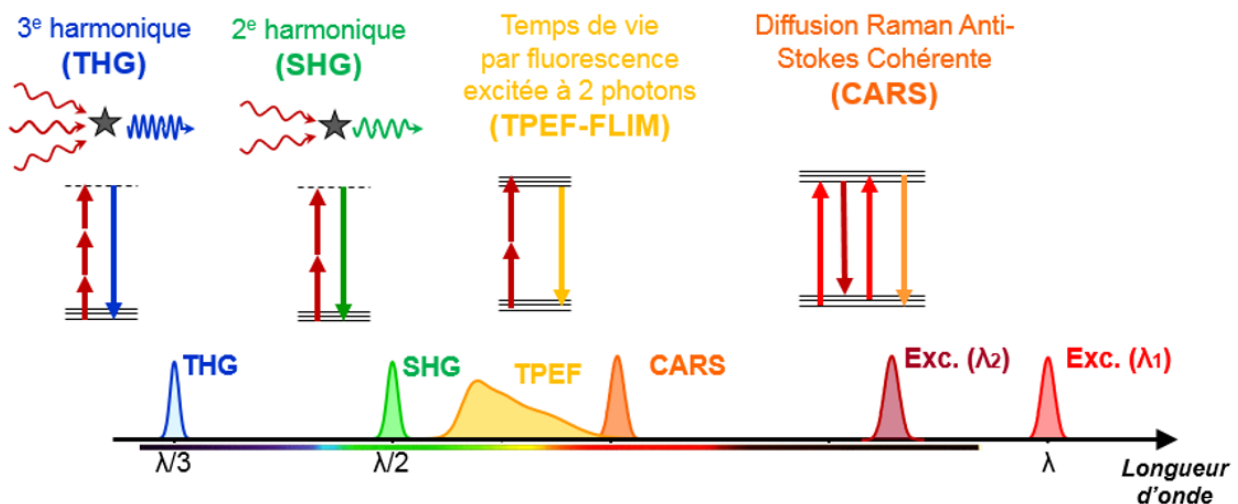


FIGURE 1.15 – Diagrammes de Jablonski des processus nonlinéaires fréquemment rencontrés en microscopie multiphotonique : SHG, THG, 2PEF, CARS.

## b) Génération de signaux non-linéaires détectables

La probabilité d'apparition de ces processus est très faible car ils requièrent l'interaction simultanée de plusieurs photons arrivant en phase sur une molécule. Pour générer un signal non-linéaire mesurable, l'intensité d'excitation doit être très intense, ce qui ne peut être réalisé qu'en appliquant une grande puissance d'excitation sur une petite surface.

### - Confinement spatial de l'excitation : Utilisation d'objectifs à forte ouverture numérique

Pour focaliser fortement le faisceau d'excitation, des objectifs à grande ouverture numérique sont généralement utilisés (typiquement  $NA = 0.8 - 1.2$ ). Les résolutions latérales et axiales des processus à  $N$  photons se déduisent des relations fournies par Denk et al. [62] :

$$w_{xy} = \begin{cases} \frac{0.320\lambda}{\sqrt{N}NA} & NA \leq 0.7 \\ \frac{0.325\lambda}{\sqrt{N}NA^{0.91}} & NA > 0.7 \end{cases} \quad w_z = \frac{0.532\lambda}{\sqrt{N}} \left[ \frac{1}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \right] \quad (1.3)$$

### - Confinement temporel de l'excitation : Utilisation de sources lasers femtosecondes

Un point critique provient du fait que la puissance moyenne d'excitation maximale supportée par l'échantillon (i.e. n'entraînant pas de photodommages indésirables) ne permet pas de générer des signaux observables. Le développement des sources lasers femtosecondes compactes à partir des années 80-90 a considérablement profité au développement de la microscopie multiphotonique en permettant d'atteindre des puissances crêtes élevées tout en conservant des puissances moyennes modérées grâce à des lasers à impulsions courtes.

En effet, alors que l'intensité d'un processus à  $N$  photons généré par une source d'excitation continue suit la relation :  $\langle I_{NHG} \rangle \propto \langle I_w \rangle^N$ , celle générée par une source à impulsions de durée  $\tau$  avec un taux de répétition  $T = 1/f$  s'écrit :  $\langle I_{NHG} \rangle \propto \left(\frac{T}{\tau}\right)^{N-1} \langle I_w \rangle^N$ . Il apparaît ainsi qu'on peut gagner plusieurs ordres de grandeurs sur l'intensité du signal généré en utilisant des impulsions courtes avec un faible taux de répétition tout en maintenant une faible puissance moyenne d'excitation. De cette façon il est possible de mesurer des signaux non-linéaires sans pour autant endommager l'échantillon.

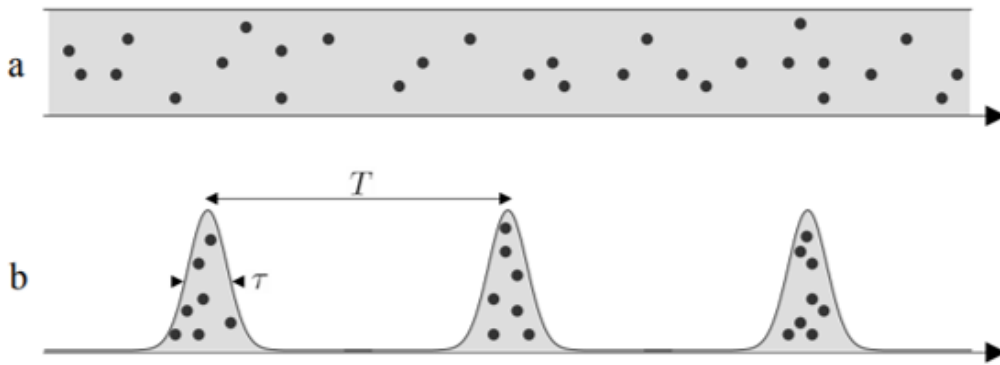


FIGURE 1.16 – Comparaison des distributions temporelles des photons issus (a) d'une source laser continue et (b) d'un laser à impulsion. Adapté de [64].

### c) Acquisition d'images avec un système de balayage point par point

Ces dernières techniques non-linéaires ont été combinées à des **systèmes de balayage point par point** du volume focal réalisé avec des miroirs galvanométriques ou résonnants pour générer des images en contraste multiphotons des échantillons.

### d) Avantages de la microscopie multiphotons sur la microscopie linéaire

(i) Un premier avantage provient du confinement de l'excitation multiphotonique au niveau du volume focal où la densité de flux de photons est suffisamment élevée pour que le processus non-linéaire puisse se produire (cf. figure 1.17.a). La microscopie multiphotonique présente ainsi une **capacité intrinsèque de sectionnement optique** (absence de diaphragme) avec une **résolution spatiale micrométrique** adéquate pour l'**imagerie 3D**.

(ii) Ensuite, la longueur d'onde d'excitation est généralement choisie dans le **domaine proche infrarouge** qui coïncide avec la fenêtre de transparence des tissus biologiques, caractérisée par un **minimum d'absorption** (cf. figure 1.17.b). De plus, comme la diffusion est limitée au volume focal, aucun signal non-linéaire n'est généré en dehors du volume focal et il apparaît moins de photodommages dans l'échantillon. L'optimisation conjointe de l'absorption et de la diffusion permet de conserver un bon rapport signal à bruit en profondeur, ce qui permet *in fine* d'améliorer la profondeur de pénétration d'un facteur 2 environ par comparaison avec la microscopie confocale. La microscopie non-linéaire offre ainsi la possibilité d'**imager des tissus épais en 3D**. A titre d'exemple, il a été rapporté une profondeur de pénétration de 1 mm dans le néocortex d'une souris vivante en limitant les photodommages [65].

(iii) Le dernier aspect avantageux de la microscopie multiphotonique provient de la **possibilité de combiner plusieurs contrastes non-linéaires** lorsque les signaux générés correspondent à des fenêtres fréquentielles disjointes. Ce caractère unique de l'**imagerie multiphotonique multimodale** permet d'accéder simultanément à des informations structurales complémentaires.

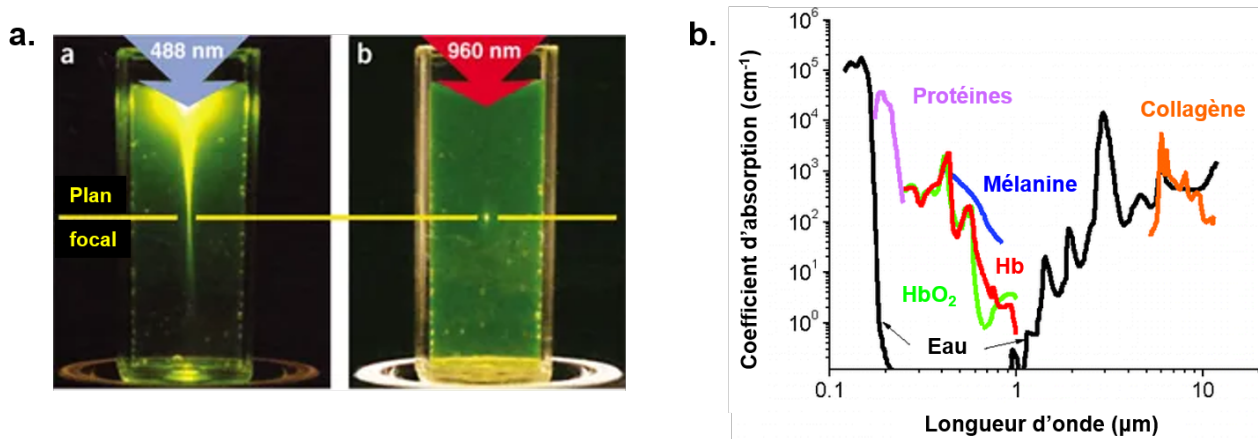


FIGURE 1.17 – a. Comparaison de la localisation de l'excitation pour les processus de fluorescence par excitation à un et deux photons dans une solution de fluorescéine. L'excitation du processus 1PEF est localisée sur l'ensemble du cône de propagation du faisceau incident dans l'échantillon, tandis que l'excitation du processus 2PEF est confinée au volume focal. Adapté de [42]. b. Spectre d'absorption des protéines typiques.



### 1.3.2 Processus non-linéaires incohérents (2PEF, 3PEF)

Comme nous l'avons vu précédemment, une première catégorie de processus multiphotons correspond à des **processus non-cohérents** générés par excitation à deux (2PEF) ou à trois photons (3PEF). A la différence des processus cohérents, la molécule subit un phénomène de relaxation vibrationnelle entre l'absorption des photons d'excitation et l'émission d'un photon. Ce phénomène de relaxation est à l'origine du caractère aléatoire de la phase du photon émis. A l'échelle du volume focal, l'ensemble des photons émis possèdent des phases qui ne présentent aucune relation les unes avec les autres. Par conséquent, l'intensité du signal de fluorescence généré doit être estimée en tenant compte de la phase des photons individuels, c'est-à-dire en sommant les intensités 2PEF émises par toutes les molécules fluorescentes du volume focal, et non les champs générés. Par le calcul, on peut montrer qu'elle est directement **proportionnelle au nombre de fluorophores** de l'échantillon. Une autre particularité du signal de fluorescence est son caractère **non-directionnel** (ou isotrope). Comme ces processus présentent la même efficacité vers l'avant ou vers l'arrière, on peut utiliser de manière équivalente une collection en transmission ou en épifluorescence sur des échantillons minces.

#### a) Microscopie de fluorescence excitée à deux photons (2PEF)

La microscopie de fluorescence excitée à deux photons (2PEF) est la modalité d'imagerie la plus utilisée en microscopie multiphoton. Découverte en 1929 par Maria Göppert-Mayer [66], elle repose sur l'**absorption simultanée de deux photons**. L'intensité 2PEF totale dépend linéairement de la densité de fluorophores  $N$  et du carré de l'intensité d'excitation  $I_w$  selon la relation suivante :  $I_{2PEF} \propto N\sigma^{(2)}I_w^2$  où  $\sigma^{(2)}$  est la section efficace d'absorption à deux photons. Denk et al. [62] ont été les premiers à combiner le processus 2PEF avec un système de balayage du volume focal pour réaliser les premières images en contraste 2PEF sur des populations de cellules colorées avec des colorants excitables en 2PEF. Depuis, elle a été appliquée *in vivo* sur des animaux transgéniques dont certaines sous-populations de cellules expriment des protéines fluorescentes pour visualiser des dendrites [67], les couches profondes de tissu nerveux du CNS [68], le néocortex d'une souris vivante jusqu'à 1 mm de profondeur [65],[69].

La microscopie 2PEF permet également de visualiser des sous-types cellulaires non-marqués grâce à la fluorescence provenant de chromophores cellulaires endogènes tels que le NADH dans son état réduit, les flavoprotéines dans leur état oxydé, etc. Combinée avec des mesures de temps de vie de fluorescence, elle est également utilisée pour réaliser des mesures quantitatives sur le métabolisme de sous-types cellulaires (microscopie par temps de vie de fluorescence) [70].

#### b) Microscopie de fluorescence excitée à trois photons (3PEF)

La microscopie de fluorescence excitée à trois photons présente la capacité d'imager des tissus épais optiquement diffusants comme les tissus nerveux myélinisés jusqu'à des profondeurs plus élevées que l'imagerie 2PEF. La première démonstration de fluorescence excitée à trois photons a été rapporté par Maiti et al. en 1997 [71], et le premier dispositif d'imagerie 3PEF a été présenté par l'équipe de C. Xu seulement en 2013 [72].

Bien que ces techniques d'imagerie par absorption à plusieurs photons présentent une résolution submicrométrique, elles requièrent dans leur grande majorité la présence de protéines fluorescentes exogènes qui induisent la présence potentielle d'altérations des fonctions cellulaires, d'artefacts et de photoblanchiment. Nous allons voir maintenant comment les processus cohérents permettent de s'affranchir des limitations propres aux contrastes 2PEF et 3PEF.

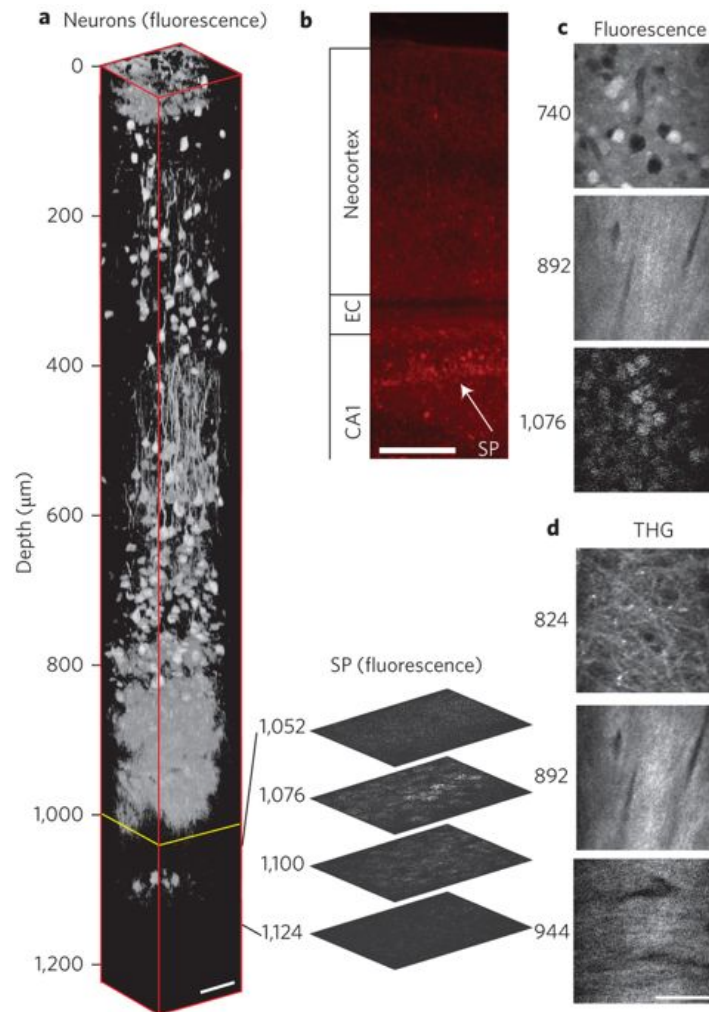


FIGURE 1.18 – Reconstruction 3D d’images en contraste 3PEF acquise *in vivo* sur un cerveau d’une souris transgénique avec un marquage RFP des neurones pyramidaux. [72]

### 1.3.3 Processus non-linéaires cohérents (SHG, THG, CARS, SRS)

Depuis les années 90, un intérêt croissant est porté aux processus multiphotoniques cohérents qui ne requièrent ni marquage ni coloration avec des protéines fluorescentes puisqu’ils dépendent des propriétés structurales ou chimiques de l’échantillon. Leur mécanisme de contraste repose sur un phénomène de diffusion cohérente de plusieurs photons incidents en phase par une molécule, avec émission simultanée d’un photon sans qu’il y ait d’absorption d’énergie par le milieu. Compte tenu de la relation de phase qui existe entre les photons émis dans le volume focal, le champ total mesuré est ici proportionnel à la somme des champs électriques générés. L’intensité résultante est donc proportionnelle en première approximation au **carré du nombre de diffuseurs dans le volume focal** [73]. Plus précisément, par leur dépendance avec l’accord de phase et avec la susceptibilité du matériau, les signaux cohérents émis sont fortement dépendants de la structure submicrométrique du matériau sondé. Un domaine de recherche actuel et sur lequel nous reviendrons plus tard consiste à venir sonder les propriétés moléculaires de structures organisées grâce à l’étude de la dépendance de la réponse nonlinéaire du milieu avec l’orientation de polarisation d’excitation. Un dernier point à noter est que ces processus sont principalement dirigés vers l’avant à cause de l’accord de phase, sauf s’ils sont ultérieurement rétrodiffusés par l’échantillon.

### a) Microscopie par génération de seconde harmonique (SHG)

Le mécanisme de génération de seconde harmonique (SHG) repose sur la **conversion de deux photons d'excitation à la fréquence  $w$  en un photon à la fréquence double  $2w$**  qui implique uniquement des niveaux d'énergie virtuels (processus paramétrique). L'absence de signal dans les milieux centro-symétriques - caractérisés par un  $\chi^{(2)}$  nul - fait de la SHG un contraste spécifique de certaines structures fibrillaires macromoléculaires.

Depuis la première démonstration de la microscopie SHG par Gannaway et Sheppard en 1978, l'imagerie SHG a montré un intérêt remarquable avec une grande spécificité pour l'observation de plusieurs structures : les **filaments de myosine**, les **fibres de collagène** ([74], [75]), des **microtubules** ([76], [77], [78]), des **membranes cellulaires** ([79]).

Dans le cadre de notre étude sur la myéline, on peut également citer la sensibilité du contraste SHG aux **prolongements des astrocytes** [80] et aux **microtubules axonaux** sur des cultures de neurones, sur des tranches de l'hippocampe et des tranches corticales de rat [81].

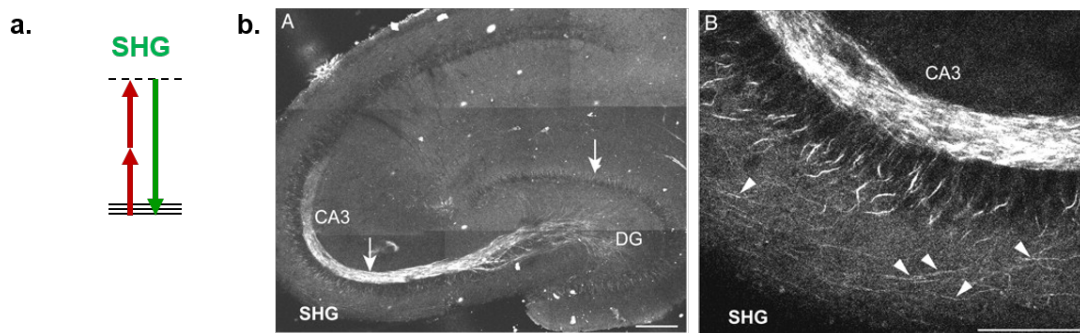


FIGURE 1.19 – a. Dispositif d'acquisition SHG. b. Acquisition en contraste SHG sur des tranches de cerveau préparées au niveau de l'hippocampe. [81].

### b) Microscopie par génération de troisième harmonique (THG)

Le mécanisme de génération de la troisième harmonique (THG) repose sur la **recombinaison de trois photons incidents en phase à la fréquence  $w$  en un unique photon à la fréquence triple  $3w$** . Compte tenu de son caractère cohérent, le processus THG implique des niveaux virtuels de haute énergie et ne présente donc pas de spécificité chimique lorsque la fréquence d'excitation impliquée est loin des résonances du milieu. A la différence de la SHG, le signal THG apparaît aussi bien dans des milieux non centro-symétriques que dans des milieux centro-symétriques grâce à sa dépendance avec le cube (ordre impair) du champ électrique incident, ce qui implique qu'il peut être généré dans n'importe quelle structure biologique indépendamment de ses propriétés de symétrie. Cependant, une propriété qui restreint la présence du signal THG provient du déphasage de  $\pi$  - appelé **déphasage de Gouy** - subi par la phase d'un faisceau gaussien fortement focalisé à la traversée du foyer. Une conséquence est que les signaux THG générés avant et après le plan focal interfèrent destructivement dans les milieux isotropes avec une dispersion normale conduisant à l'absence de signal THG dans ces milieux [73]. En revanche, la présence d'une interface ou d'une hétérogénéité dans le volume focal se traduit par un signal THG, qui est majoritairement émis vers l'avant. Les propriétés du mécanisme de contraste THG seront décrites exhaustivement dans la dernière partie de ce chapitre et dans le chapitre 2.

La sensibilité du contraste THG sur les interfaces et les hétérogénéités en a fait un outil pour observer la morphologie des tissus. La microscopie de troisième harmonique a été développée pour la première fois par Barad et al. en 1997 [82]. Elle a été utilisée pour l'**imagerie de végétaux** - les cellules végétales [83], les rhizoïdes d'algues *Chara* [84]. La microscopie THG a également été utilisée pour l'**imagerie de tissus animaux** comme les embryons et larves de poisson-zèbre [85], [86], les cardiomyocytes [87], les embryons de drosophile [88], l'élastine du cartilage de souris [89], les pigments d'hémozoiné [90] et la cornée humaine [91].

Une propriété notable du signal THG - mise en évidence par Débarre et al. [88] sur des graines de plantes - consiste en son intensification en présence de corps lipidiques dans les échantillons. Cette propriété a ensuite été utilisée pour **imager des neurones myélinisés**.

Elle a aussi été utilisée pour l'imagerie des neurones et de leurs extensions [92], [93]

La **sensibilité du contraste THG sur la myéline des tissus du système nerveux** du modèle murin a été mise en évidence en 2011 par Farrar et al. [94] et Witte et al. [95].

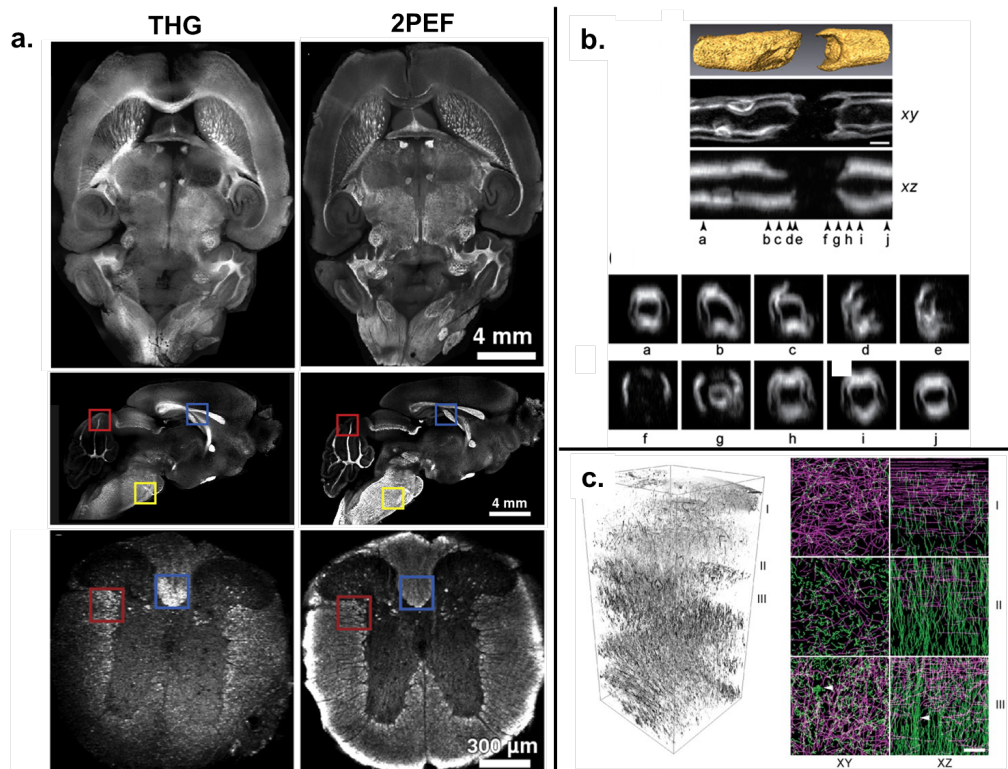


FIGURE 1.20 – Contraste THG sur des tissus myélinisés. (a). Comparaison des contrastes THG et 2PEF dans le cerveau de souris en coupes horizontale et sagittale et sur une coupe transverse de la moëlle épinière. Adapté de [94] (b). Approche électrophysiologique, adapté de [95] (c). Cartographie 3D du cortex de souris, adapté de [96]

Farrar et al. [94] ont montré l'émergence d'un fort contraste THG dans la substance blanche de tissu de cerveau (corps calleux, cervelet, cerveau postérieur) et de moëlle épinière de souris fixés lié à la présence de myéline (cf. figure 1.20.a). Ils ont également mis en évidence une diminution du contraste THG issu de tissus normaux *versus* tissus hypomyélinisés de souris *shiverer* d'un facteur proche de 2.5. En plus de cette caractérisation *ex vivo* du contraste THG, ils ont fait la première démonstration d'imagerie THG *in vivo* du CNS sur des moelles épinières de souris et de poisson-zèbre.

La même année, Witte et al. ont également démontré la sensibilité du contraste THG sur des



tissus de souris vivantes et fixés dans le cerveau. Ils notent la présence de signal THG dans la matière grise. En s'appuyant sur le contraste négatif des corps cellulaires neuronaux, ils ont démontré le potentiel de la microscopie THG combinée à de l'électrophysiologie. [95]

Un autre groupe a imagé les nerfs sciatiques dans le système périphérique de la souris et a profité des larges dimensions de ces axones pour observer des caractéristiques structurales avec les noeuds de Ranvier, les incisions de Schmidt-Lanterman. [97]

Récemment, Redlich et al. ont réalisé une remarquable démonstration de l'imagerie THG *in vivo* dans les couches corticales de souris à travers une fenêtre transcrânienne [96]

### - Microscopie par diffusion Raman anti-Stokes cohérente (CARS) et par diffusion Raman stimulée (SRS) :

Contrairement aux contrastes SHG et THG, les contrastes CARS et SRS présentent une propriété de **spécificité chimique** qui résulte de l'**excitation d'un état vibrationnel des molécules endogènes**. Ces deux processus non-linéaires de mélange à 4 ondes reposent sur l'utilisation de deux sources impulsionnelles - un faisceau de pompe et un faisceau Stokes - dont les fréquences respectives ( $w_p$  et  $w_s$ ) sont choisies pour que la différence entre ces fréquences ( $w_p - w_s$ ) corresponde à la fréquence Raman d'une liaison chimique de molécules présentes dans l'échantillon. Excitée à sa fréquence de résonance, la liaison se comporte alors comme un oscillateur résonant dans le volume focal. Le faible contraste Raman spontané est ainsi augmenté d'un contraste vibrationnel additionnel à la fréquence anti-Stokes  $w_{as} = 2w_p - w_s$  pour le CARS et  $w_p$  pour le SRS. L'intensité des signaux CARS et SRS - deux processus cohérents - augmente de manière quadratique avec le nombre d'oscillateurs vibrationnels dans le volume focal.

L'utilisation la plus fréquente de ces contrastes consiste à imager les lipides de manière spécifique en venant exciter la vibration carbone-hydrogène (C-H). Ils ont été appliqués efficacement pour visualiser des bicouches lipidiques uniques [98] et des gouttelettes lipidiques dans les cellules adipeuses [99].

En venant également sonder la réponse CARS issue de la vibration des liaisons  $CH_2$  présentes en grand nombre dans les lipides de la myéline, Wang et al. [100] ont démontré pour la première fois l'intérêt du contraste CARS pour **visualiser *in vivo* les gaines de myéline d'axones de moelle épinière** de cochons-d'Inde avec la possibilité d'identifier des caractéristiques structurales des axones myélinisés telles que le g-ratio, les noeuds de Ranvier et les incisions de Schmidt-Lanterman. (cf. figure 1.21). Grâce à la structure multilamellaire compacte et la forte organisation des groupes  $CH_2$  dans les bicouches de sa membrane, ils ont également montré que la dépendance de la réponse CARS en transmission (F-CARS) avec l'orientation de la polarisation d'excitation qui peut être utilisée pour remonter à l'orientation et à l'organisation des lipides dans la gaine de myéline. Par la suite, l'imagerie CARS a été utilisée pour imager *in vivo* le nerf sciatique de souris [101], pour **cartographier *ex vivo* et *in vivo* les fibres myélinisées non marquées** dans le système nerveux de cerveau de souris [102], [103], [104] [105].

En combinant la microscopie CARS avec des stratégies polarimétriques diverses, la forte dépendance du signal CARS issu de la gaine de myéline avec la polarisation d'excitation permet de sonder de manière quantitative les propriétés d'**ordre et d'orientation des lipides dans la myéline** grâce aux propriétés de symétrie importantes de la myéline. L'équipe de D. Côté a récemment montré que la microscopie P-CARS *in vivo* pourrait révéler des **changements d'organisation moléculaire de la myéline** des axones Mauthner d'embryons de poisson-zèbre, comme l'augmentation de l'ordre induite par la myélinisation embryonnaire naturelle et par des traitements pro-remyélinisants, ainsi qu'à la diminution de l'ordre causée par des

traitements démyélinisants [106].

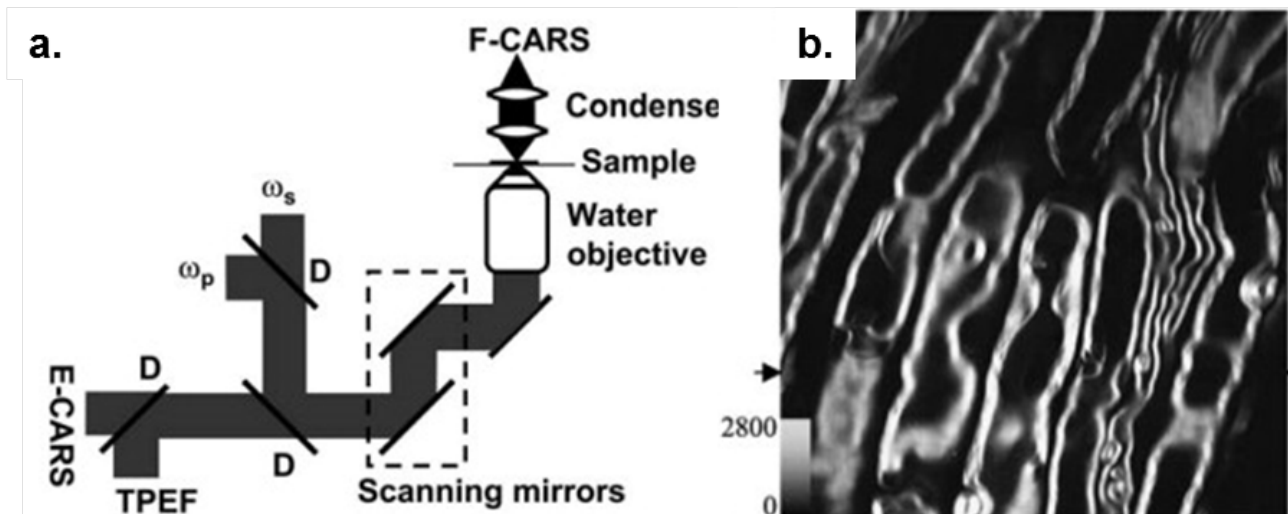


FIGURE 1.21 – Contraste CARS sur les tissus myélinisés. a. Dispositif d'imagerie CARS. b. Image d'axones myélinisés en contraste CARS en transmission. Adapté de [100]

## 1.4 Microscopie par Génération de Troisième Harmonique (THG)

La microscopie THG est un processus non linéaire du troisième ordre ( $3\omega = \omega + \omega + \omega$ ) utilisé en microscopie multiphotonique pour sa capacité à révéler sans marquage des informations structurales avec une résolution latérale et axiale micrométrique. Les propriétés du mécanisme de contraste THG permettent d'une part de visualiser des hétérogénéités dans un échantillon en s'affranchissant du fond issu du milieu environnant, et d'autre part, de détecter les matériaux anisotropes et d'en caractériser les propriétés optiques et l'orientation de leurs axes optiques.

Cette partie décrit le **mécanisme de contraste** de la génération de troisième harmonique pour un faisceau d'excitation gaussien focalisé en régime paraxial, puis le **modèle semi-analytique** utilisé habituellement pour réaliser des simulations, et enfin les **conséquences de ce mécanisme de contraste sur les images THG** réalisées sur des échantillons biologiques.

### 1.4.1 Mécanisme de contraste THG

De manière générale, le contraste THG émerge en présence de **variations spatiales de l'indice optique linéaire  $n$**  et/ou de **variations spatiales de la réponse non-linéaire  $\chi^{(3)}$  d'ordre 3**. Cette propriété confère aux images en contraste THG quelques ressemblances avec celles obtenues en microscopie en fond noir ou encore avec celles réalisées en microscopie à contraste de phase ou à contraste interférentiel différentiel Nomarski (DIC) qui convertissent une différence de phase induite par des variations de l'indice optique linéaire en une différence d'intensité.

Cette partie rappelle la description analytique de la réponse THG, depuis la réponse non-linéaire d'ordre 3 du matériau à l'échelle du volume d'excitation d'un microscope THG, l'expression d'un champ d'excitation gaussien, celle de la polarisation non-linéaire induite, puis l'expression complète de l'intensité THG et enfin les caractéristiques du signal THG.

### a) Réponse nonlinéaire d'ordre 3 du matériau

La réponse THG macroscopique trouve son origine dans les propriétés optiques du matériau à l'échelle moléculaire, et plus spécifiquement dans la réponse électronique non-linéaire d'ordre 3 des liaisons chimiques et dans l'arrangement des molécules les unes avec les autres. Une description multi-échelle de la réponse non-linéaire de molécules organisées en réseau peut être obtenue avec le modèle liaison-charge - décrit succinctement dans les paragraphes suivants - qui fournit une valeur prédictive de la réponse macroscopique, confirmée expérimentalement.

#### - Réponse non-linéaire d'ordre 3 des liaisons chimiques

Les propriétés électroniques d'un réseau cristallin dérivent de l'implication d'électrons de la couche externe d'atomes dans les liaisons atomiques. Ces électrons - décrits comme des charges ponctuelles localisées entre deux ions A et B - confèrent à chaque liaison de la molécule une polarisabilité linéaire et une polarisabilité d'ordres plus élevés en présence d'un champ électrique. La polarisabilité à la fréquence  $3\omega$  est caractérisée par l'**hyperpolarisabilité d'ordre 3** notée  $\gamma^{(3) \text{ liaison}}$  qui s'écrit comme un tenseur de dimensions  $3^4$ . La valeur de l'hyperpolarisabilité  $\gamma^{(3) \text{ liaison}}$  de chaque liaison peut être calculée numériquement avec le modèle de charge-liaison ou expérimentalement avec des mesures de diffusion non-linéaires [107].

#### - Réponse non-linéaire d'ordre 3 moléculaire

A l'échelle de la molécule, la réponse moléculaire non-linéaire d'ordre 3 - appelée hyperpolarisabilité moléculaire électronique et notée  $\gamma^{(3) \text{ molécule}}$  - correspond à l'ensemble des réponses non-linéaires du troisième ordre des liaisons polarisables de la molécule. De manière analytique, la valeur du  $\gamma^{(3) \text{ molécule}}$  est estimée en sommant les hyperpolarisabilités individuelles  $\gamma^{(3) \text{ liaison}}$  de chaque liaison en prenant en compte leurs orientations (modèle d'additivité des liaisons) :

$$\gamma_{ijkl}^{(3) \text{ molécule}} = \sum_{\text{liaisons}} \sum_{n=1}^{N_{\text{liaison}}} \sum_{i'j'k'l'} (\vec{i}' \cdot \vec{i})(\vec{j}' \cdot \vec{j})(\vec{k}' \cdot \vec{k})(\vec{l}' \cdot \vec{l}) \gamma_{i'j'k'l'}^{(3) \text{ liaison}} \quad (1.4)$$

Lorsque certaines liaisons avec une grande polarisabilité non-linéaire sont alignées dans les molécules, l'hyperpolarisabilité moléculaire  $\gamma^{(3) \text{ molécule}}$  du troisième ordre présente une réponse anisotrope, tandis que si les liaisons ne présentent pas d'orientation privilégiée dans les molécules, elles contribuent à la réponse isotrope de la molécule.

#### - Réponse non-linéaire d'ordre 3 macroscopique

A l'échelle du volume focal, la réponse électronique macroscopique du troisième ordre - appelée **susceptibilité du troisième ordre** - est décrite par le tenseur  $\chi^{(3)}$  qui contient également  $3^4$  composantes. Elle dépend de l'ensemble des réponses du troisième ordre  $\gamma^{(3) \text{ molécule}}$  des molécules contenues dans le volume focal et de l'orientation des molécules :

$$\chi_{IJKL}^{(3)}(\langle \theta \rangle, \sigma) = \frac{L_{\omega}^3 L_{3\omega}}{NV} \sum_{ijkl} \gamma_{ijkl}^{(3) \text{ molécule}} \int_0^{2\pi} d\psi \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^{\pi} \sin(\theta) \rho(\theta) T_{Ii} T_{Jj} T_{Tt} T_{Ll} d\theta \quad (1.5)$$

Contrairement à la réponse de seconde harmonique du milieu notée  $\chi^{(2)}$ , tous les milieux possèdent un  $\chi^{(3)}$  électronique non nul.

On peut remarquer que le  $\chi^{(3)}$  des **milieux homogènes et isotropes** est donné par  $\chi_{ijkl}^{(3)} = \chi_0^{(3)}(\delta_{ij}\cdot\delta_{kl} + \delta_{ik}\cdot\delta_{jl} + \delta_{il}\cdot\delta_{jk})$  qui présente un seul élément indépendant (cf. annexe A) en utilisant les symétries de Kleinman (cf encart 1.1). La manière la plus classique d'évaluer l'amplitude  $\chi_0^{(3)}$  d'un milieu consiste à la déduire du profil d'intensité THG transverse mesuré sur une interface horizontale entre un matériau connu (lamelle de verre) et le milieu à caractériser. Le tableau de la figure 1.22 présente les valeurs des  $\chi_0^{(3)}$  de l'eau et de plusieurs milieux lipidiques isotropes.

**Encart 1.1 - Symétrie de Kleinman :**

Lorsque les fréquences fondamentale et harmonique sont éloignées des fréquences de résonance du milieu (autrement dit des transitions électroniques moléculaires), la propriété de symétrie de Kleinman stipule que tous les éléments du tenseur de susceptibilité reliés par une permutation des indices sont égaux. Cette propriété de symétrie des matériaux permet de réduire de manière conséquente le nombre d'éléments non-nuls indépendants des tenseurs de susceptibilité.

$\lambda = 1.18 \mu\text{m}$		$\chi^{(3)} (\times 10^{-22} \text{m}^2 \text{V}^{-2})$	$ \chi^{(3)} - \chi^{(3)}_{\text{water}} ^2$
Water	—	$1.68 \pm 0.08$	0
NaCl 1M	Ions	$1.79 \pm 0.09$	$1.2 \times 10^{-2}$
Glucose 1M	Sugar	$1.83 \pm 0.08$	$2.2 \times 10^{-2}$
Glycine 1M	Amino acid	$1.69 \pm 0.13$	$1.0 \times 10^{-4}$
Triglycine 1M	Polypeptide	$1.69 \pm 0.12$	$1.0 \times 10^{-4}$
BSA 1mM	Protein	$1.75 \pm 0.13$	$4.9 \times 10^{-3}$
Triglycerides	Lipids	$2.58 \pm 0.5$	0.81
Oil	Lipids	$2.71 \pm 0.5$	1.06
BK7	Glass	2.79	1.2

FIGURE 1.22 – Tableau des valeurs du  $\chi_0^{(3)}$  de l'eau, de milieux lipidiques (triglycérides, huile végétale) et du glycérol. Adapté de [64].

Dans le cas particulier d'une **structure anisotrope présentant une symétrie cylindrique**  $C_{v\infty}$ , le tenseur  $\chi^{(3)}$  compte 21 éléments non nuls avec seulement 3 termes indépendants en utilisant la symétrie de Kleinman. La symétrie cylindrique  $C_{v\infty}$  a notamment été utilisée pour décrire plusieurs milieux biologiques anisotropes comme la stroma de la cornée, des assemblages lipidiques organisés, des cristaux liquides, etc. Un matériau avec une symétrie cylindrique  $C_{v\infty}$  dont l'axe optique principal est orienté suivant  $x$ , possède les relations suivantes entre les éléments du  $\chi^{(3)}$  (cf. annexe A) :

$$\left\{ \begin{array}{l} \chi_{xxxx}^{(3)} = \chi_{||}^{(3)} \\ \frac{1}{3}\chi_{yyyy}^{(3)} = \frac{1}{3}\chi_{zzzz}^{(3)} = \chi_{yyzz}^{(3)} = \chi_{yzyz}^{(3)} = \chi_{zyzy}^{(3)} = \chi_{zyyz}^{(3)} = \frac{1}{3}\chi_{\perp}^{(3)} \\ \chi_{xxyy}^{(3)} = \chi_{xyyx}^{(3)} = \chi_{xyxy}^{(3)} = \chi_{xxzz}^{(3)} = \chi_{xzzx}^{(3)} = \chi_{xzzz}^{(3)} \\ \quad = \chi_{yyxx}^{(3)} = \chi_{yxyx}^{(3)} = \chi_{yxyx}^{(3)} = \chi_{zzxx}^{(3)} = \chi_{zxxz}^{(3)} = \chi_{zxxz}^{(3)} = \frac{1}{3}\chi_{cr}^{(3)} \end{array} \right. \quad (1.6)$$



**b) Faisceau incident gaussien fortement focalisé**

Pour venir sonder la réponse de troisième harmonique de matériaux biologiques en microscopie THG, un **faisceau polarisé linéairement fortement focalisé** par un objectif à grande ouverture numérique est propagé le long de l'axe optique  $z$ . En première approximation, le faisceau d'excitation peut être décrit comme un faisceau gaussien focalisé. L'expression générale d'un faisceau gaussien dans l'approximation scalaire est donnée dans sa forme compacte par :

$$\vec{E}(r, z) = A(r, z) e^{i(kz - \omega t)} + c.c., \quad \text{où} \quad A(r, z) = \frac{\mathcal{A}_0}{1 + i\zeta} e^{-\frac{r^2}{w_0^2(1+i\zeta)}} \quad \text{et} \quad \zeta = \frac{2z}{b} \quad (1.7)$$

Le **rayon du waist** (ou col) d'un faisceau gaussien est donné par  $w_0 \simeq \frac{0.52 \times 2\pi}{k \sin(\theta)}$  [108] où  $NA = \sin(\theta)$  correspond à l'ouverture numérique de l'objectif (cette expression du *waist* est valable en particulier lorsque  $NA \geq 0.7$ ).

Le **paramètre confocal**  $b = \frac{2\pi w_0^2}{\lambda} = kw_0^2$  est égal à deux fois la longueur de Rayleigh  $b = 2z_R$  et donne la profondeur du foyer.

Il nous faut ici attirer l'attention du lecteur sur le glissement axial de la phase (d'une quantité de  $\pi$  radians) d'un champ d'excitation gaussien fortement focalisé à la traversée du foyer par rapport à la phase d'une onde plane. La variation de cette phase - appelée **phase de Gouy** - au niveau du volume focal est représentée sur la figure 1.23.

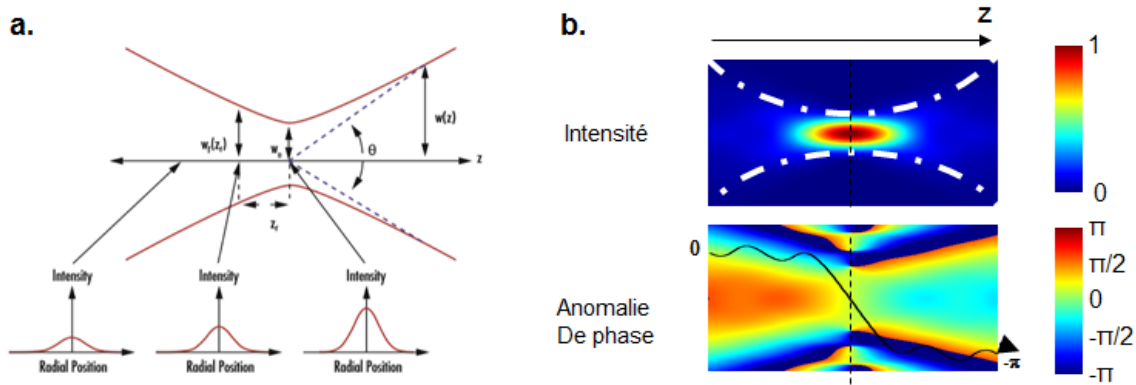


FIGURE 1.23 – Description d'un faisceau gaussien focalisé. a. Caractéristiques d'un faisceau gaussien. Adapté du site *edmundoptics.com*. b. Intensité et anomalie de phase du faisceau d'excitation. Adapté de [109].

La phase de Gouy suit la dépendance suivante  $\phi_G(z) = -\arctan(\frac{z}{z_R})$  en fonction de la distance  $z$  par rapport au plan focal. Le vecteur d'onde  $k_G$  correspond au gradient spatial de cette phase - considérée comme linéaire au niveau du volume focal - se calcule [108] :

$$k_G = -\vec{\text{grad}}_z(\phi) = -\frac{1}{z_R} \quad (1.8)$$

Par ailleurs, la longueur de Rayleigh est reliée à l'ouverture numérique  $NA$  via la relation suivante :

$$z_R = \frac{kw_0^2}{2} = \frac{k}{2} \left( \frac{0.52 \times 2\pi}{k \times NA} \right)^2 = \frac{0.52^2 \pi}{NA^2} \lambda \quad (1.9)$$

On en déduit l'expression analytique du vecteur d'onde  $k_G$  :

$$k_G = -\frac{NA^2}{0.52^2 \pi \lambda} \quad (1.10)$$

Par exemple, pour une ouverture numérique  $NA = 1.05$  et une longueur d'onde d'excitation à  $1100 \text{ nm}$ , on trouve un vecteur d'onde de Gouy qui vaut  $k_G = -1.18 \text{ rad}/\mu\text{m}$ .

### c) Polarisation non-linéaire d'ordre 3

Dans le cas général, la **polarisation non-linéaire d'ordre 3** induite par l'interaction entre le champ fondamental focalisé  $\vec{E}(\omega)$  et un matériau non-linéaire - dont la réponse du troisième ordre est décrite par son tenseur électronique  $\chi^{(3)}$  - est donnée par l'expression suivante :

$$P_i(3\omega) = \epsilon_0 \sum_{j,k,l} \chi_{ijkl}^{(3)} E_j(\omega) E_k(\omega) E_l(\omega) \quad (1.11)$$

Pour un **milieu homogène et isotrope**, la polarisation non-linéaire s'écrit :

$$\vec{P}(3\omega) = 3\epsilon_0 \chi_0 \begin{pmatrix} E_x(E_x^2 + E_y^2 + E_z^2) \\ E_y(E_x^2 + E_y^2 + E_z^2) \\ E_z(E_x^2 + E_y^2 + E_z^2) \end{pmatrix} \quad (1.12)$$

et pour un **milieu uniaxe avec une symétrie  $C_{\infty v}$**  dont l'axe est orienté selon l'axe  $x$  :

$$\vec{P}(3\omega) = \epsilon_0 \begin{pmatrix} E_x \left( \chi_{\parallel}^{(3)} E_x^2 + \chi_{cr}^{(3)} E_y^2 + \chi_{cr}^{(3)} E_z^2 \right) \\ E_y \left( \chi_{cr}^{(3)} E_x^2 + \chi_{\perp}^{(3)} E_y^2 + \chi_{\perp}^{(3)} E_z^2 \right) \\ E_z \left( \chi_{cr}^{(3)} E_x^2 + \chi_{\perp}^{(3)} E_y^2 + \chi_{\perp}^{(3)} E_z^2 \right) \end{pmatrix} \quad (1.13)$$

### d) Amplitude du champ THG

Pour exprimer analytiquement l'amplitude du champ THG à partir de l'expression de la polarisation non-linéaire induite, nous nous appuyons ici sur la description donnée dans l'ouvrage du *Boyd* [73]. L'amplitude du champ THG est une **solution de l'équation d'onde en régime paraxial** :

$$\Delta \vec{E}(3\omega) + \frac{n^2(3\omega)(3\omega)^2}{c^2} \vec{E}(3\omega) = -\frac{(3\omega)^2}{\epsilon_0 c^2} \vec{P}(3\omega) \quad (1.14)$$

Par souci de simplicité, nous considérons ici un matériau isotrope associé à un tenseur  $\chi_0^{(3)}$  d'ordre 3. Nous invitons le lecteur curieux à se rendre à l'annexe B pour la dérivation complète de l'expression du champ non-linéaire dans une structure isotrope et dans une structure anisotrope. L'amplitude  $\mathcal{A}_3$  du signal THG généré par un faisceau gaussien d'amplitude  $\mathcal{A}_1$  s'écrit :

$$\mathcal{A}_3 = \frac{3i\omega}{2n_{3\omega}c} \chi^{(3)} \mathcal{A}_1^3 J_3(\Delta k, z_1, z_2) \quad (1.15)$$

où  $\Delta k = 3k_\omega - k_{3\omega} = \frac{6\pi}{\lambda_1}(n_\omega - n_{3\omega})$  est le désaccord du vecteur d'onde induit par la dispersion

du matériau entre les fréquences fondamentale et harmonique.

$$J_3(\Delta k, z_1, z_2) = \int_{z_1}^{z_2} \frac{e^{i\Delta k z}}{(1 + 2iz/b)^2} dz \quad (1.16)$$

avec  $z_1$  et  $z_2$  les coordonnées des plans d'entrée et de sortie du matériau.

L'intensité THG  $I_3$  déduite à partir de l'amplitude THG  $\mathcal{A}_3$  est donnée par :

$$I_{3\omega} = 2n_{3\omega}\epsilon_0 c |\mathcal{A}_3|^2 \quad (1.17)$$

et la puissance totale transportée par un faisceau gaussien à la fréquence  $3\omega$  se calcule comme suit :

$$\mathcal{P}_{3\omega} = \int I_{3\omega} 2\pi r dr = n_{3\omega}\epsilon_0 c \pi w_0^2 |\mathcal{A}_3|^2 \quad (1.18)$$

### e) Propriétés du signal THG

Nous allons voir dans les paragraphes suivants que la génération d'un signal THG dépend des propriétés de **dispersion** (terme détaillé dans l'encart 1.2), d'**anisotropie** et de la **dimension des structures**. Le premier cas considéré correspond à un milieu fini où  $b \gg |z_1|, |z_2|$ .

#### **Encart 1.2 - Dispersion :**

La variation de l'indice de réfraction du milieu avec la longueur d'onde est appelée **dispersion**. Dans la plupart des milieux biologiques, l'indice décroît avec la longueur d'onde ( $\frac{dn}{d\lambda} < 0$ ) : on parle de dispersion « normale ». C'est le cas en particulier des milieux biologiques étudiés. Dans le cas inverse où l'indice de réfraction croît avec la longueur d'onde, on parle de dispersion « anormale ».

L'expression de  $J_3(\Delta k, z_1, z_2)$  se simplifie suivant l'expression suivante :

$$J_3(\Delta k, z_1, z_2) = \int_{z_1}^{z_2} e^{i\Delta k z} dz = \frac{e^{i\Delta k z_2} - e^{i\Delta k z_1}}{i\Delta k} \quad (1.19)$$

dont le carré de la valeur absolue s'écrit :

$$|J_3(\Delta k, z_1, z_2)|^2 = L^2 \text{sinc}^2\left(\frac{\Delta k L}{2}\right) \quad (1.20)$$

où  $L = |z_2 - z_1|$  est la longueur de la région d'intégration.

#### **Encart 1.3 - Propriété 1 : Génération d'un contraste THG sur les hétérogénéités**

En présence d'**hétérogénéités de petites dimensions** par rapport au paramètre confocal, l'intensité THG apparaît et s'exprime :

$$I_{3\omega}(z) = \frac{9\epsilon_0\omega^2 L^2}{2n_{3\omega}c} |\chi^{(3)}|^2 \mathcal{A}_1^6 \text{sinc}^2\left(\frac{\Delta k L}{2}\right) \quad (1.21)$$

Bien que le calcul analytique de l'intégrale  $J$  soit compliqué dans le cas général, sa résolution numérique (avec le modèle semi-analytique décrit dans la sous-partie suivante sur un matériau non-dispersif) montre que les **structures de dimensions comprises entre quelques dizaines de nanomètres et deux fois la longueur de cohérence** sont également des sources de signal THG. De plus, le maximum d'intensité THG est atteint pour des objets dont la dimension est égale à la longueur de cohérence. De manière plus générale, un signal THG apparaît dès que les propriétés optiques du milieu présentent des variations de l'indice de réfraction linéaire  $n$  ou de la susceptibilité non-linéaire  $\chi^{(3)}$  à l'échelle du volume focal qui viennent briser l'homogénéité dans le volume d'excitation. Les **interfaces** sont des géométries répandues dans les échantillons biologiques qui fournissent également un signal THG. Celui-ci est proportionnel au carré de la différence de susceptibilités THG entre les deux milieux :  $I_{3\omega} \propto |\Delta\chi^{(3)}|^2$ . Par exemple, lorsque l'interface est balayée en  $z$ , le signal THG présente un pic lorsque le *waist* du faisceau est au niveau de l'interface, dont la largeur à mi-hauteur correspond au paramètre  $b$ .

Le second cas considéré correspond à un milieu infini et isotrope, on a donc  $z_1 = -\infty$  et  $z_2 = +\infty$ . L'intégrale  $J_3$  se calcule en utilisant le théorème des résidus et sa dépendance avec la valeur du désaccord du vecteur d'onde  $\Delta k$  est représentée sur la figure 1.24.

$$J_3(\Delta k, z_1, z_2) = \begin{cases} 0 & \text{si } \Delta k \leq 0 \\ \frac{\pi b^2 \Delta k}{2} e^{-b\Delta k/2} & \text{si } \Delta k > 0 \end{cases} \quad (1.22)$$

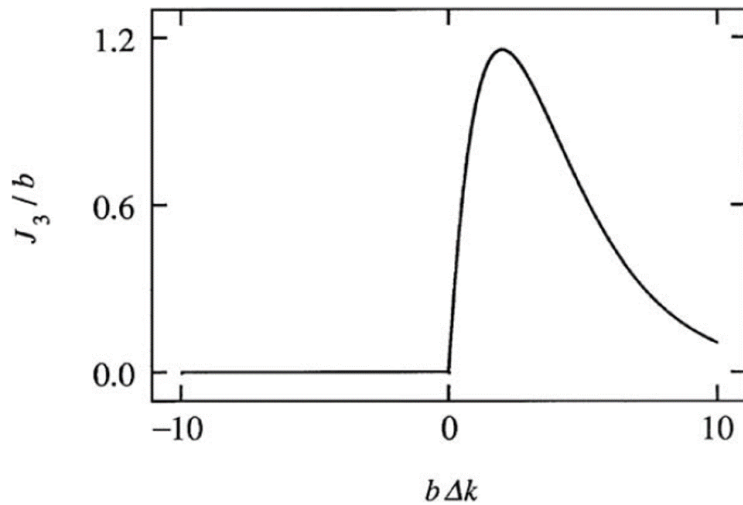


FIGURE 1.24 – Dépendance du facteur  $J_3$  d'accord de phase de la THG en fonction du paramètre confocal  $b$  et du désaccord de vecteur d'onde  $\Delta k$ . Adapté de [73].

On observe que la valeur du  $J_3(\Delta k, z_1, z_2)$  dépend du signe du désaccord du vecteur d'onde  $\Delta k$  qui est proportionnel au désaccord d'indice  $\Delta n = n_\omega - n_{3\omega}$ , donc du signe de la dispersion. On en déduit les deux propriétés suivantes :

**Encart 1.4 - Propriété 2 : Absence de signal THG dans les milieux homogènes isotropes avec une dispersion normale**

A la différence des petits volumes, dans le cas d'un **milieu infini et isotrope** avec une dispersion normale ou nulle ( $\Delta k = k_\omega - k_{3\omega} = \frac{2\pi}{\lambda}(n_\omega - n_{3\omega}) \leq 0$ ), **aucun signal THG n'est généré**. D'un point de vue physique, ce phénomène résulte du fait que l'onde incidente et l'onde harmonique ne peuvent pas se coupler à cause de la phase de Gouy si le désaccord de vecteur d'onde  $\Delta k$  est négatif ou nul.

**Encart 1.5 - Propriété 3 : Génération d'un signal THG dans les milieux homogènes isotropes avec une dispersion anormale**

Dans les **matériaux à dispersion anormale** ( $\Delta k = k_\omega - k_{3\omega} = \frac{2\pi}{\lambda}(n_\omega - n_{3\omega}) > 0$ ), un **signal THG apparaît** et son intensité THG est évaluée par :

$$I_{3\omega} = \frac{9\epsilon_0\omega^2\pi^2b^4\Delta k^2}{8n_{3\omega}c} |\chi^{(3)}|^2 \mathcal{A}_1^6 e^{-b\Delta k} \quad (1.23)$$

Dans les **matériaux biréfringents** (le terme de biréfringence est détaillé dans l'encart 1.6), on peut jouer sur l'orientation de la polarisation d'excitation pour obtenir un désaccord de phase positif entre les faisceaux fondamentaux et harmonique.

**Encart 1.6 - Biréfringence**

Un matériau est dit **biréfringent** s'il est optiquement anisotrope. L'indice de réfraction de la lumière dépend alors de l'orientation de la polarisation de la lumière. Les deux cas simples de biréfringence correspondent aux matériaux uniaxes ou biaxes. Dans le cas d'un milieu uniaxe, deux directions de polarisation orthogonales présentent deux indices de réfraction différents, l'un **extraordinaire**  $n_e$  - le long de l'axe de symétrie du milieu - et l'autre **ordinaire**  $n_o$  dans la direction orthogonale à cet axe. On définit la biréfringence comme la différence entre ces deux indices de réfraction :  $\Delta n = n_e - n_o$ . Si cette valeur est positive, on dit que le matériau est **uniaxe positif** ( $n_e = n_{lente}$  et  $n_o = n_{rapide}$ ) et dans le cas contraire on dit qu'il est **uniaxe négatif** ( $n_e = n_{rapide}$  et  $n_o = n_{lente}$ ). Dans le cas plus général d'un matériau biaxe, le matériau possède deux axes optiques, et trois indices de réfraction différents dans trois directions de l'espace.

**Encart 1.7 - Propriété 4 : Génération d'un signal THG par accord de phase dans les matériaux biréfringents**

La biréfringence de certains matériaux peut être utilisée pour obtenir un désaccord d'indice positif - malgré la dispersion négative du matériau - qui compense le signe positif du vecteur d'onde associé à la phase de Gouy. *In fine*, ces matériaux biréfringents peuvent être la source d'un signal THG appelé « **signal THG par accord de phase** ». On peut noter qu'il est d'autant plus facile de réaliser l'accord de phase dans des matériaux très biréfringents (valeur élevée de  $|\Delta n| = |n_e - n_o|$ ) et faiblement dispersifs (faible amplitude de la dérivée  $\left|\frac{dn}{d\lambda}\right|$ ).

Par exemple, la **calcite** ou les **cristaux liquides** possèdent de fortes propriétés de biréfringence. Sur la figure 1.25 sont représentées les courbes de dispersion de ces deux matériaux. La calcite est un cristal **biréfringent uniaxe négatif** ( $n_e < n_o$ ) tandis que le cristal liquide **5CB** est un cristal uniaxe positif ( $n_e > n_o$ ). Nous allons maintenant détailler de manière plus précise les conditions qui réalisent de manière effective un désaccord de phase positif entre les faisceaux fondamentaux et harmonique dans la calcite.

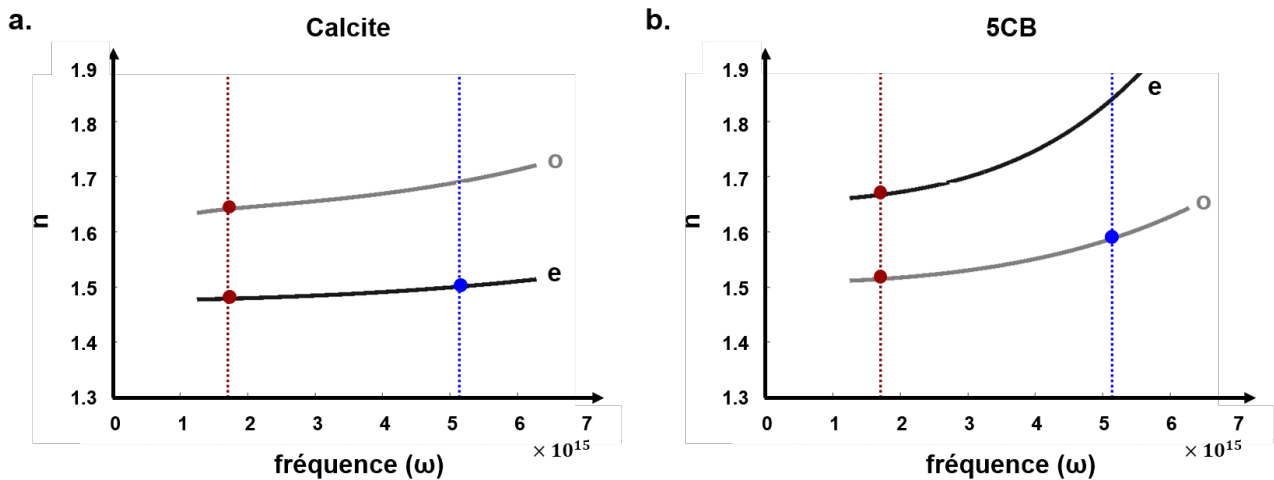


FIGURE 1.25 – Dispersion de (a) la calcite (biréfringence négative) et (b) un cristal liquide de type 5CB (biréfringence positive). La ligne pointillée verticale de couleur rouge indique la fréquence de l'excitation à  $\omega$  et celle de couleur bleue correspond à la fréquence de la THG à  $3\omega$ .

Le désaccord des vecteurs d'ondes du processus THG est donné par  $\Delta k = \frac{2\pi}{\lambda} (n_{\omega,1} + n_{\omega,2} + n_{\omega,3} - 3n_{3\omega})$ , où les indices de réfraction  $n_{\omega,i}$  de chaque champ fondamental et  $n_{3\omega}$  du champ harmonique sont soit ordinaires soit extraordinaires à la fréquence considérée. Dans le tableau 1.4.3, nous avons récapitulé l'ensemble des valeurs que peut prendre ce désaccord à la longueur d'onde d'excitation  $\lambda = 1100 \text{ nm}$ . On remarque que seuls les accords par biréfringence de types I, II et III associés à un indice harmonique extraordinaire permettent d'obtenir un  $\Delta k$  de signe positif.

Pour généraliser l'exemple précédent aux cristaux uniaxes biréfringents, les désaccords d'indice avec un signe positif sont associés à l'indice le plus rapide (f : *fast*) à  $3\omega$ . Ces trois cas d'accords de phase positifs sont récapitulés ci-dessous et dans le tableau 1.7 :

<b>Accord de phase</b>	$n_{3w}$ ordinaire	$n_{3w}$ extraordinaire
Type I	$eee \rightarrow o : \Delta k = -3.6219$	$ooo \rightarrow e : \Delta k = 2.4084$
Type II	$eeo \rightarrow o : \Delta k = -2.6948$	$ooe \rightarrow e : \Delta k = 1.4813$
Type III	$eoo \rightarrow o : \Delta k = -1.7677$	$oee \rightarrow e : \Delta k = 0.5541$
Type 0	$ooo \rightarrow o : \Delta k = -0.8405$	$eee \rightarrow e : \Delta k = -0.3730$



- **Type I** noté  $sss \rightarrow f$  :

Les trois champs fondamentaux sont polarisés suivant l'axe lent ( $s$  : *slow*) du matériau et  $n_s(\omega) > n_f(3\omega)$ .

- **Type II** noté  $ssf \rightarrow f$  :

Un des trois champs fondamentaux est polarisé suivant l'axe rapide et  $\frac{(2n_s(\omega)+n_f(\omega))}{3} > n_f(3\omega)$ .

- **Type III** noté  $sff \rightarrow f$  :

Deux des trois champs fondamentaux sont polarisés suivant l'axe rapide et  $\frac{(n_s(\omega)+2n_f(\omega))}{3} > n_f(3\omega)$ .

Accord de phase	Cristal uniaxe positif $\Delta n = n_e - n_o > 0$ $f = o, s = e$	Cristal uniaxe négatif $\Delta n = n_e - n_o < 0$ $f = e, s = o$
Type I : $sss \rightarrow f$	$eee \rightarrow o$	$ooo \rightarrow e$
Type II : $ssf \rightarrow f$	$eeo \rightarrow o$	$ooe \rightarrow e$
Type III : $sff \rightarrow f$	$ooo \rightarrow o$	$oee \rightarrow e$

Le signal mesuré est proportionnel au cube de l'intensité du faisceau fondamental.

#### f) Longueur de cohérence

La **longueur de cohérence**  $l_c$  donne la longueur sur laquelle le signal THG est constructif, et elle est inversement proportionnelle à la valeur absolue du désaccord de phase. Pour une émission THG vers l'avant, la longueur de cohérence s'écrit :

$$l_c = \frac{\pi}{|3(k_\omega + k_G) - k_{3\omega}|} \quad (1.24)$$

En faisant l'hypothèse que le désaccord de vecteur d'onde est dominé par le déphasage de Gouy (cas de faible dispersion), on trouve que la longueur de cohérence  $l_c$  est inversement proportionnelle au carré de l'ouverture numérique  $NA$ . Une conséquence est que la visibilité des structures dépend de l'ouverture numérique : les structures de petites dimensions sont d'autant plus contrastées que l'ouverture numérique est grande [91].

### 1.4.2 Modélisation numérique du signal THG

Dans cette sous-partie, nous décrivons succinctement la méthode numérique standard proposée par Cheng et al. [110] et complétée par Olivier [111] pour calculer la THG diffusée par un faisceau focalisé de profil arbitraire sur une structure de forme et de taille arbitraires. Nous rappelons ensuite deux résultats obtenus précédemment avec cette méthode de calcul : l'allure des composantes spatiales d'un champ d'excitation gaussien et l'influence de la dispersion sur l'intensité du signal THG généré.

#### a) Description du modèle numérique standard

Cette méthode semi-analytique de calcul repose sur 3 étapes de calcul illustrées sur la figure 1.26 et décrites plus en détail dans l'annexe C :

(i) La **description du champ focalisé** à la longueur d'onde fondamentale est donnée par l'intégrale de diffraction de Debye-Wolf ([112], [113]).

(ii) La **distribution spatiale de la polarisation non linéaire induite** est calculée comme :

$$P_i^{(THG)}(3\omega) = \epsilon_0 \sum_{j,k,l} \chi_{ijkl}^{(3)} E_j(\omega) E_k(\omega) E_l(\omega) \quad (1.25)$$

(iii) La **propagation de la polarisation non-linéaire en champ lointain** est fournie par les fonctions de Green en champ lointain [113]. (cf. annexe C)

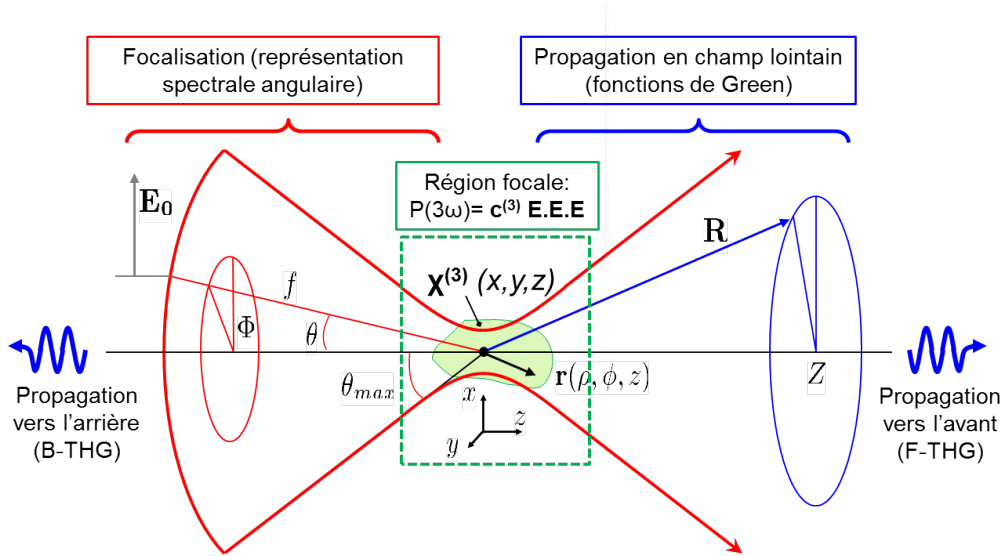


FIGURE 1.26 – Description de la méthode semi-analytique de modélisation du signal THG [109].

### b) Allure d'un champ d'excitation gaussien

L'intégrale de Debye-Wolf permet de calculer l'allure des composantes du champ d'excitation gaussien dans le plan du *waist*, comme représenté sur la figure 1.28 [111]. Pour une forte ouverture numérique ( $NA = 1.4$ ), on observe que les composantes  $E_y$  et  $E_z$  sont non nulles avec un maxima loin de l'axe optique dont l'amplitude est respectivement égale à 1/10 et 1/3 de celle du champ  $E_x$  dans le cas d'une très forte focalisation ( $NA = 1.4$ ).

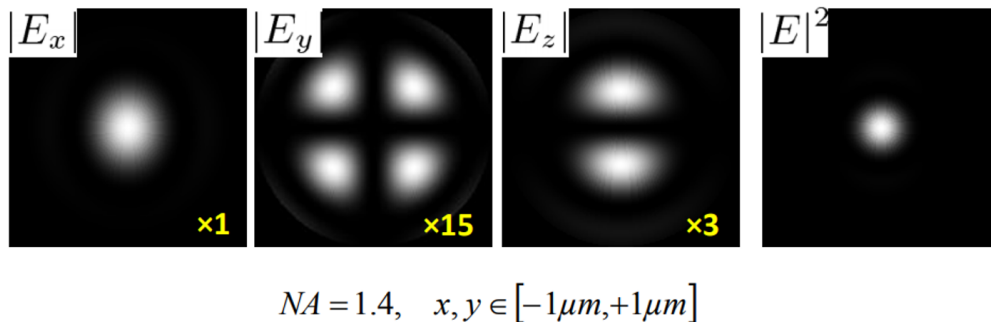


FIGURE 1.27 – Modélisation de la distribution spatiale d'un champ d'excitation gaussien à forte ouverture numérique dans le plan du *waist* [111].

### c) Influence de la dispersion sur le signal THG émis

Cette méthode numérique a également permis d'évaluer l'influence de la dispersion sur le signal THG issu d'une lamelle d'épaisseur axiale variable centrée au niveau du volume focal [109]. Conformément à la description analytique précédente, on peut observer qu'un signal THG persiste dans le volume d'une lamelle épaisse lorsque la dispersion du matériau devient positive (cas  $n_\omega > n_{3\omega}$ ).

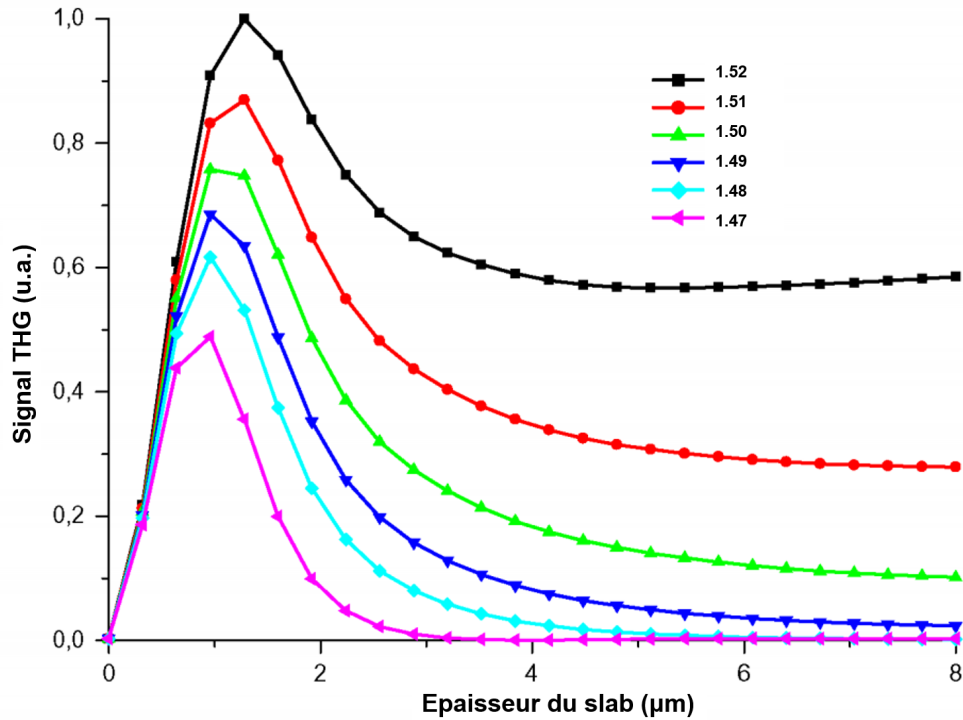


FIGURE 1.28 – Influence de la dispersion sur le signal THG issu d'une lamelle d'épaisseur axiale variable centrée au niveau du volume focal.  $n_\omega \in [-1.47 - 1.52]$  et  $n_{3\omega} = 1.50$ . Adapté de [109].

### d) Discussion

Ce modèle semi-numérique présente l'avantage de prendre en compte les composantes vectorielles de la polarisation d'excitation et de pouvoir considérer un échantillon de géométrie arbitraire. Cependant, il néglige la présence de variations spatiales de l'indice linéaire  $n$  au sein du volume focal, et par conséquent il ne reproduit pas les effets d'aberration et de distorsion du champ focalisé causés par des discontinuités d'indices linéaires, comme sur une interface entre deux milieux d'indices différents (not. interface eau/lipides).

### 1.4.3 Conséquences du mécanisme de contraste sur les images THG d'échantillons biologiques

Les premières démonstrations de génération de troisième harmonique ont été réalisées dans les années 60 sur la calcite ([114], [115]), des gaz ([116], [117]) et des liquides ([118], [107]). Les premières images THG ont été obtenues sur un dispositif de microscopie par Barad et al en 1997 ([82], [92]), puis par Squier et al. en 1998 ([84], [119]).

Cette sous-partie vise à fournir les principaux exemples d'applications de l'imagerie THG dans le domaine biologique. Comme nous l'avons vu dans la description précédente du mécanisme de contraste THG, la phase de Gouy empêche la réalisation de l'accord de phase entre les champs fondamentaux et le champ harmonique au niveau du volume focal dans les milieux isotropes à dispersion normale, ce qui implique qu'aucun signal n'est généré sur de tels domaines. Cependant, la présence de variations des propriétés optiques du matériau à l'échelle du volume focal - soit sur des hétérogénéités soit sur des interfaces - est à l'origine d'un **signal d'hétérogénéités**. Par ailleurs, les milieux isotropes à dispersion anormale (cas rare dans les milieux biologiques) et les milieux anisotropes donnent naissance à un **signal THG par accord de phase**.

Nous présentons ici les conséquences de ce mécanisme de contraste sur l'imagerie THG d'objets biologiques, en traitant successivement (a) le cas du signal d'hétérogénéités émergeant de structures isotropes et (b) le cas du signal par accord de phase sur des échantillons anisotropes.

### a) Contraste THG d'hétérogénéités sur les structures isotropes

Dans les **milieux biologiques constitués de structures isotropes et à dispersion normale**, le signal THG apparaît uniquement sur les **hétérogénéités et les interfaces**. Par comparaison aux autres mécanismes de contrastes cohérents, le mécanisme de contraste de la THG présente l'avantage unique de faire ressortir les hétérogénéités optiques de dimensions submicrométriques sur un fond sombre. Il est donc utilisé pour fournir un contexte morphologique informatif des structures présentes dans l'échantillon. En outre, dans le cas où les indices linéaires des structures et du milieu environnant sont relativement semblables, la dépendance du processus THG avec la susceptibilité électronique  $\chi^{(3)}$  du troisième ordre permet également d'observer un contraste THG.

En imagerie biologique, ce premier type de contraste THG émergeant des hétérogénéités a été utilisé pour cartographier les interfaces des cellules et des tissus biologiques sans marquage, et son champ d'application s'étend de la biologie du développement aux neurosciences. Parmi les démonstrations marquantes, on peut mentionner l'étude pionnière de Débarre et al. qui montre la présence d'un fort contraste THG sur les **interfaces eau-lipides** [88], utilisée ultérieurement pour détecter les structures lipidiques telles que la **myéline** [94], [97]. D'autres structures fournissent également un fort contraste THG comme les interfaces entre les **lamelles de collagène** dans la cornée humaine [91], [120]. Le contraste THG émergeant d'interfaces a été utilisé pour l'imagerie des **premiers cycles de divisions cellulaires** sur des embryons de poisson-zèbres [121] (cf. figure 1.29), ainsi que les interfaces entre des cellules et leur environnement, ou des compartiments intracellulaires comme des vésicules lipidiques [122]. Par ailleurs, le contraste THG peut être amplifié à proximité d'une résonance électronique de structures absorbantes telles que les pigments, l'hémoglobine [123]) ou les marquages histologiques de type hématoxyline et éosine (H&E) [124].

### b) Contraste THG par accord de phase dans les milieux anisotropes

A la différence des milieux isotropes, un signal THG par accord de phase - c'est-à-dire où le désaccord positif des indices optiques des faisceaux d'excitation et harmonique compense la phase de Gouy - peut être généré dans le volume de matériaux suffisamment biréfringents, même en l'absence d'interfaces ou d'hétérogénéités. Ce second type de contraste THG a notamment trouvé des applications dans l'imagerie de **matériaux uniaxes biréfringents** comme des cristaux liquides et des biominéraux.

Le premier exemple de ce contraste fourni par la littérature concerne l'imagerie des **cristaux**

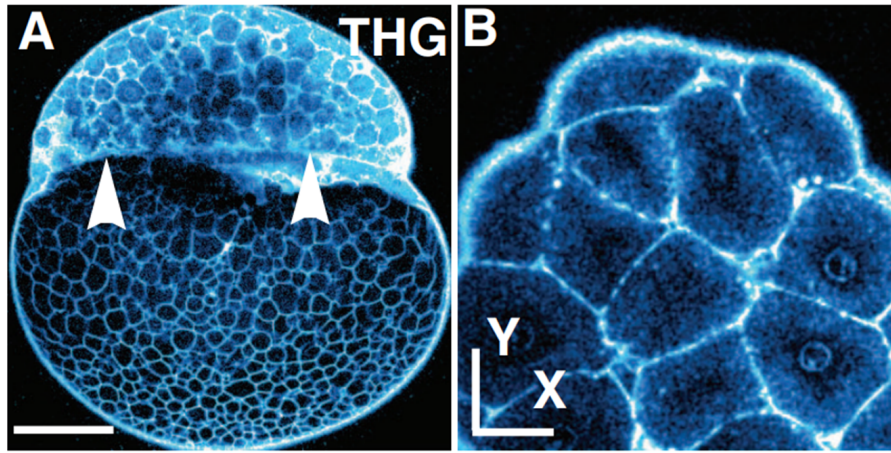


FIGURE 1.29 – Imagerie en contraste THG d’un embryon de poisson-zèbre pendant les premières divisions cellulaires avec une ouverture numérique d’excitation à 0.8. a. Image THG en coupe sagittale où le pôle animal est orienté vers le haut (stade avec 512 cellules). Barre d’échelle  $200 \mu m$ . b. Agrandissement des cellules du blastoderme (stade avec 64 cellules). Barre d’échelle :  $50 \mu m$ . Adapté de [121].

**liquides nématiques de type 5CB LC** biréfringents uniaxes positifs ([125], [126], [127]). Le signal THG généré résulte d’un mécanisme d’accord de phase de type II ( $eeo \rightarrow o$ ) où le désaccord d’indice s’écrit :  $\Delta k = \frac{2\pi}{\lambda}(2n_e^\omega + n_o^\omega - 3n_o^{3\omega}) = 0.4352 \text{ rad}/\mu m$  (calculé à partir des indices donnés dans le tableau 1.4.3 pour une longueur d’onde d’excitation à  $1064 \text{ nm}$ ). On peut noter qu’il est possible d’optimiser l’accord de phase soit en modifiant l’orientation entre la polarisation d’excitation et les axes du cristal soit en augmentant la dispersion en augmentant la température du matériau [126], ce qui est évidemment impossible dans les échantillons biologiques vivants !

Le second exemple de génération de THG par accord de phase est donné dans la littérature avec l’imagerie de cristaux de **calcite** (carbonate de calcium  $CaCo_3$ ) qui présentent de fortes propriétés de biréfringence comme nous l’avons vu précédemment. Oron et al. [128] ont montré la capacité de générer un signal THG par accord de phase dans les **spicules de larve d’oursin** sur laquelle nous reviendrons dans le chapitre 2. Par ailleurs, les **otolithes des poissons-zèbres** et certains biominéraux tels que les **calculs rénaux** sont partiellement constitués de calcite. La figure 1.30 présente des images en contraste THG réalisées sur un otolithe de poisson-zèbre âgé de 3 jours après fertilisation et sur un cristal de whewellite artificiel. L’accord de phase réalisé est de type II ( $ooe \rightarrow e$ ) et le désaccord d’indice  $\Delta k = \frac{2\pi}{\lambda}(2n_o^\omega + n_e^\omega - 3n_e^{3\omega}) = 1.4813 \text{ rad}/\mu m$  (calculé à partir des indices donnés dans le tableau 1.4.3 avec une longueur d’onde d’excitation à  $1100 \text{ nm}$ ) est largement positif.

#### 1.4.4 Conclusion

Dans cette dernière partie, nous avons récapitulé les principales caractéristiques du mécanisme de contraste en microscopie THG. En bref, dans les milieux biologiques (à dispersion normale), on observe :

- l’absence de signal THG dans les structures isotropes homogènes où la dispersion ( $n_\omega - n_{3\omega} < 0$ ) ne permet pas de compenser la phase de Gouy ( $k_G < 0$ ).
- la présence de signal THG sur les hétérogénéités et les interfaces où la géométrie du matériau brise la symétrie du volume focal permettant que les interférences destructives soient

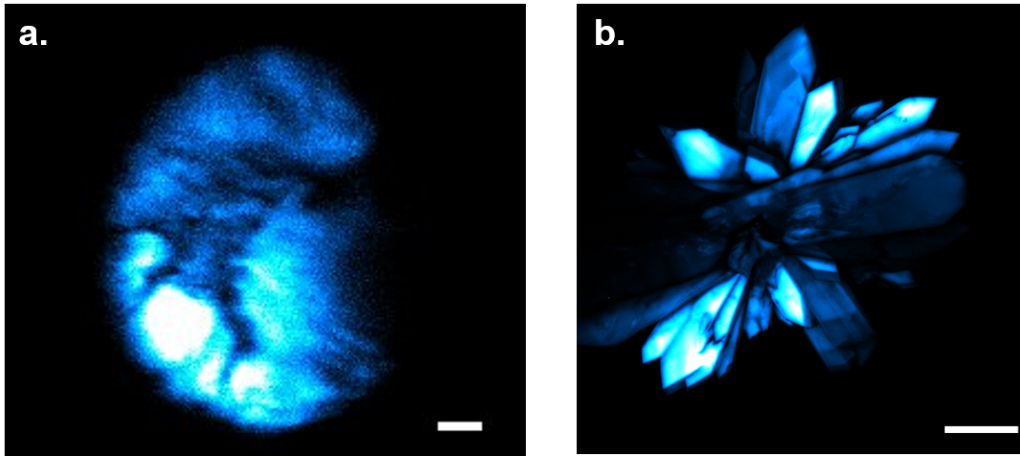


FIGURE 1.30 – Imagerie en contraste THG d'échantillons biologiques anisotropes. a. Image THG d'un otolithe de poisson-zèbre âgé de 3 jours après fertilisation. Barre d'échelle  $5 \mu m$ . b. Image THG d'un cristal artificiel de whewellite. Barre d'échelle  $100 \mu m$ .

Matériau	$ssf \rightarrow f$	$n_s^\omega$	$n_s^\omega$	$n_f^{3\omega}$
LC 5CB	<b>Uniaxe positif</b> $eeo \rightarrow o$	$n_e^\omega = 1.6744$ ( $\lambda = 1064 \text{ nm}$ )	$n_o^\omega = 1.5126$ ( $\lambda = 1064 \text{ nm}$ )	$n_o^{3\omega} = 1.5959$ ( $\lambda = 355 \text{ nm}$ )
calcite	<b>Uniaxe négatif</b> $ooe \rightarrow e$	$n_o^\omega = 1.6418$ ( $\lambda = 1100 \text{ nm}$ )	$n_e^\omega = 1.4794$ ( $\lambda = 1100 \text{ nm}$ )	$n_e^{3\omega} = 1.5012$ ( $\lambda = 367 \text{ nm}$ )

incomplètes

- la **présence éventuelle de signal THG dans le volume de matériaux homogènes biréfringents** où la biréfringence permet dans certaines conditions de compenser la phase de Gouy ( $k_G < 0$ ).



# Chapitre 2

## Microscopie THG résolue en polarisation

### Sommaire

2.1	Contraste THG polarimétrique	51
2.2	Dispositif PTHG expérimental	61
2.3	Influence du désaccord d'indice linéaire sur la réponse PTHG issue d'une interface verticale	64
2.4	Caractérisation de l'ordre lipidique dans des structures organisées	76
2.5	Effets d'interfaces	78
2.6	Résumé du chapitre 2	79

Un domaine actif de recherche en microscopie multiphotons cohérente s'intéresse à la caractérisation de l'**ordre moléculaire** de certaines structures biologiques organisées à partir de la dépendance de leur réponse non-linéaire à une **modulation de la polarisation d'excitation** (cf. encart sur la polarisation 2.1).

Il a été observé par exemple que la réponse de seconde harmonique générée par certaines structures biologiques non centrosymétriques organisées présente une forte sensibilité à l'orientation de la polarisation d'excitation (fibres de collagène [74], muscles [129], microtubules, etc.). L'étude complète de la variation d'intensité SHG induite par une rotation de la polarisation d'excitation - appelée intensité SHG résolue en polarisation (réponse PSHG) - permet de remonter à l'orientation des axes cristallins et à une estimation de l'anisotropie des matériaux à une échelle submicrométrique à partir de la détermination de certains coefficients de la réponse électronique du second ordre  $\chi^{(2)}$ . De la même façon, la microscopie CARS a fait l'objet de développements polarimétriques qui ont permis de caractériser l'ordre moléculaire de structures lipidiques organisées centrosymétriques comme les vésicules lipidiques multilamellaires [130] et la gaine de myéline ([100], [106], [131]) en s'appuyant sur la réponse vibrationnelle  $\chi^{(3),vib}$  des matériaux.

### Encart 2.1 - Polarisation

La polarisation caractérise la direction d'oscillation du champ électrique d'une onde perpendiculairement à sa direction de propagation. Lorsque la direction du champ électrique fluctue aléatoirement dans le temps, on dit que la lumière n'est pas polarisée (lumière du soleil, LED, lampe halogène). En revanche, lorsque l'orientation du champ électrique suit une dépendance spécifique, la lumière est dite polarisée (laser). Plus spécifiquement, une **polarisation linéaire** désigne une oscillation du champ électrique selon une direction unique dans un plan contenant la direction de propagation. Une **polarisation circulaire** décrit une oscillation du champ électrique selon une direction qui tourne avec une vitesse constante autour de la direction de propagation.

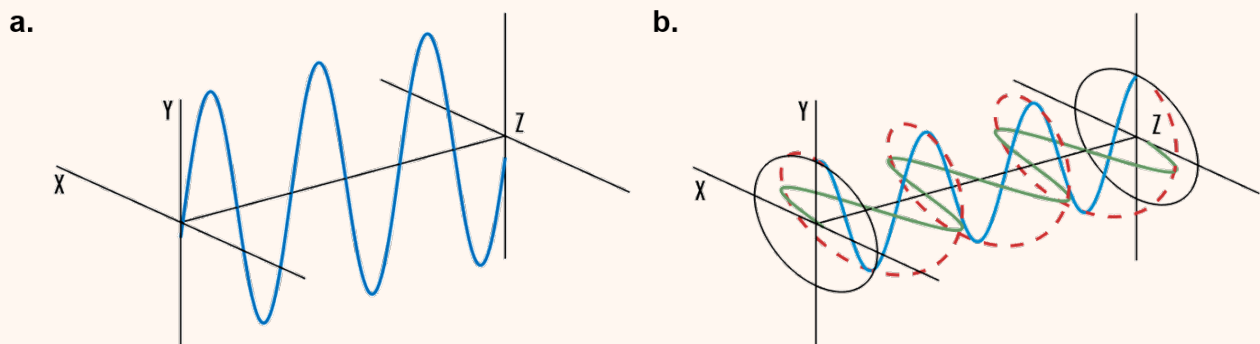


FIGURE 2.1 – Ondes transverses polarisées. a. Polarisation linéaire : oscillation du champ électrique selon une direction unique dans un plan contenant la direction de propagation. b. Polarisation circulaire : oscillation du champ électrique selon une direction qui tourne avec une vitesse constante autour de la direction de propagation. Adapté de [www.edmundoptics.com](http://www.edmundoptics.com).

Suite aux premiers développements de microscopie SHG résolue en polarisation, la microscopie THG a elle-aussi été rapidement combinée à des dispositifs polarimétriques pour remonter aux propriétés d'anisotropie de milieux biologiques organisés centrosymétriques. Quelques études publiées autour des années 2000 (récapitulées sur la figure 2.2) ont mis en évidence la capacité de la réponse THG résolue en polarisation (PTHG) à sonder localement l'anisotropie dans le **volume de matériaux homogènes biréfringents** tels que des cristaux liquides ([92], [126], [127]), des fines surfaces cristallines [132], des cristaux de calcite [128] et la cornée [91]. Plus tard, une étude effectuée au LOB s'est intéressée à la mesure de l'ordre et d'orientation des lipides dans des assemblages lipidiques organisés à partir de la réponse THG polarimétrique sur des **interfaces parallèles à l'axe optique** [133].

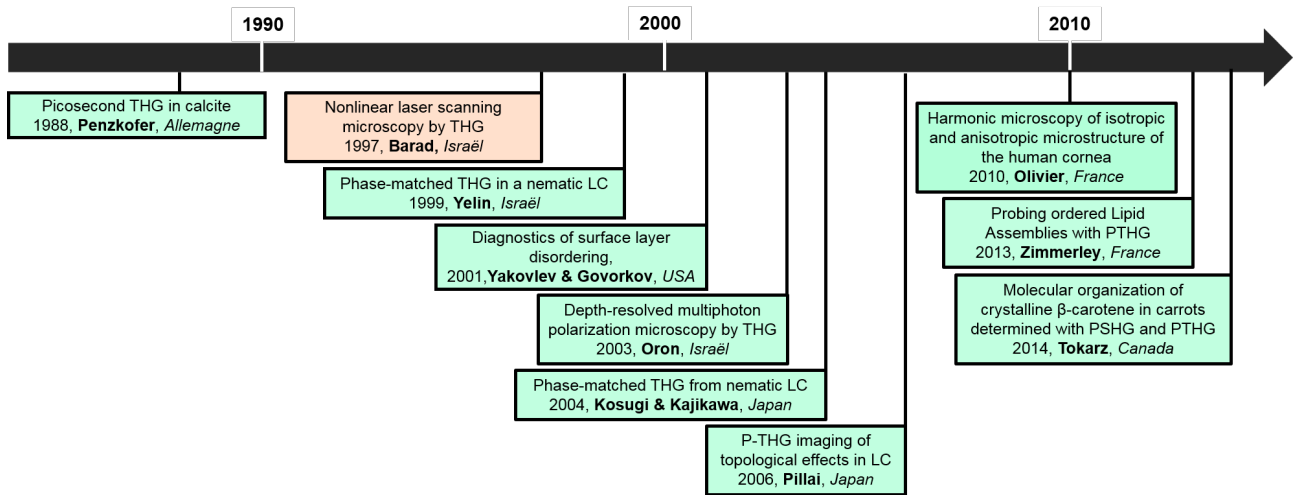


FIGURE 2.2 – Historique des principaux développements en microscopie THG résolue en polarisation.

Le but ultime de notre étude est ici d'explorer la capacité de la microscopie THG polarimétrique à sonder la microstructure de la **gaine de myéline** (les résultats seront présentés dans le chapitre 4) et de **biominéraux** comme les calculs rénaux et les otolithes (étude en cours, quelques résultats seront évoqués dans les perspectives générales) qui n'ont pas encore fait l'objet d'investigations systématiques en microscopie PTHG. Ces deux types de structures combinent à la fois une **anisotropie de leur indice linéaire de réfraction  $n$**  et une **anisotropie de leur réponse optique non-linéaire caractérisée par le tenseur  $\chi^{(3)}$** . En d'autres termes, les valeurs prises par les grandeurs  $n$  et les composantes du  $\chi^{(3)}$  de ces matériaux dépendent de la polarisation du champ d'excitation.

Dans cette perspective, nous avons cherché à mieux comprendre le contraste THG polarimétrique qui émerge des structures anisotropes en considérant à la fois l'influence de l'**indice optique linéaire  $n$**  et de la **réponse non-linéaire du troisième ordre  $\chi^{(3)}$** , contrairement aux études actuelles qui se limitent à traiter la réponse non-linéaire tensorielle du matériau. L'anisotropie des indices linéaire et non-linéaire peuvent être sondées par le contraste THG polarimétrique à la fois dans le volume et sur les interfaces verticales et horizontales des matériaux. Comme nous avons pu le voir à travers l'expression analytique du champ non-linéaire généré dans le volume des matériaux anisotropes (cf. chapitre I.IV), il existe un **fort couplage entre les effets introduits par l'indice linéaire et par la réponse non-linéaire**. Ce couplage est également présent sur les interfaces verticales parallèles à l'axe optique entre un matériau anisotrope et un milieu isotrope d'indices distincts, et en outre, on peut intuitivement voir que des **effets d'aberrations du faisceau d'excitation introduits par la différence entre les indices**

**optiques linéaires des deux milieux** participent également aux variations d'intensité de la réponse non-linéaire observés avec la rotation de la polarisation d'excitation.

Dans la continuité du travail récent de Zimmerley et al [133], nous nous sommes ici intéressés à mieux comprendre la réponse spécifique provenant des interfaces verticales entre un milieu anisotrope et un milieu isotrope. Pour découpler l'influence des différents effets sur des interfaces verticales, nous avons étudié dans un premier temps la réponse THG polarimétrique entre des **milieux isotropes** d'indices différents (interface entre un bloc de quartz et un liquide et interface entre une gouttelette d'huile et un liquide), avant de considérer des interfaces verticales entre des **milieux anisotropes** (interface entre une vésicule lipidique multilamellaire et un liquide). Les trois structures modèles utilisées sont présentées sur la figure 2.3.



FIGURE 2.3 – Echantillons modèles étudiés dans ce chapitre pour caractériser le signal PTHG sur des interfaces verticales : un bloc de quartz, une gouttelette d'huile et une vésicule lipidique multilamellaire (MLV).

Dans ce chapitre, nous présentons des résultats expérimentaux confrontés à des résultats numériques obtenus avec une nouvelle approche de simulations par différences finies mise en place par Nicolas Olivier (chercheur CNRS au LOB).

- Une première partie de ce chapitre propose un formalisme analytique général pour décrire la **réponse THG résolue en polarisation dans le volume et sur les interfaces de matériaux biologiques anisotropes**, illustré par des applications expérimentales de la littérature. Nous abordons successivement la réponse THG à une commutation entre des états de polarisation d'excitation linéaires et circulaires, puis à une commutation entre des états de polarisation linéaires.

- Une seconde partie présente le **dispositif expérimental classique** utilisé pour les acquisitions de microscopie THG polarimétrique montrées dans ce chapitre, avant la mise en place du dispositif de PTHG rapide qui fera l'objet du chapitre 3.

- Une troisième partie expose les résultats d'une étude expérimentale et numérique portant sur l'influence du désaccord d'indice optique entre les deux milieux considérés sur la dépendance du signal THG avec la polarisation d'excitation sur des **interfaces verticales entre des milieux isotropes**. Cette étude a permis de mettre en évidence et d'analyser les fortes distorsions induites par une interface sur la réponse PTHG. Ce type d'artefact avait été largement ignoré dans la littérature sur la microscopie non-linéaire polarisée.

- Une quatrième partie vise à évaluer de manière expérimentale la **contribution de l'ordre moléculaire** sur la réponse THG polarimétrique observée au niveau d'une interface verticale entre deux milieux anisotropes.

- Une cinquième partie décrit des effets de **dédoublage du signal THG au voisinage d'interfaces verticales** observés expérimentalement et reproduits par des simulations numériques, qui n'ont - à notre connaissance - pas encore été décrits dans la littérature.

## 2.1 Contraste THG polarimétrie

La **réponse THG polarimétrie** désigne ici le signal THG associé à une commutation de la polarisation du faisceau d'excitation entre :

- (i) un premier état linéaire et un second état circulaire (**réponse L-C-THG**)
- (ii) plusieurs états linéaires (**réponse PTHG**)

Dans cette partie, nous allons présenter la forme analytique de la réponse THG à une polarisation d'excitation circulaire, puis à une commutation entre des états de polarisation linéaires, et des applications correspondantes sur des échantillons biologiques. De manière anticipée, on peut déjà attirer l'attention du lecteur sur le fait que la présence de signal THG dépend à la fois de l'état de la polarisation d'excitation considéré (linéaire/circulaire), de la nature optique du milieu (isotrope/anisotrope) et du domaine imagé (interface/volume).

### 2.1.1 Introduction à la réponse THG polarimétrie

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'expression de l'intensité THG fait apparaître la polarisation non-linéaire induite qui dépend à la fois de la réponse tensorielle non-linéaire  $\chi^{(3)}$  du matériau et de la distribution spatiale du champ d'excitation  $\vec{E}(\vec{r}, \omega)$ . Ses composantes s'écrivent dans le cas général :

$$P_i^{(THG)}(\vec{r}, 3\omega) = \epsilon_0 \sum_{j,k,l} \chi_{ijkl}^{(3)} E_j(\vec{r}, \omega) E_k(\vec{r}, \omega) E_l(\vec{r}, \omega) \quad (2.1)$$

Dans le cas d'une symétrie  $C_{\infty v}$  (hypothèse fréquemment utilisée pour décrire des structures organisées constituées de molécules alignées, telles que les MLVs, des biocristaux, des cristaux liquides, etc.), les composantes non nulles indépendantes du  $\chi^{(3)}$  se réduisent au nombre de 3 avec la propriété de symétrie de Kleinman (cf. partie I.IV). Si l'axe principal est orienté selon la direction  $x$ , les composantes non nulles indépendantes du  $\chi^{(3)}$ , notées  $\chi_{\parallel}^{(3)} = \chi_{xxxx}^{(3)}$ ,  $\chi_{cr}^{(3)} = 3\chi_{xxyy}^{(3)}$  et  $\chi_{\perp}^{(3)} = 3\chi_{yyzz}^{(3)}$ , contribuent à la polarisation non-linéaire selon :

$$\vec{P}(3\omega) = \epsilon_0 \begin{pmatrix} E_x \left( \chi_{\parallel}^{(3)} E_x^2 + \chi_{cr}^{(3)} E_y^2 + \chi_{cr}^{(3)} E_z^2 \right) \\ E_y \left( \chi_{cr}^{(3)} E_x^2 + \chi_{\perp}^{(3)} E_y^2 + \chi_{\perp}^{(3)} E_z^2 \right) \\ E_z \left( \chi_{cr}^{(3)} E_x^2 + \chi_{\perp}^{(3)} E_y^2 + \chi_{\perp}^{(3)} E_z^2 \right) \end{pmatrix} \quad (2.2)$$

Dans le cas où l'on néglige la composante  $z$  de l'excitation (valable au premier ordre), l'expression précédente se simplifie ainsi :

$$\vec{P}(3\omega) = \epsilon_0 \begin{pmatrix} E_x \left( \chi_{\parallel}^{(3)} E_x^2 + \chi_{cr}^{(3)} E_y^2 \right) \\ E_y \left( \chi_{cr}^{(3)} E_x^2 + \chi_{\perp}^{(3)} E_y^2 \right) \\ 0 \end{pmatrix} \quad (2.3)$$

### 2.1.2 Réponse L-C-THG dans des milieux isotropes et anisotropes

Nous allons ici nous intéresser à la réponse THG générée sur des échantillons biologiques avec une **polarisation d'excitation circulaire**, puis nous présenterons des applications biologiques qui utilisent la commutation entre une polarisation linéaire et une polarisation circulaire pour **détecter l'anisotropie des milieux imagés**.

### a) Forme analytique de l'intensité THG pour une polarisation d'excitation circulaire et les propriétés associées

#### - Forme de la réponse en intensité THG sur un matériau isotrope

Pour une polarisation d'excitation circulaire arrivant sur un milieu isotrope d'indices linéaires  $n_x = n_y = n_\omega$ , le champ électrique se décompose selon l'axe  $x$  et  $y$  selon :

$$\vec{E}_1(\vec{r}, \omega) = \begin{pmatrix} E_x(\vec{r}, \omega) \\ E_y(\vec{r}, \omega) \\ 0 \end{pmatrix} = \frac{A_1(\vec{r})}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} 1 \\ i \\ 0 \end{pmatrix} e^{ik_\omega z} \quad (2.4)$$

La polarisation non-linéaire induite qui en découle s'écrit (la dérivation complète des équations est faite dans l'annexe A) :

$$\vec{P}(\vec{r}, 3\omega) = \epsilon_0 \frac{A_1^3(\vec{r})}{2\sqrt{2}} \begin{pmatrix} \chi_{\parallel}^{(3)} - \chi_{cr}^{(3)} \\ i(\chi_{cr}^{(3)} - \chi_{\perp}^{(3)}) \\ 0 \end{pmatrix} e^{i3k_\omega z} \quad (2.5)$$

On en déduit l'expression suivante de l'intensité THG :

$$I(3\omega) = \frac{9\epsilon_0\omega^2}{16n_{3\omega}c} \left[ (\chi_{\parallel}^{(3)} - \chi_{cr}^{(3)})^2 + (\chi_{\perp}^{(3)} - \chi_{cr}^{(3)})^2 \right] |\mathcal{A}_1|^6 |J(\Delta k, z_1, z_2)|^2 \quad (2.6)$$

Dans un milieu isotrope, les symétries du milieu réduisent le nombre de composantes non-nulles indépendantes du tenseur non-linéaire  $\chi^{(3)}$  du troisième ordre à une seule, notée  $\chi_{\parallel} = \chi_{\perp} = \chi_{cr}$ . En remplaçant les composantes tensorielles dans l'équation C.7, on en déduit une première propriété fondamentale :

**Encart 2.2 - Propriété 1 : Absence de signal THG dans les milieux isotropes**

Pour des raisons tensorielles, le signal THG est absent sur un milieu isotrope soumis à une polarisation d'excitation circulaire :  $I(3\omega) = 0$  [134].

#### - Forme analytique de la réponse en intensité THG sur un matériau anisotrope

Dans le cas d'une polarisation d'excitation circulaire arrivant sur un milieu anisotrope avec une symétrie cylindrique  $C_\infty$  caractérisée par le tenseur  $\chi^{(3)}$  avec 3 composantes indépendantes et par les indices  $n_x = n_e$  et  $n_y = n_o$ , le champ électrique d'excitation s'écrit :

$$\vec{E}_1(\vec{r}, \omega) = \begin{pmatrix} E_x(\vec{r}, \omega) \\ E_y(\vec{r}, \omega) \\ 0 \end{pmatrix} = \frac{A_1(\vec{r})}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} e^{ik_e z} \\ ie^{ik_o z} \\ 0 \end{pmatrix} \quad (2.7)$$

La polarisation induite se déduit de l'expression précédente :

$$\vec{P}(\vec{r}, 3\omega) = \epsilon_0 \frac{A_1^3(\vec{r})}{2\sqrt{2}} \begin{pmatrix} \chi_{\parallel}^{(3)} e^{3ik_e z} - \chi_{cr}^{(3)} e^{i(2k_o + k_e)z} \\ i(\chi_{cr}^{(3)} e^{i(2k_e + k_o)z} - \chi_{\perp}^{(3)} e^{3ik_o z}) \\ 0 \end{pmatrix} \quad (2.8)$$



Et par conséquent, les composantes du champ  $E(3\omega)$  s'écrivent :

$$\begin{cases} \mathcal{A}_{3,x} = \frac{3i\omega}{2n_{3\omega}c} \left[ \chi_{\parallel}^{(3)} J(\Delta k_{eeee}, z_1, z_2) - \chi_{cr}^{(3)} J(\Delta k_{eooe}, z_1, z_2) \right] \mathcal{A}_1^3 \\ \mathcal{A}_{3,y} = \frac{3i\omega}{2n_{3\omega}c} \left[ i \left[ \chi_{cr}^{(3)} J(\Delta k_{oeeo}, z_1, z_2) - \chi_{\perp}^{(3)} J(\Delta k_{oooo}, z_1, z_2) \right] \right] \mathcal{A}_1^3 \\ \mathcal{A}_{3,z} = 0 \end{cases} \quad (2.9)$$

On remarque ici la présence des intégrales  $J$  associées à des  $\Delta k$  différents devant chaque terme de tenseur  $\chi^{(3)}$  à cause de son anisotropie. Pour déterminer la réponse THG dans le volume d'une structure anisotrope, les intégrales  $J$  sont calculées entre  $z_1 = -\infty$  et  $z_2 = +\infty$ , on trouve  $J(\Delta k_{eeee}, -\infty, +\infty) = J(\Delta k_{oooo}, -\infty, +\infty) = 0$  et  $J(\Delta k_{eooe}, -\infty, +\infty) = 0$  ou  $J(\Delta k_{oeeo}, -\infty, +\infty) = 0$ . Par conséquent, l'intensité THG s'exprime :

$$I(3\omega) = \frac{9\epsilon_0\omega^2\pi^2b^4\Delta k^2}{8^2n_{3\omega}c} \left| \chi_{cr}^{(3)} \right|^2 |\mathcal{A}_1|^6 e^{-b\Delta k} \quad (2.10)$$

Ce résultat indique que la réponse THG dans le volume d'un matériau anisotrope permet de sonder l'amplitude de la composante  $\chi_{cr}^{(3)}$ .

En revanche, sur une interface entre un milieu anisotrope et un milieu isotrope, on peut faire l'approximation que la valeur l'intégrale  $J(\Delta, z_1, z_2)$  ne dépend pas du type d'accord de phase réalisé au premier ordre. On peut donc réécrire l'expression du champ THG en mettant en facteur  $J(\Delta, z_1, z_2)$  :

$$I(3\omega) = \frac{9\epsilon_0\omega^2\pi^2b^4\Delta k^2}{8^2n_{3\omega}c} \left[ \left( \chi_{\parallel}^{(3)} - \chi_{cr}^{(3)} \right)^2 + \left( \chi_{cr}^{(3)} - \chi_{\perp}^{(3)} \right)^2 \right] |\mathcal{A}_1|^6 |J(\Delta k, z_1, z_2)|^2 \quad (2.11)$$

**Encart 2.3 - Propriété 2 : Conservation du signal THG dans les milieux anisotropes**

Le signal THG est conservé dans le volume de milieux anisotropes pour une polarisation incidente circulaire si la biréfringence est suffisante pour compenser la phase de Gouy. En particulier, l'intensité THG vient sonder uniquement le terme croisé  $\chi_{cr}^{(3)}$  dans le volume du matériau et la polarisation circulaire est quasi optimale pour obtenir un signal THG maximal dans les cas d'accords de phase II et III [128]. En revanche, au niveau d'une interface l'expression de l'intensité THG dépend des trois termes indépendants du tenseur  $\chi^{(3)}$ .

**- Résumé**

Le tableau 2.4 résume les cas à l'origine de l'émission d'un signal THG dans les milieux isotropes et anisotropes en fonction de la polarisation d'excitation choisie.

**b) Détection de l'anisotropie des structures biologiques à partir de la réponse L-C-THG**

Cette divergence de réponse THG à une polarisation d'excitation circulaire entre des matériaux isotropes et anisotropes a peu été utilisée jusqu'à présent. Elle constitue cependant une méthode relativement simple pour **détecter le caractère biréfringent des échantillons** à partir de

		Incident polar.	Isotropic	Anisotropic
Interface		↕ linear	<b>THG</b>	<b>THG</b>
		○ circular	no THG	<b>THG</b>
Volume		↕ linear	no THG	<b>THG</b>
		○ circular	no THG	<b>THG</b>

FIGURE 2.4 – Résumé des cas à l’origine de l’émission d’un signal THG dans les milieux isotropes et anisotropes en fonction de la polarisation d’excitation.

la comparaison de deux images ([132], [128]). La première image obtenue pour une polarisation d’excitation linéaire (LTHG) permet d’observer les structures présentes dans l’échantillon, et la seconde réalisée avec une polarisation circulaire (C-THG) permet d’identifier les structures anisotropes.

Cette méthode de détection des échantillons biréfringents a été utilisée par Oron et al. [128] sur des spicules larvaires biréfringents d’oursins constitués de cristaux de calcite ( $CaCO_3$ ). La figure 2.5 présente des acquisitions en contraste THG réalisées pour des polarisations d’excitation (a) linéaire et (b) circulaire. Le contraste THG associé à une polarisation linéaire (a) révèle à la fois les spicules d’oursins (en blanc) et l’interface horizontale de la lame de verre (fond gris), tandis que le contraste associé à la polarisation circulaire (b) provient uniquement du spicule biréfringent. Lorsque le signal THG généré par une polarisation d’excitation circulaire est analysé par un polariseur, il est conservé pour une orientation particulière du polariseur (c) (parallèle à l’axe cristallin rapide) et disparaît pour une orientation perpendiculaire (d) (parallèle à l’axe cristallin lent). Ce résultat révèle que les axes de la structure cristalline sont conservés à travers l’ensemble du spicule et confirme la linéarité de la polarisation du signal harmonique en accord avec la description des mécanismes d’accords de phase décrits dans le chapitre I.IV.

Cette propriété a également été utilisée en 2010 par Olivier et al. [91] pour révéler l’anisotropie des cornées humaines. Le signal THG disparaît dans l’épithélium pour une polarisation circulaire - soulignant la nature isotrope de ses composants - tandis que le signal THG persiste dans le stroma cornéen fortement anisotrope.

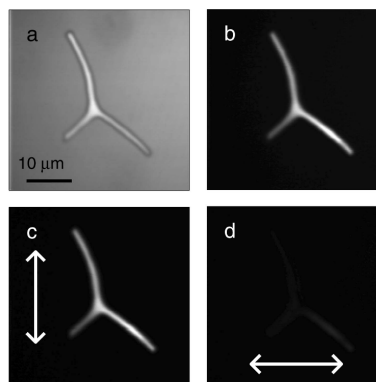


FIGURE 2.5 – Imagerie THG de spicules de larves d’oursin déposées sur une lame de verre. a. Image L-THG. b. Image C-THG. c. Image C-THG avec détection résolue en polarisation. d. Image C-THG avec détection résolue en polarisation. Adapté de [128].

### 2.1.3 Réponse PTHG sur des matériaux anisotropes

Nous nous intéressons ici à la description de la **réponse en intensité THG issue du volume et d'une interface horizontale d'un milieu anisotrope pour une rotation de la polarisation d'excitation linéaire** sur une plage angulaire de  $\pi$  radians. Nous allons voir qu'elle dépend fortement de l'angle relatif entre la polarisation d'excitation et les axes optiques du milieu.

#### a) Forme analytique de la variation d'intensité PTHG dans le volume des milieux anisotropes

Similairement au développement analytique présenté plus haut pour la réponse THG issue d'un matériau anisotrope pour une polarisation d'excitation circulaire, il va falloir tenir compte des deux contributions anisotropes couplées du matériau pour décrire la réponse PTHG :

- (i) l'indice linéaire  $n$  biréfringent qui joue un rôle dans la réalisation de l'accord de phase
- (ii) la réponse non-linéaire du troisième ordre donnée par le  $\chi^{(3)}$

Nous avons vu dans la partie I.IV qu'un signal THG est obtenu lorsque le désaccord d'indice est positif et suffisamment important pour compenser la phase de Gouy. Ce cas est réalisé pour une polarisation harmonique (linéaire) suivant l'axe rapide du matériau et pour une projection non-nulle de la polarisation d'excitation suivant les axes ordinaires et extraordinaires du matériau. Cette première composante détermine quels éléments du tenseur vont produire du signal THG et pondérer chacun d'entre eux.

Pour un champ d'excitation caractérisé par une **polarisation d'excitation linéaire** orientée dans le plan  $(xy)$  et forme un angle  $\phi$  avec l'axe  $x$  :

$$\vec{E}_1(\vec{r}, \omega) = \begin{pmatrix} E_x(\vec{r}, \omega) \\ E_y(\vec{r}, \omega) \\ 0 \end{pmatrix} = A_1(\vec{r}) \begin{pmatrix} \cos(\phi)e^{ik_e z} \\ \sin(\phi)e^{ik_o z} \\ 0 \end{pmatrix} \quad (2.12)$$

La polarisation non-linéaire induite se réécrit :

$$\vec{P}(\vec{r}, 3\omega) = \epsilon_0 A_1^3(\vec{r}) \begin{pmatrix} \chi_{\parallel}^{(3)} \cos^3(\phi)e^{3ik_e z} + \chi_{cr}^{(3)} \cos(\phi) \sin^2(\phi)e^{i(2k_o+k_e)z} \\ \chi_{cr}^{(3)} \cos^2(\phi) \sin(\phi)e^{i(2k_e+k_o)z} + \chi_{\perp}^{(3)} \sin^3(\phi)e^{3ik_o z} \\ 0 \end{pmatrix} \quad (2.13)$$

La résolution de l'équation d'onde pour cette polarisation non-linéaire - présentée de manière détaillée dans l'annexe B - aboutit à la relation suivante :

$$\begin{cases} \mathcal{A}_{3,x} = \frac{3i\omega}{2n_{3ec}} \left[ \chi_{\parallel}^{(3)} \cos^3(\phi) J(\Delta k_{eeee}, z_1, z_2) + \chi_{cr}^{(3)} \cos(\phi) \sin^2(\phi) J(\Delta k_{eooe}, z_1, z_2) \right] \mathcal{A}_1^3 \\ \mathcal{A}_{3,y} = \frac{3i\omega}{2n_{3oc}} \left[ \chi_{cr}^{(3)} \cos^2(\phi) \sin(\phi) J(\Delta k_{oeeo}, z_1, z_2) + \chi_{\perp}^{(3)} \sin^3(\phi) J(\Delta k_{oooo}, z_1, z_2) \right] \mathcal{A}_1^3 \\ \mathcal{A}_{3,z} = 0 \end{cases} \quad (2.14)$$

Dans le volume d'un matériau biréfringent, à cause des valeurs négatives des accords d'indices  $\Delta k_{eeee}$ ,  $\Delta k_{oooo}$  et soit du terme  $\Delta k_{eooe}$  soit de  $\Delta k_{oeeo}$  selon le signe de la biréfringence, au total 3 termes  $J$  sont nuls. Au final, l'expression de l'intensité THG se réduit :

- dans le cas d'un milieu **uniaxe à biréfringence positive** à :

$$I_y(3\omega, \phi) = \frac{9\epsilon_0\omega^2 \pi^2 b^4 \Delta k^2}{2n_{3\omega}c} \frac{\pi^2 b^4 \Delta k^2}{4} \left| \chi_{cr}^{(3)} \right|^2 \cos^4(\phi) \sin^2(\phi) |\mathcal{A}_1|^6 e^{-b\Delta k} \quad (2.15)$$

- dans le cas d'un milieu **uniaxe à biréfringence négative** à :

$$I_x(3\omega, \phi) = \frac{9\epsilon_0\omega^2 \pi^2 b^4 \Delta k^2}{2n_{3\omega}c} \frac{\pi^2 b^4 \Delta k^2}{4} \left| \chi_{cr}^{(3)} \right|^2 \cos^2(\phi) \sin^4(\phi) |\mathcal{A}_1|^6 e^{-b\Delta k} \quad (2.16)$$

Similairement au résultat obtenu pour une polarisation d'excitation circulaire, on peut remarquer que le signal THG provient ici de la présence du terme croisé  $\chi_{cr}^{(3)}$ . Ces deux résultats peuvent être unifiés sous une propriété unique :

**Encart 2.4 - Propriété 3 :**

L'intensité THG issue du volume d'un matériau anisotrope présente la dépendance suivante avec l'orientation  $\phi$  de la polarisation d'excitation linéaire :  $I(3\omega, \phi) \propto \cos^4(\phi - \phi_0) \sin^2(\phi - \phi_0)$  où  $\phi_0$  correspond à l'orientation de l'axe lent du cristal. La polarisation du signal harmonique est linéaire et **orientée le long de l'axe rapide du cristal** et l'intensité harmonique est **maximale lorsque la polarisation incidente est orientée à environ  $\pi/6$  de l'axe lent**. On peut noter que lorsque la polarisation d'excitation est parallèle à un des axes du cristal, le signal THG disparaît. La représentation en coordonnées polaires - donnée par la figure 2.6 - a l'aspect d'un papillon dont l'axe entre les ailes les plus proches donne l'orientation de l'axe lent.

**b) Forme analytique du signal PTHG obtenu à l'interface horizontale d'un milieu anisotrope**

Sur une interface horizontale, on peut supposer en première approximation que les termes  $J(\Delta k, z_1, z_2)$  des différents accords de phase sont égaux et les mettre en facteur pour exprimer l'intensité THG :

$$I(3\omega, \phi) = \frac{9\epsilon_0\omega^2}{2n_{3\omega}c} \left[ \left| \chi_{\parallel}^{(3)} \cos^3(\phi) + \chi_{cr}^{(3)} \cos(\phi) \sin^2(\phi) \right|^2 + \left| \chi_{cr}^{(3)} \cos^2(\phi) \sin(\phi) + \chi_{\perp}^{(3)} \sin^3(\phi) \right|^2 \right] |\mathcal{A}_1|^6 |J(\Delta k, z_1, z_2)|^2 \quad (2.17)$$

L'intensité THG dépend de la valeur de la fonction suivante :

$$f(\phi) = \left[ \chi_{\parallel}^{(3)} \cos^3(\phi) + \chi_{cr}^{(3)} \cos(\phi) \sin^2(\phi) \right]^2 + \left[ \chi_{cr}^{(3)} \cos^2(\phi) \sin(\phi) + \chi_{\perp}^{(3)} \sin^3(\phi) \right]^2 \quad (2.18)$$

qui donne 3 valeurs remarquables à  $0$ ,  $\pi/4$  et  $\pi/2$  radians :

$$\begin{cases} f(0) = \chi_{\parallel}^{(3)} \\ f(\pi/2) = \chi_{\perp}^{(3)} \\ f(\pi/4) = \frac{1}{8} \left[ \left( \chi_{\parallel}^{(3)} + \chi_{cr}^{(3)} \right)^2 + \left( \chi_{cr}^{(3)} + \chi_{\perp}^{(3)} \right)^2 \right] \end{cases} \quad (2.19)$$

La courbe en trait continu de la figure 2.6 présente cette fonction normalisée pour  $\chi_{\parallel}^{(3)} = 1.1$ ,  $\chi_{cr}^{(3)} = 0.3$  et  $\chi_{\perp}^{(3)} = 1$ . On déduit de ces valeurs remarquables une quatrième propriété :

**Encart 2.5 - Propriété 4 :**

Une mesure de la réponse THG polarimétrique sur une interface horizontale d'un matériau anisotrope permet de remonter aux valeurs relatives des trois composantes non-nulles indépendantes  $\chi_{\parallel}^{(3)}$ ,  $\chi_{cr}^{(3)}$ ,  $\chi_{\perp}^{(3)}$  du tenseur  $\chi^{(3)}$ .

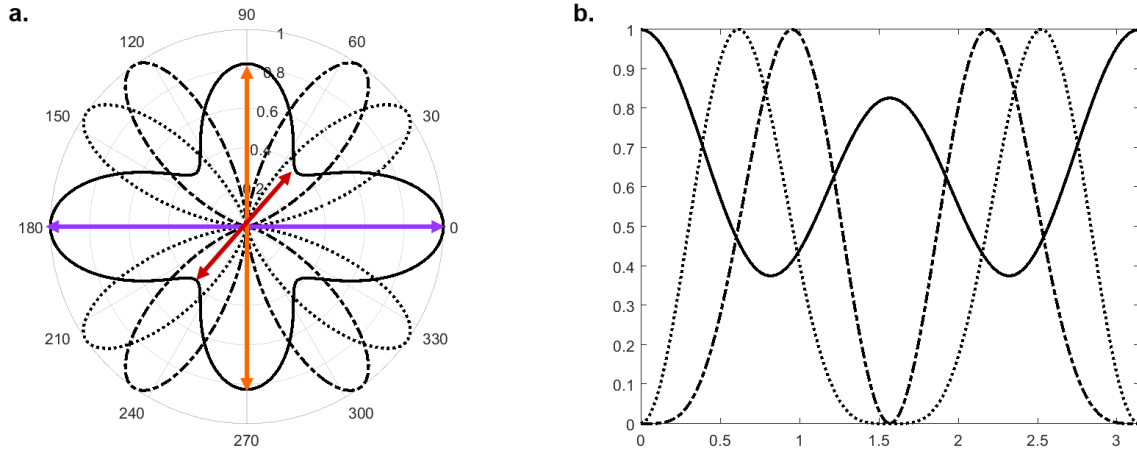


FIGURE 2.6 – Dépendance de l'intensité PTHG sur un cristal uniaxe biréfringent. a. Diagrammes de l'intensité THG en coordonnées polaires. b. Graphes d'intensité PTHG en fonction de l'angle  $\phi$  sur l'interface horizontale (trait continu), dans le volume pour un milieu uniaxe à biréfringence positive (en pointillé) et négative (traits interrompus).

### c) Détection du caractère biréfringent et de l'orientation des axes optiques des structures biologiques à partir de la réponse PTHG

Cet aspect théorique a été confirmé expérimentalement par deux expériences décrites dans la littérature. Une première démonstration réalisée par Oron et al. donne la dépendance de l'intensité THG pour une polarisation d'excitation linéaire balayant une plage angulaire de  $[0 - 90^\circ]$  sur un bloc épais (2 mm) de calcite (cf. figure 2.7.a) [128]. Pour rappel, la calcite est un cristal biréfringent uniaxe négatif avec une dispersion normale dominé par l'accord de phase de type II [135]. Le profil d'intensité PTHG dans le volume de la calcite présente un seul pic sur cette plage (donc deux sur une plage de  $[0 - 180^\circ]$ ) avec un maximum pour une polarisation d'excitation orientée à  $35^\circ$  de l'axe lent (ici l'axe **ordinaire**) et une extinction lorsque la polarisation d'excitation est parallèle à un des axes cristallins. Le profil d'intensité THG obtenu pour une polarisation d'excitation circulaire en faisant varier l'orientation de l'axe d'un analyseur en détection (non montré) montre que la polarisation harmonique est parallèle à l'axe rapide (ici l'axe **extraordinaire**). De plus, une mesure de l'intensité PTHG sur l'interface horizontale montre des maxima d'intensité lorsque la polarisation est parallèle aux axes cristallins.

La seconde démonstration a été réalisée sur un cristal liquide de type 5CB LC - biréfringent **uniaxe positif avec une dispersion normale dominé par l'accord de phase de type II** [126]. Le profil d'intensité THG - présenté sur la figure 2.7.b - montre la présence de deux maxima lorsque la polarisation balaie une plage de  $[0 - 180^\circ]$ , que ces maxima sont atteints pour une polarisation d'excitation orientée à  $0.22\pi$  et  $0.83\pi$  de l'axe lent (ici l'axe **extraordinaire**) et que la polarisation harmonique est parallèle à l'axe rapide (ici l'axe **ordinaire**) [127].

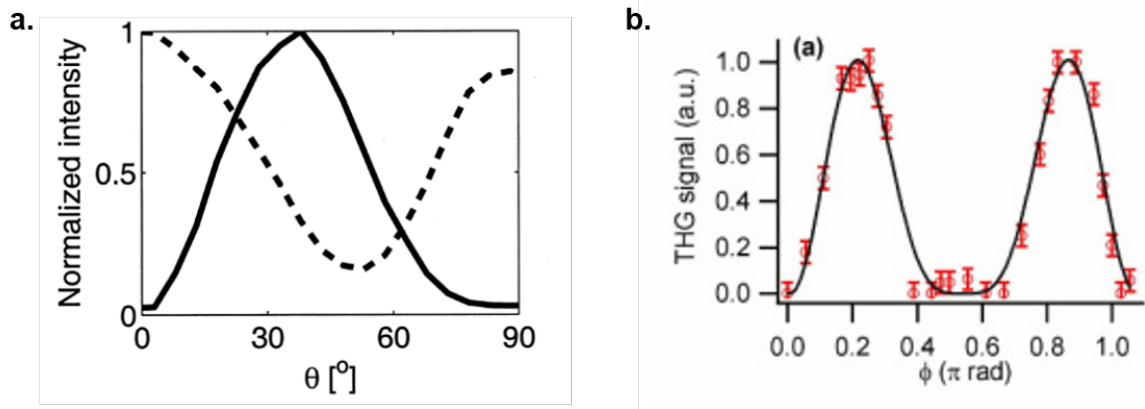


FIGURE 2.7 – Dépendance angulaire du signal THG avec l'orientation de la polarisation d'excitation. a. Cas de la calcite (matériau uniaxe négatif de type II à dispersion normale) où  $\theta$  : angle relatif entre la polarisation incidente et l'axe ordinaire du cristal. Adapté de [128]. b. Cas d'un cristal liquide 5CB-LC (matériau uniaxe positif de type II à dispersion normale) où  $\Phi$  : angle relatif entre la polarisation incidente et l'axe extraordinaire du cristal. Adapté de [127].

### 2.1.4 Réponse PTHG d'interface sur des matériaux anisotropes

Dans cette partie, nous rappelons les résultats de l'étude réalisée par Zimmerley et al. [133] sur la sensibilité de la **réponse PTHG sur des interfaces verticales d'assemblages lipidiques organisés** (décrits dans l'encart 2.6) aux propriétés de symétries de la susceptibilité électronique  $\chi^{(3)}$  de cette structure. Cette étude a montré que la réponse PTHG peut être exploitée pour sonder les **propriétés d'ordre et d'orientation moléculaires** des assemblages lipidiques multilamellaires. Nous résumons dans cette sous-partie les éléments clés de cette étude qui nous seront utiles dans la suite de notre étude polarimétrique.

#### **Encart 2.6 - Assemblages lipidiques multilamellaires**

Les assemblages lipidiques multilamellaires sont des structures qui jouent un rôle physiologique important, le *stratum corneum* assure par exemple la barrière cutanée et la myéline assure la conductivité axonale. Leur ultrastructure périodique et symétrique résulte de la formation spontanée de bicouches de lipides avec des têtes lipophiles et des queues hydrophobes et de leur empilement. La désorganisation de ces structures conduit à des dysfonctions importantes, comme la perte du maintien de la peau (ichtyose congénitale forme récessive caractérisée par la présence de squames) et des perturbations dans la transmission d'influx nerveux (pathologie démyélinisante), etc.

#### a) Forme analytique de la variation d'intensité PTHG sur des interfaces verticales entre des milieux anisotropes

##### - Anisotropie de la réponse THG dans des assemblages lipidiques organisés

L'approche polarimétrique vise ici à sonder les propriétés d'ordre des assemblages lipidiques organisés en s'appuyant sur la **propriété d'anisotropie de la réponse électronique du troisième ordre  $\chi^{(3)}$  des assemblages de lipides** de type DMPC (*1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) au niveau du volume focal. Celle-ci se construit à deux échelles :



**(i) à l'échelle moléculaire :**

La forte polarisabilité  $\gamma^{CC}$  et l'alignement des liaisons  $C - C$  dans les chaînes hydrocarbonées formant les queues aliphatiques des lipides sont à l'origine d'une forte **polarisabilité moléculaire**  $\gamma^{DMPC}$  **anisotrope** des molécules de *DMPC*. Cette anisotropie présente un maximum selon une direction parallèle aux chaînes hydrocarbonées. (cf. figure 2.8.a)

**(ii) à l'échelle microscopique :**

Les assemblages des bicouches lipidiques présentent une géométrie spécifique caractérisée par l'alignement des lipides (dans la configuration saturée). Le parallélisme des chaînes hydrocarbonées dans cette géométrie transpose l'anisotropie de la réponse moléculaire du troisième ordre  $\gamma^{(3)}$  en une anisotropie **supramoléculaire** de la susceptibilité électronique non-linéaire  $\chi^{(3)}$  des matrices lipidiques. (cf. figure 2.8.a)

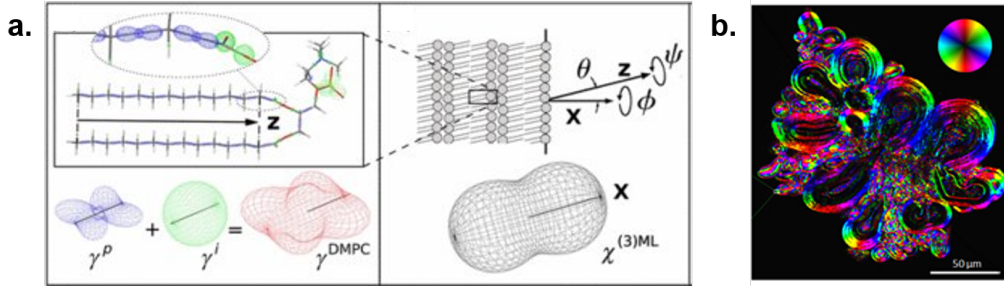


FIGURE 2.8 – Caractérisation de l'ordre moléculaire de structures lipidiques organisées avec l'imagerie THG polarimétrique. a. Description numérique de l'anisotropie de la réponse THG de lipides  $\gamma^{(3), lipides}$  et d'assemblages lipidiques organisés  $\chi^{(3), lipides}$ . b. Carte angulaire de la réponse PTHG sur une agglomération de vésicules lipidiques multilamellaires. Adapté de [133].

**- Réponse PTHG théorique à l'interface des vésicules lipidiques multilamellaires et extraction de l'ordre et de l'orientation moléculaire**

Zimmerley et al. font l'hypothèse que la dépendance de l'intensité THG avec l'indice linéaire  $n$  peut être négligée puisque l'accord de phase est systématiquement vérifié sur une interface (les variations spatiales de  $n$ , la biréfringence et la dispersion de chaque milieu sont négligés au premier ordre). Par conséquent, seule l'anisotropie non-linéaire provenant de la réponse tensorielle d'ordre 3 est considérée. La polarisation générée est exprimée comme la réponse de la différence entre les tenseurs des deux matériaux  $\Delta\chi^{(3)} = \chi_1^{(3)} - \chi_2^{(3)}$  au champ d'excitation :

$$\vec{P}(\vec{r}, 3\omega) = \epsilon_0 A_1^3(\vec{r}) \begin{pmatrix} \cos(\phi) \left( \Delta\chi_{\parallel}^{(3)} \cos^2(\phi) + \Delta\chi_{cr}^{(3)} \sin^2(\phi) \right) \\ \sin(\phi) \left( \Delta\chi_{cr}^{(3)} \cos^2(\phi) + \Delta\chi_{\perp}^{(3)} \sin^2(\phi) \right) \\ 0 \end{pmatrix} e^{3ik_{\omega}z} \quad (2.20)$$

Ils montrent que la réponse en intensité THG sur l'interface transverse (parallèle à l'axe de propagation) d'assemblages lipidiques organisés et d'un milieu isotrope est modulée à travers une corrélation de phase entre l'orientation  $\phi$  de la polarisation incidente et  $\phi_0$  l'orientation moyenne des dipôles moléculaires  $C - C$  décrite par la relation suivante :

$$I(3\omega, \phi) \propto A + B \cdot \cos^2(\phi - \phi_0) \quad (2.21)$$

où les paramètres  $A$  et  $B$  sont reliés aux différents éléments du tenseur  $\chi^{(3)}$ .

Pour une rotation de la polarisation d'excitation sur une plage angulaire  $0 - 180^\circ$ , l'intensité THG atteint donc un maximum unique lorsque la polarisation est parallèle à l'axe cristallin.

**Encart 2.7 - Propriété 5 :**

La réponse PTHG mesurée sur les interfaces parallèles à l'axe de propagation permet de sonder les propriétés de symétrie du  $\chi^{(3)}$  des assemblages lipidiques, dominée par la réponse anisotrope du troisième ordre des liaisons carbone-carbone alignées dans les queues des lipides.

- L'**orientation principale des lipides** est donnée par le paramètre angulaire  $\phi_0$ .
- La dispersion des lipides autour du paramètre angulaire  $\phi_0$  est donnée par le **degré d'ordre moléculaire** du matériau décrit par le coefficient de modulation  $M$ . Ce coefficient est calculé en fonction des paramètres  $A$  et  $B$  :

$$M = \frac{I_{max}^{THG} - I_{min}^{THG}}{I_{max}^{THG}} = \frac{B}{A + B} \quad (2.22)$$

**b) Détermination expérimentale de l'ordre moléculaire dans des vésicules lipidiques multilamellaires**

Dans l'étude de Zimmerley et al., la réponse PTHG a été mesurée expérimentalement sur deux types d'échantillons : des **vésicules lipidiques multilamellaires** (MLVs) (cf. encart 2.8) et le **stratum corneum** (couche cellulaire la plus superficielle de l'épiderme).

**Encart 2.8 - Vésicules Lipidiques Multilamellaires (MLVs)**

Les MLVs sont des liposomes multilamellaires constitués de bicouches de lipides superposées les unes aux autres et séparées par de fines couches d'eau. Ici, les MLVs sont générées à partir d'une molécule 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine (DMPC).

En s'appuyant sur le fort contraste THG émergeant sur les interfaces des MLVs et des plis verticaux du *stratum corneum* avec le milieu environnant, ils ont mis en évidence expérimentalement une forte modulation de la réponse THG sur ces domaines pour une rotation de la polarisation d'excitation. Un fit de l'intensité PTHG avec une fonction de la forme  $A + B \cdot \cos^2(\phi - \phi_0)$  permet d'extraire les paramètres de modulation  $M$  et d'angle  $\phi_0$  en chaque pixel de l'image pour reconstruire des cartes spatiales de ces deux paramètres.

Le paramètre de modulation  $M$  présente des valeurs élevées sur l'interface verticale d'une MLV au niveau de son plan équatorial ( $M = 0.73 \pm 0.55$ ) et sur les interfaces lipidiques du *stratum corneum* (entre 0.6 et 0.75 selon les couches), à la différence de celle mesurée ( $M = 0.13 \pm 0.02$ ) sur une interface verticale du plan équatorial d'une gouttelette d'huile (milieu isotrope). Les résultats expérimentaux sont en accord avec la description théorique selon laquelle le contraste polarimétrique renseigne sur l'**ordre de la structure à l'échelle moléculaire**.

L'angle  $\phi_0$  qui informe sur l'**orientation moyenne des lipides** dans le volume focal correspond à une orientation orthogonale aux interfaces verticales des assemblages organisés de lipides, c'est-à-dire parallèle aux queues des lipides.

### 2.1.5 Conclusion

Cette section a fait la synthèse des réponses polarimétriques sur des structures anisotropes :

- l'anisotropie d'un matériau peut être détectée par la **persistance du signal THG par accord de phase pour une polarisation d'excitation circulaire** induite par la présence du terme  $\chi_{cr}^{(3)}$  dans son tenseur.

- l'**intensité THG générée par accord de phase dans le volume de structures anisotropes** suit la dépendance suivante avec l'orientation de la polarisation d'excitation linéaire :  $I(3\omega, \phi) \propto \cos^4(\phi - \phi_0) \sin^2(\phi - \phi_0)$  où  $\phi_0$  correspond à l'orientation de l'axe optique lent (représentée par les courbes noires de la figure 2.9), et la polarisation du signal THG émis est parallèle à l'axe optique rapide.

- l'**intensité THG générée sur l'interface horizontale** d'une structure anisotrope varie en :

$$I(3\omega, \phi) \propto \left[ \chi_{\parallel}^{(3)} \cos^3(\phi) + \chi_{cr}^{(3)} \cos(\phi) \sin^2(\phi) \right]^2 + \left[ \chi_{cr}^{(3)} \cos^2(\phi) \sin(\phi) + \chi_{\perp}^{(3)} \sin^3(\phi) \right]^2$$

où les éléments  $\chi_{\parallel}^{(3)}$ ,  $\chi_{cr}^{(3)}$  et  $\chi_{\perp}^{(3)}$  du tenseur peuvent être déterminés par l'intensité THG associée à 3 orientations remarquables de la polarisation d'excitation (courbe bleu ciel de la figure 2.9)

- l'**intensité THG générée sur l'interface parallèle à l'axe de propagation** d'une structure anisotrope varie comme  $I(3\omega, \phi) \propto A + B \cos^2(\phi - \phi_0)$  (courbe bleue foncée de la figure 2.9)

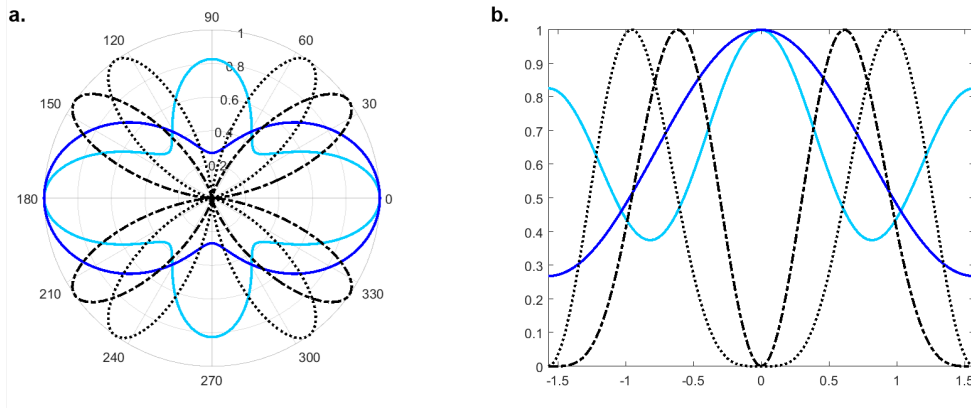


FIGURE 2.9 – Résumé des dépendances angulaires de la réponse THG polarimétrique sur un milieu anisotrope selon le domaine imagé. a. Diagrammes de l'intensité THG en coordonnées polaires. b. Graphes d'intensité PTHG en fonction de l'angle  $\phi$  de la polarisation d'excitation.

## 2.2 Dispositif PTHG expérimental

Cette section présente le dispositif expérimental « classique » de microscopie PTHG.

### 2.2.1 Microscope THG

Nous utilisons un microscope droit multiphotons « fait labo » à balayage point par point schématisé sur la figure 3.5 et décrit ci-dessous.

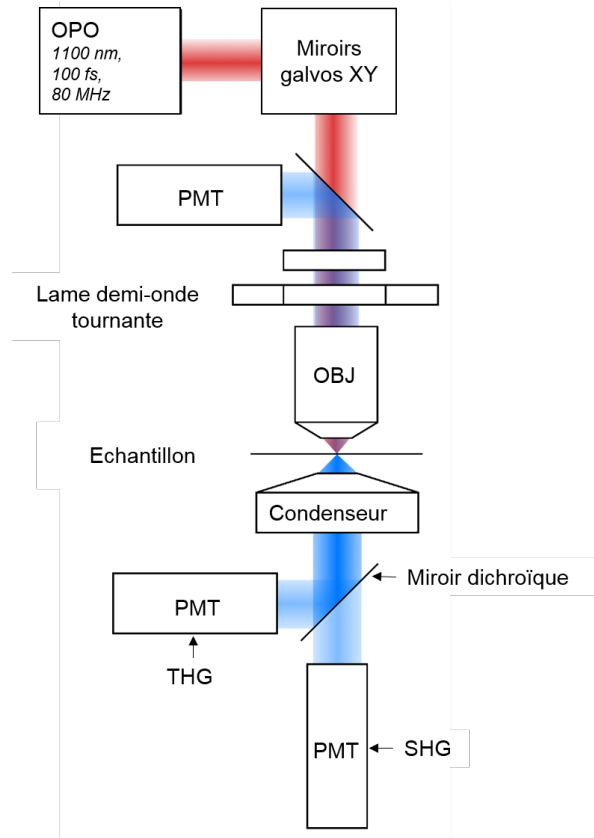


FIGURE 2.10 – Schéma du microscope droit multiphotons à balayage point par point.

### - Source d'excitation

Nous utilisons une **source laser OPO femtoseconde** (*OPO Insight DS+*, *SpectraPhysics*) qui délivre des impulsions de longueur d'onde accordable polarisées linéairement et de durée de  $100\text{ fs}$  avec un taux de répétition de  $80\text{ MHz}$  avec une puissance moyenne maximale de  $1.5\text{ W}$ . Elle fonctionne à partir d'un faisceau de pompe à  $1040\text{ nm}$  dont la fréquence est doublée avec un cristal KDP puis envoyée dans un OPO suivi d'un système de précompensation de la dispersion, ce qui permet d'obtenir en sortie de la source deux faisceaux de longueurs d'onde différentes - un premier à  $1040\text{ nm}$  qui correspond au laser de pompe et un second de longueur d'onde accordable entre  $680\text{ nm}$  et  $1300\text{ nm}$  - qui peuvent être utilisés indépendamment pour l'imagerie SHG, THG ou 2PEF ou simultanément pour l'imagerie CARS ou multicolore.

### - Mise en forme des signaux

Le **contrôle de la puissance des faisceaux** est réalisé au niveau des deux sorties du laser avec une lame d'onde montée sur une monture tournante motorisée suivie d'un cube polariseur. Compte tenu de la large plage spectrale d'accordabilité de la source laser, plusieurs **chemins optiques** ont été construits sur la table optique pour minimiser les pertes de puissance par transmission lors de la propagation du faisceau en adaptant les optiques utilisées. Un premier chemin pour la sortie à  $1040\text{ nm}$  permet de faire de la microscopie CARS par mélange avec une des autres voies. Un second chemin est adapté pour les basses longueurs d'onde ( $680\text{ nm} - 1040\text{ nm}$ ) de la voie accordable et une troisième voie est adaptée pour les hautes longueurs d'onde ( $1040\text{ nm} - 1300\text{ nm}$ ). Sur chacune des trois voies, la **divergence des faisceaux** avant leur entrée dans le microscope est ajustée avec un télescope.

### - Microscope

L'imagerie 2D des échantillons est réalisée grâce à un **système de balayage point par point** constitué de deux miroirs galvanométriques (*VM500S, GSI Lumonics, USA*) imagés sur la pupille arrière de l'objectif de focalisation. Un télescope à deux lentilles placé entre les miroirs et l'objectif agrandit le faisceau pour couvrir la pupille avant de l'objectif.

Cet **objectif** vient focaliser dans le plan de l'échantillon les faisceaux mis en forme sur la table optique. Il est monté sur une platine de micro-positionnement à courant continu *PI M – 126* qui assure sa translation axiale pour réaliser des images 2D à plusieurs profondeurs dans le tissu qui permettent *in fine* de reconstituer une image 3D des échantillons. Nous utilisons principalement un objectif à immersion à eau  $25\times$  avec une grande ouverture numérique  $NA = 1.05$  et une distance de travail de  $2\text{ mm}$  (*XLPLN25XWMP2, Olympus, Japan*) muni d'une bague pour compenser l'aberration sphérique induite par la présence éventuelle d'une lamelle sur le dessus de l'échantillon imagé.

L'échantillon est placé sur une **platine de translation XYZ** (*Z-Deck Prior Scientific*) pilotée manuellement avec un joystick ou automatiquement.

Le microscope possède à la fois une **voie de détection** en transmission (vers l'avant) et en épidétection (vers l'arrière). En transmission, un condenseur *Olympus* à forte ouverture numérique collecte les signaux multiphotons générés au niveau de l'échantillon. Un miroir dichroïque réfléchit les signaux multiphotons de longueur d'onde inférieure à  $488\text{ nm}$ . Pour collecter les composantes fréquentielles d'intérêt et couper le faisceau fondamental, on utilise des filtres (classiquement, on utilise les filtres *Semrock FF01-550/49* pour la SHG, *Semrock FF01-377/50* pour la THG) placés devant les détecteurs. La détection est réalisée avec des tubes photomultiplicateurs (*photomultiplier modules SensTech, UK*) qui convertissent les photons en un flux d'électrons. Ces détecteurs sont utilisés en régime de comptage de photons où les impulsions de courant ainsi générées sont converties en un signal analogique par un circuit programmable CPLD conçu au laboratoire.

### - Système de synchronisation du balayage et de détection des signaux générés

Une carte d'acquisition (*PCI-6115, National Instruments, USA*) commandée par un programme LabView contrôle la synchronisation du balayage et la détection des signaux générés.

### - Résolutions

La **résolution axiale** du microscope est estimée en mesurant la largeur à mi-hauteur du profil axial mesuré lorsque le volume focal traverse l'interface verre-air d'une lamelle horizontale. D'après Barad et al. [82], cette grandeur est environ égale au paramètre confocal du faisceau d'excitation.

## 2.2.2 Dispositif classique de contrôle de la polarisation d'excitation

La polarisation d'excitation est modulée grâce à une **lame demi-onde montée sur un système de rotation motorisé** placé au niveau de la pupille avant de l'objectif (cf. figure 2.11). L'**imagerie THG polarimétrique classique** consiste en l'acquisition d'une séquence d'images THG du même champ de vue où chaque image est acquise pour une orientation différente de la polarisation d'excitation et où la polarisation est tournée entre les images. Dans cette étude, l'angle de la polarisation incidente forme un angle  $\phi$  avec l'axe  $y$  et varie sur la plage angulaire  $[0 - 180^\circ]$  avec un pas de  $10^\circ$ .

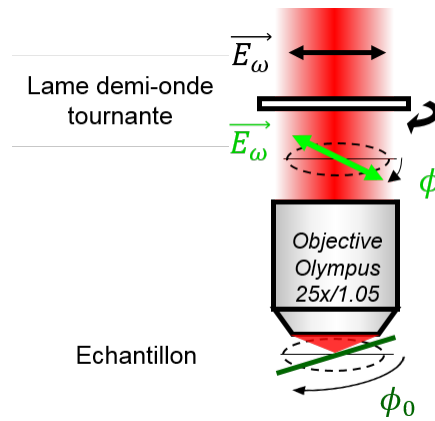


FIGURE 2.11 – Dispositif optique de la THG résolue en polarisation.  $\phi$  correspond à l'angle de la polarisation d'excitation par rapport à l'axe  $y$ ,  $\phi_0$  est l'orientation moyenne des molécules dans le volume focal.

## 2.3 Influence du désaccord d'indice linéaire sur la réponse PTHG issue d'une interface verticale

Comme indiqué précédemment, les articles de la littérature PTHG ne considèrent jamais les effets de distorsion du champ induits par une interface parallèle à l'axe de propagation du faisceau d'excitation. Pour aborder cette question, nous cherchons ici à décrire expérimentalement et numériquement l'**influence du désaccord d'indice linéaire**  $\Delta n = n_2 - n_1$  sur la réponse THG polarimétrique émergeant au voisinage d'une interface verticale entre deux **milieux isotropes** caractérisés par les indices linéaires  $n_1$  et  $n_2$  et les susceptibilités électroniques d'ordre 3 isotropes,  $\chi_1^{(3)}$  et  $\chi_2^{(3)}$ . Pour cela, nous allons évaluer les deux paramètres clés qui caractérisent la réponse PTHG sur une interface verticale, à savoir la modulation  $M$  et la phase  $\phi_0$  (cf. partie II.2), lorsque l'indice optique linéaire  $n_2$  du second milieu varie, conjointement avec la susceptibilité  $\chi_2^{(3)}$ .

Dans un premier temps, nous présentons les **résultats expérimentaux** réalisés sur deux milieux modèles - un bloc de quartz et une gouttelette d'huile - immergés successivement dans plusieurs liquides dont l'indice linéaire  $n_2$  est contrôlé précisément. Dans un second temps, nous décrivons les **résultats numériques** obtenus par des simulations qui reproduisent la propagation d'un faisceau d'excitation et la génération d'un signal THG sur un matériau dont la géométrie et les propriétés optiques s'apparentent à celles d'un bloc de quartz immergé dans un liquide d'indice. Ici, on utilise une approche numérique FDTD (de l'anglais *Finite Difference Time Domain*), couramment employée en électromagnétisme pour résoudre les équations de Maxwell à partir du calcul de différences finies du champ électrique dans le domaine temporel.

### 2.3.1 Résultats expérimentaux de la réponse PTHG sur des interfaces verticales entre des milieux isotropes

Dans cette première sous-partie, nous allons décrire l'amplitude de la modulation  $M$  et l'angle  $\phi_0$  extraits des mesures de la réponse PTHG sur :

- (a) une interface verticale entre un **bloc de quartz** et plusieurs liquides d'indices différents.
- (b) une interface verticale entre une **gouttelette d'huile** et plusieurs liquides.

Puis nous allons caractériser (c) l'influence de l'ouverture numérique sur l'amplitude de modulation mesurée sur une interface verticale entre une gouttelette d'huile et les liquides d'indice.



a) Interface verticale entre un bloc de quartz et un liquide d'indice

La première série d'expériences vise à décrire la réponse PTHG sur une interface parallèle à l'axe optique entre une lamelle de quartz et plusieurs solutions d'indices dont la préparation et l'assemblage sont décrits dans l'encart 2.9 et illustrés sur la figure 2.12. Les conditions d'imagerie sont récapitulées dans l'encart 2.10.

**Encart 2.9 - Protocole expérimental**

- Les **liquides d'indices de réfraction différents** ont été préparés par dilution d'une solution de 2,2'-ThioDiEthanol (abrégé en TDE), d'indice optique linéaire  $n = 1.5215$  à l'état pur, avec de l'eau distillée ( $n = 1.33$ ), puis mesurés avec un réfractomètre à  $\lambda = 589.3 \text{ nm}$ . Les liquides d'indices supérieurs à celui du TDE sont des liquides commerciaux d'indices  $n = 1.600$  (1809 Series A, Cargille, USA) et  $n = 1.700$  (1812 Series B, Cargille, USA) à  $\lambda = 589.3 \text{ nm}$  utilisés à l'état pur.
- Les **lamelles de quartz** - d'indice  $n = 1.4584$  à  $\lambda = 589.3 \text{ nm}$  - ont été taillées avec un diamant sur un bord latéral pour obtenir un bord droit sans rugosité à l'échelle submicrométrique.
- Pour le montage de l'échantillon, une lamelle de quartz est disposée entre une lame et une lamelle de verre à proximité d'une goutte d'un liquide d'indice qui s'étale le long de l'interface de quartz par capillarité.

**Encart 2.10 - Conditions d'imagerie**

L'imagerie PTHG de l'interface verticale de la lamelle de quartz avec chaque liquide d'indice a été réalisée successivement sur 5 domaines à  $6 \mu\text{m}$  sous la surface supérieure du quartz. Les paramètres d'imagerie suivants ont été utilisés : 4 accumulations, une fréquence pixel de  $200 \text{ kHz}$  (temps d'acquisition par pixel de  $5 \mu\text{s}$ ), un échantillonnage de  $0.2 \mu\text{m}$  et une puissance moyenne sous l'objectif de  $50 \text{ mW}$ .

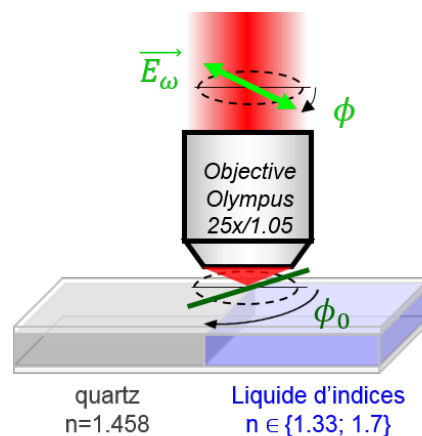


FIGURE 2.12 – Dispositif expérimental d'imagerie PTHG sur une interface verticale entre un bloc de quartz et un liquide d'indice.

### - Analyse des réponses PTHG

L'analyse des profils d'intensités polarimétriques mesurées sur les interfaces verticales entre le quartz et les liquides d'indices a mis en évidence l'apparition d'une forte modulation artefactuelle de la réponse PTHG. Plus précisément, nous avons identifié **3 types de réponses PTHG** qui sont illustrés sur la figure 2.13 par les graphes de l'intensité PTHG tracée en coordonnées polaires obtenus dans 3 conditions distinctes ( $n_2 \in [1.33 ; 1.46 ; 1.52]$ ).

- (i)  $n_2 < n_{1, quartz}$  : la réponse PTHG est **anisotrope** et l'intensité THG est maximale pour une polarisation d'excitation **perpendiculaire** à l'interface
- (ii)  $n_2 = n_{1, quartz}$  : la réponse PTHG est **quasi-isotrope**
- (iii)  $n_2 > n_{1, quartz}$  : la réponse PTHG est **anisotrope** et l'intensité THG est maximale pour une polarisation d'excitation **parallèle** à l'interface.

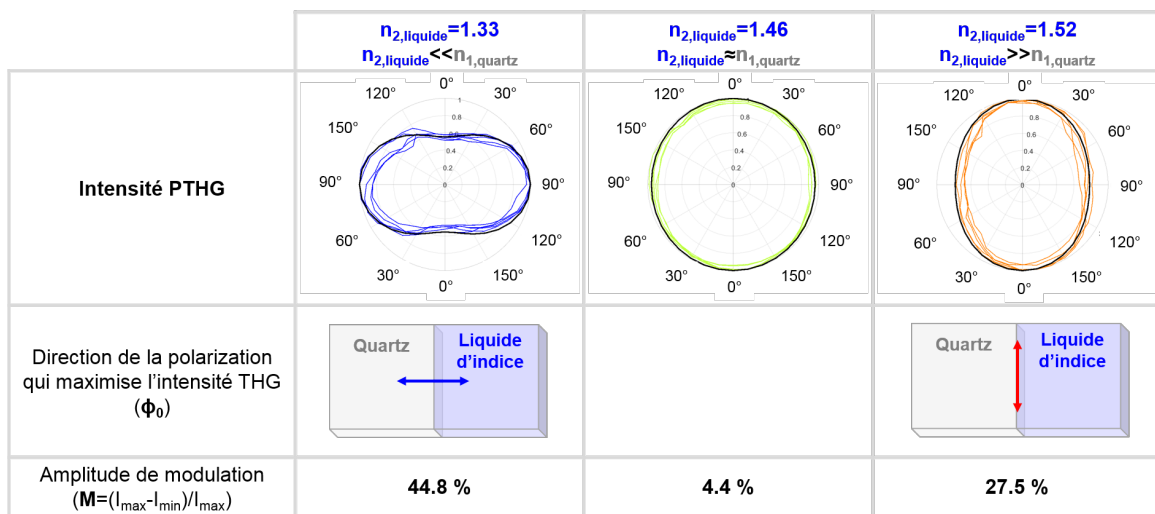


FIGURE 2.13 – Réponses PTHG expérimentales sur une interface verticale entre une lamelle de quartz et plusieurs liquides d'indices.

### - Dépendance de l'amplitude de modulation PTHG avec le désaccord d'indices

L'ensemble des amplitudes de modulation PTHG relatives aux différentes conditions expérimentales sont représentées sur la figure 2.14. Pour davantage de lisibilité des résultats, nous avons associé un signe positif à la modulation lorsque l'angle  $\phi_0$  est orthogonal à l'interface ( $\phi_0 = 90^\circ$ ) et un signal négatif lorsqu'il est parallèle à l'interface ( $\phi_0 = 0^\circ$ ). Ces expériences révèlent sans ambiguïté une **augmentation de l'amplitude de modulation avec l'augmentation de la valeur absolue du désaccord**  $|n_2 - n_1|$  entre les indices  $n_1$  et  $n_2$  relatifs aux deux milieux.

### - Représentation de la réponse PTHG en coordonnées polaires

A partir des valeurs de modulation  $M$  moyennes et d'angle  $\phi_0$  trouvées dans les différents cas  $\Delta n = n_2 - n_1$ , nous avons retracés les réponses PTHG en coordonnées polaires (cf. figure 2.15) pour faire apparaître l'anisotropie de la réponse PTHG. On observe clairement un basculement de l'orientation de la polarisation incidente qui maximise l'intensité PTHG.

### - Discussion sur les résultats expérimentaux obtenus sur les lamelles de quartz

Ces expériences d'imagerie PTHG sur l'interface verticale entre une lame de quartz et des liquides d'indice ont permis de mettre en évidence et de quantifier **l'importance des effets induits par les indices optiques linéaires** sur la modulation  $M$  et l'angle  $\phi_0$  qui caractérisent la réponse PTHG.

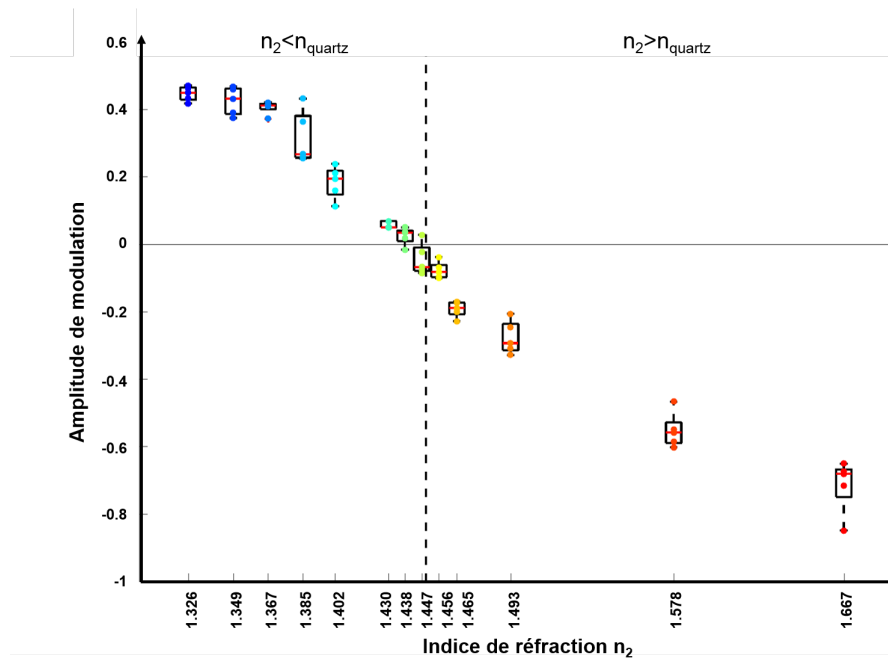


FIGURE 2.14 – Dépendance de l'amplitude de modulation avec l'indice de réfraction  $n_2$ .

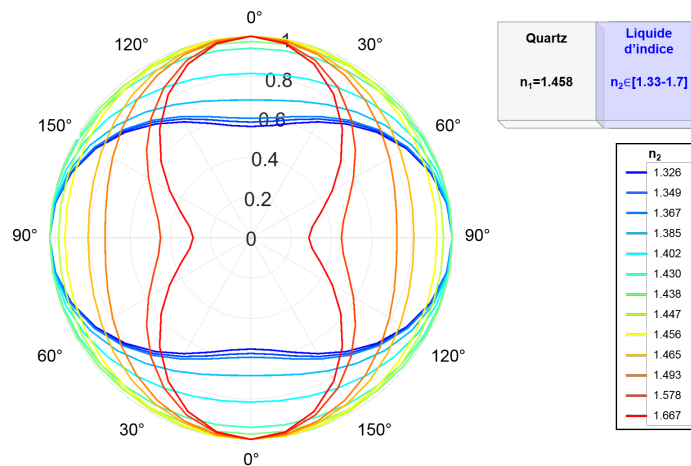


FIGURE 2.15 – Représentation de la réponse PTHG en coordonnées polaires.

Le premier résultat obtenu correspond à une **augmentation de l'amplitude de modulation avec l'augmentation de la valeur absolue du désaccord relatif**  $|n_2 - n_1|$  entre les indices de réfraction  $n_1$  et  $n_2$  du quartz et du liquide.

Le second résultat fait état d'un **basculement de l'angle  $\phi_0$  d'un facteur angulaire de  $90^\circ$  lorsque le signe du désaccord  $\Delta n = n_1 - n_2$  s'inverse**. Pour expliquer qu'on ne retrouve pas une symétrie angulaire dans la réponse PTHG, on peut faire l'hypothèse que l'amplitude du tenseur  $\chi^{(3)}$  joue un rôle prépondérant lorsque sa valeur devient grande. Ce point devra néanmoins faire l'objet d'investigations plus poussées, mais c'est un cas qui est rarement rencontré dans le cadre de l'imagerie d'échantillons biologiques.

## b) Interface verticale entre une gouttelette d'huile et un liquide d'indice

En tirant avantage de la similitude qui existe entre la géométrie sphérique et l'indice linéaire des lipides des gouttelettes d'huile et des MLVs, nous avons mené une seconde série d'imagerie PTHG sur des gouttelettes d'huile pour évaluer l'amplitude de la modulation PTHG sur un modèle isotrope analogue aux MLVs et confirmer les résultats précédents. L'intensité PTHG a ainsi été mesurée sur les interfaces verticales - situées au niveau du plan équatorial - des gouttelettes d'huile immergées dans des liquides d'indices de réfraction différents. Pour cela, des émulsions d'huile et de différents liquides ont été synthétisées en suivant le protocole détaillé dans l'encart 2.16. - **Identification des phases en présence**

### **Encart 2.11 - Protocole expérimental**

Les échantillons ont été préparés à partir d'une émulsion à base d'huile végétale et d'une solution d'indice. Les solutions d'indices ont été préparées en suivant le même protocole que celles utilisées avec les interfaces de quartz, en mélangeant un volume de TDE pur avec de l'eau distillée pour atteindre les indices souhaités. Pour maintenir les gouttelettes en suspension, les liquides de TDE ont été mélangés à de l'agarose à basse température de fusion.

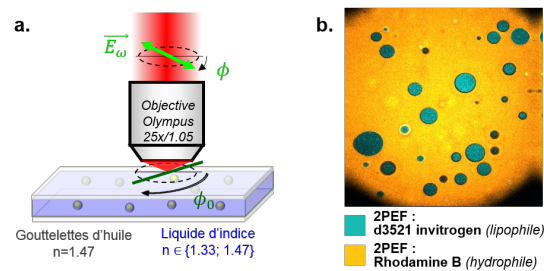


FIGURE 2.16 – a. Dispositif expérimental d'imagerie PTHG sur une interface verticale entre une gouttelette d'huile et un liquide d'indice. b. Identification des deux phases en contraste 2PEF de l'émulsion des deux phases.

Préalablement à l'imagerie des interfaces verticales des gouttelettes d'huile, nous avons cherché à vérifier les deux phases présentes dans l'émulsion. Pour cela, chaque liquide a été mélangé à un colorant fluorescent. La solution d'indice a été mélangée avec de la rhodamine B (hydrophile) et l'huile d'olive a été mélangée à un colorant *d3521 Invitrogen* (lipophile). La solution a ensuite été imagée en contraste 2PEF successivement avec une longueur d'excitation  $\lambda_{exc} = 1110 \text{ nm}$  et  $\lambda_{exc} = 930 \text{ nm}$  en collectant successivement avec un filtre à 590/20 et à 525/50. La superposition des deux contrastes - présentée sur la figure 2.16 - indique que les gouttelettes (en bleu) correspondent à l'huile tandis que le milieu environnant correspond au milieu d'indice.

### - Dépendance de la modulation PTHG avec le désaccord d'indices

Nous retrouvons ici une dépendance de la modulation PTHG  $M$  et de l'angle  $\phi_0$  similaire au cas des interfaces quartz-liquides. La figure 2.17 présente les amplitudes de modulation PTHG obtenues pour les indices. On observe ici encore que **l'amplitude de la modulation PTHG est d'autant plus grande que le désaccord d'indice  $|n_1 - n_2|$  entre les deux milieux est élevé**. Par ailleurs, on remarque ici aussi un basculement d'un facteur  $90^\circ$  de la phase  $\phi_0$  lorsque  $n_2 > n_1$ .

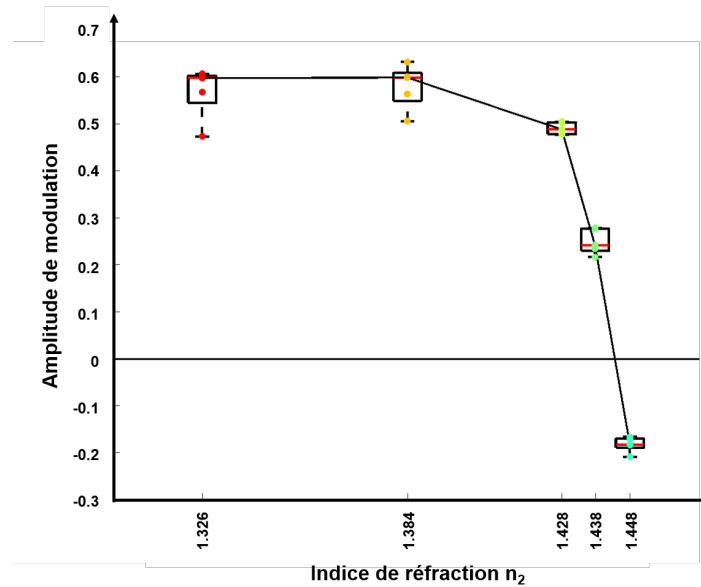


FIGURE 2.17 – Evolution de la modulation PTHG mesurée sur les interfaces verticales des gouttelettes d'huile en fonction de l'indice du milieu environnant.

#### - Discussion sur les résultats expérimentaux obtenus sur les gouttelettes d'huile

La similarité entre les résultats obtenus sur des interfaces verticales quartz-liquide et huile-liquide valide le comportement de la modulation avec le désaccord d'indice  $|n_1 - n_2|$  ainsi que le basculement de la phase  $\phi_0$  d'un facteur  $90^\circ$  lorsque  $n_2 > n_1$ .

#### c) Influence de l'ouverture numérique

Au cours d'une troisième série d'expériences, nous avons cherché à évaluer l'influence de l'ouverture numérique conjointement à l'effet du désaccord d'indices  $\Delta n = n_1 - n_2$  sur l'amplitude de modulation PTHG mesurée. Les mesures de la modulation PTHG sur les gouttelettes d'huile ont été réalisées pour les objectifs  $10\times$  et  $60\times$ .

On observe une diminution de l'amplitude de modulation PTHG lorsqu'on diminue l'ouverture numérique.

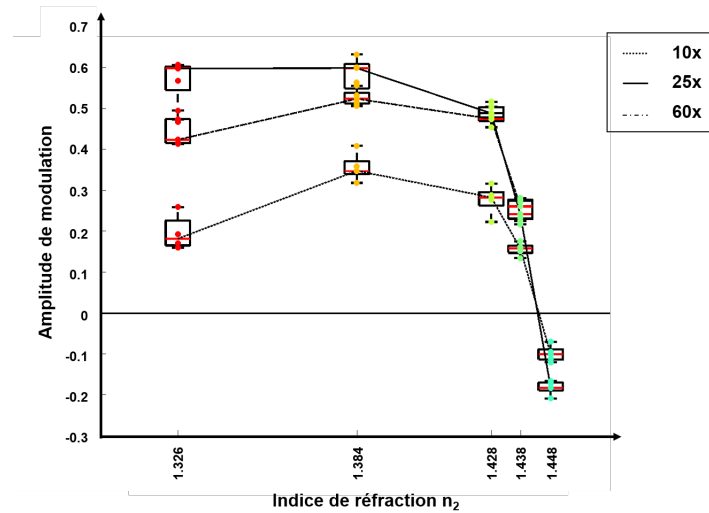


FIGURE 2.18 – Evolution de la modulation PTHG mesurée sur les interfaces verticales des gouttelettes d’huile en fonction de l’indice du milieu environnant et de l’ouverture numérique de l’objectif.

#### d) Conclusion

Dans cette partie expérimentale, nous avons mis en évidence **l’influence du désaccord d’indice entre les deux matériaux isotropes sur l’amplitude de modulation PTHG** mesurée au niveau de l’interface verticale entre ces deux milieux : l’amplitude de la modulation est d’autant plus grande que le désaccord d’indice est élevé et s’annule lorsque les deux milieux ont le même indice.

Par ailleurs, nous avons montré que l’amplitude de modulation PTHG sur l’interface verticale entre une gouttelette d’huile et de l’eau s’élève à  $57 \pm 6 \%$ , c’est-à-dire significativement au-dessus de la valeur rapportée par Zimmerley et al. La faible modulation PTHG rapportée précédemment dans la littérature peut être imputée à l’aplatissement de la gouttelette lipidique sur la lame de verre induite par les faibles tensions superficielles entre le verre et l’eau qui ajoute une forte composante horizontale et diminue la modulation. Ici, nous avons pris soin de monter les gouttelettes dans une solution d’agarose pour maintenir leur aspect sphérique.

Enfin, nous avons montré que cette **amplitude de modulation PTHG artificielle est d’autant plus grande que l’ouverture numérique est élevée.**

### 2.3.2 Résultats numériques avec le modèle FDTD

Comme le formalisme semi-analytique présenté dans la partie II.1 ne permet pas de reproduire des effets de distorsions de champs dûs aux variations d’indices optiques linéaires, un nouveau type de simulations numériques a été mis en place en utilisant un modèle FDTD (de l’anglais *Finite-difference time-domain*). Ce modèle sera décrit dans une première sous-partie, puis nous présenterons la forme du volume focal du faisceau d’excitation au niveau d’une interface verticale et les résultats d’intensité PTHG résultant de la propagation du faisceau d’excitation sur l’interface sur un matériau avec les propriétés optiques du quartz. Ces simulations numériques ont été implémentées par Nicolas Olivier dans le but de disposer d’un formalisme permettant d’expliquer les résultats expérimentaux sur des milieux modèles et des fibres myélinisées individuelles (cf. chapitre 4).



### a) Description du modèle FDTD

Cette méthode repose sur la résolution numérique des équations de Maxwell sur un espace discrétisé : à partir d'une condition initiale  $E(x, y, z, t = 0)$  le champ électromagnétique  $E(x, y, z, t)$  est calculé sur des points régulièrement espacés (typiquement de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres) de façon séquentielle pour chaque pas de temps (d'où le nom : *time-domain*). Pour résoudre le système entre deux pas temporels, les champs à l'instant  $t$  sont calculés à partir des champs calculés aux instants précédents à l'aide d'un calcul matriciel : dans le système d'équations, les dérivées spatiales et temporelles sont remplacées à l'aide de séries de Taylor en des termes ne dépendant plus que du champ discrétisé calculé précédemment. Par exemple, la dérivée de  $E(x, y, z, t)$  selon  $t$  s'écrira :

$$\left. \frac{\partial E(x, y, z, t)}{\partial t} \right|_{t=t_n} = \frac{E(x, y, z, t_{n-1}) - E(x, y, z, t_{n-2})}{dt} \quad (2.23)$$

Le schéma numérique utilisé pour les ondes électromagnétiques est appelé « schéma de Yee », du nom de la personne ayant publié ce schéma [136]. Il repose sur la résolution alternée des champs électriques et magnétiques sur deux mailles cubiques décalées d'une demi-maille, comme illustré sur la figure 4.19, et permet une convergence numérique robuste.

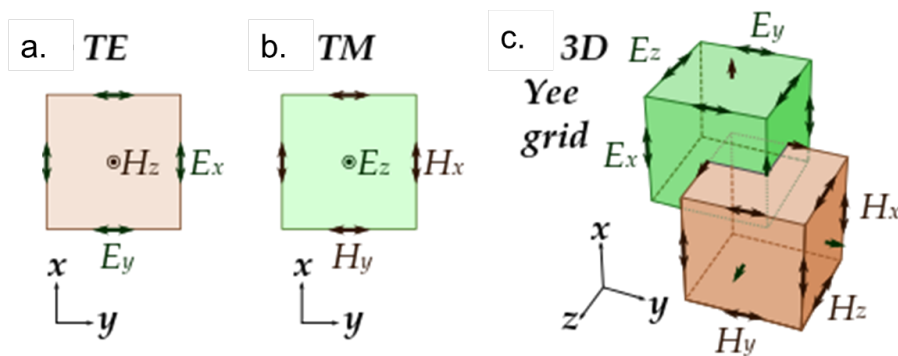


FIGURE 2.19 – Visualisation du volume focal avec le modèle FDTD.

Par comparaison avec la méthode de calcul semi-analytique basée sur les fonctions de Green, la méthode FDTD présente l'avantage considérable de prendre en compte simultanément des effets linéaires (changement d'indices) et non-linéaires (changement de  $\chi^{(3)}$ ). Cependant elle amène 2 principales complications : tout d'abord le coût numérique de la méthode est très lourd, ce qui nécessite de nombreuses heures de calcul et des volumes de simulation réduits, et d'autre part elle introduit des problèmes de convergence numérique non-triviaux au vu du nombre de paramètres du système. Afin de limiter l'influence de ces problèmes numériques, nous avons utilisé un logiciel commercial (*Lumerical FDTD*) qui possède une interface graphique relativement simple d'utilisation, un maillage automatisé ainsi qu'un contrôle facile des conditions aux limites. Cette implémentation présente néanmoins un défaut important : elle ne permet pas pour le moment de prendre en compte les termes non-diagonaux du tenseur non-linéaire. Pour les polarisations selon les axes  $x$  ou  $y$  cela ne pose pas un énorme problème vu que les termes croisés sont faibles par rapport aux termes diagonaux mais cela empêche l'utilisation d'autres polarisations et peut dans certaines géométries introduire des artefacts.

### b) Aspect du volume focal du faisceau d'excitation sur une interface verticale

Avant de présenter les résultats numériques d'intensité PTHG provenant d'une interface verticale, nous proposons de commencer par visualiser les distorsions subies par le volume focal d'excitation sur une interface verticale entre deux milieux isotropes. Pour cela, nous allons comparer les composantes de l'intensité THG générées sur deux géométries, l'une est un milieu homogène (eau) et l'autre est une interface verticale (eau/quartz) - décrites plus en détail dans l'encart 2.13.

#### **Encart 2.12 - Géométries considérées pour décrire l'aspect du volume focal**

Pour décrire l'aspect du volume focal d'excitation pour une ouverture numérique considérée est égale à 0.95, nous avons considéré deux géométries :

- un matériau décrit par l'indice optique de l'eau ( $n_1 = 1.33$ ) et une réponse THG constante  $\chi_0^{(3)} \in \mathbb{R}$
- deux matériaux de géométrie cubique accolés, l'un est possède l'indice du quartz ( $n_2 = 1.45$ ) et l'autre est décrit par un indice semblable à l'eau. Les réponses THG de ces deux matériaux sont décrites par  $\chi_0^{(3)} \in \mathbb{R}$ . Au-dessus du matériau est placé une couche de matériau avec les propriétés de l'eau de  $1.5 \mu m$  d'épaisseur.

La figure 2.20 présente les trois composantes des intensités d'excitation associées à deux polarisations d'excitation orthogonales au vecteur de propagation de l'onde, l'une perpendiculaire ( $I_{\perp}(\omega)$ ) et l'autre parallèle ( $I_{\parallel}(\omega)$ ) à l'interface, ainsi que les trois composantes de la différence des polarisations induites d'ordre 3  $\Delta \vec{P}_{NL}(3\omega) = \vec{P}_{NL,\perp}(3\omega) - \vec{P}_{NL,\parallel}(3\omega)$  où  $\vec{P}_{NL} = \vec{E}(\omega) |\vec{E}(\omega)|^2$ . La figure 2.20.a décrit les profils d'intensités  $I_{\perp}(\omega)$ ,  $I_{\parallel}(\omega)$  et  $\Delta \vec{P}_{NL}(3\omega)$  dans de l'eau, et la figure 2.20.b décrit ces profils sur une interface verticale entre de l'eau et du quartz à  $6.5 \mu m$  de profondeur sous la surface horizontale. Dans l'eau, on retrouve ici l'aspect des composantes du champ d'excitation calculées avec le modèle semi-analytique, avec un lobe pour la composante principale, un quadrant pour la composante perpendiculaire à l'orientation principale de la polarisation, et deux lobes pour la composante axiale. En revanche, on observe que les composantes de l'intensité THG et de la polarisation induite sont fortement modifiées par la présence de l'interface verticale.

La figure 2.21 présente les projections de la composante de l'intensité  $I_x(\omega)$  du champ d'excitation dans les plans  $(xy)$ ,  $(xz)$  et  $(yz)$ . On remarque une forte asymétrie du volume focal focalisé sur une interface verticale (b), en comparaison avec le milieu isotrope (eau, a).

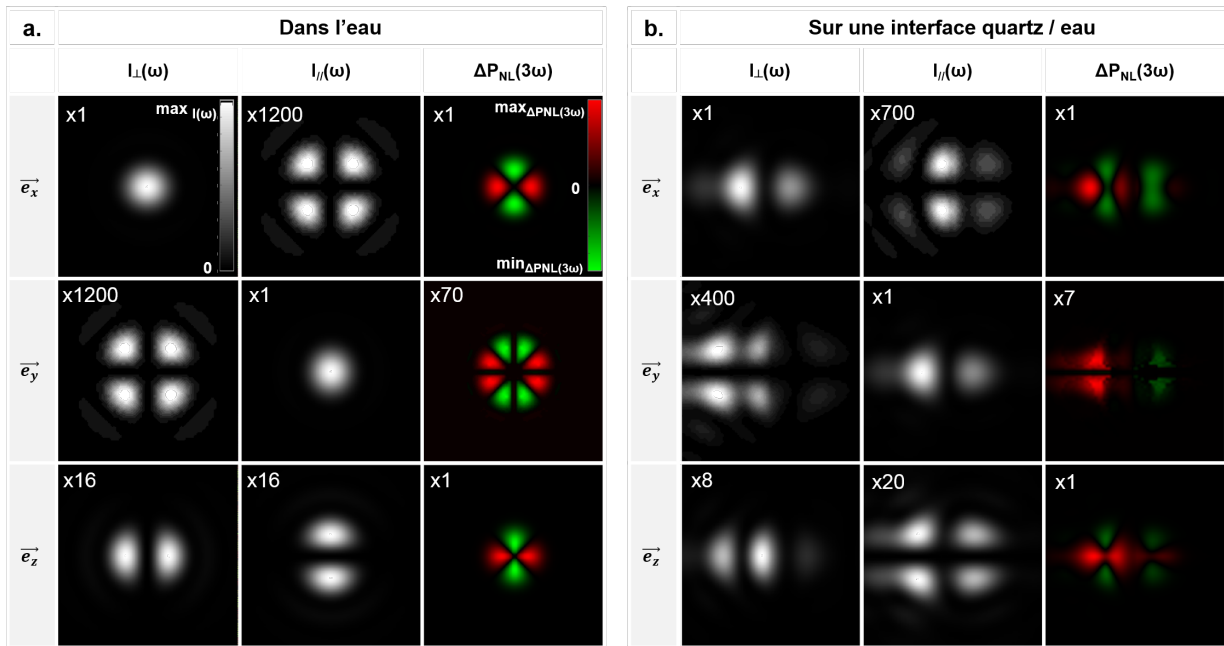


FIGURE 2.20 – Aspect du volume focal du faisceau d'excitation sur une interface verticale.

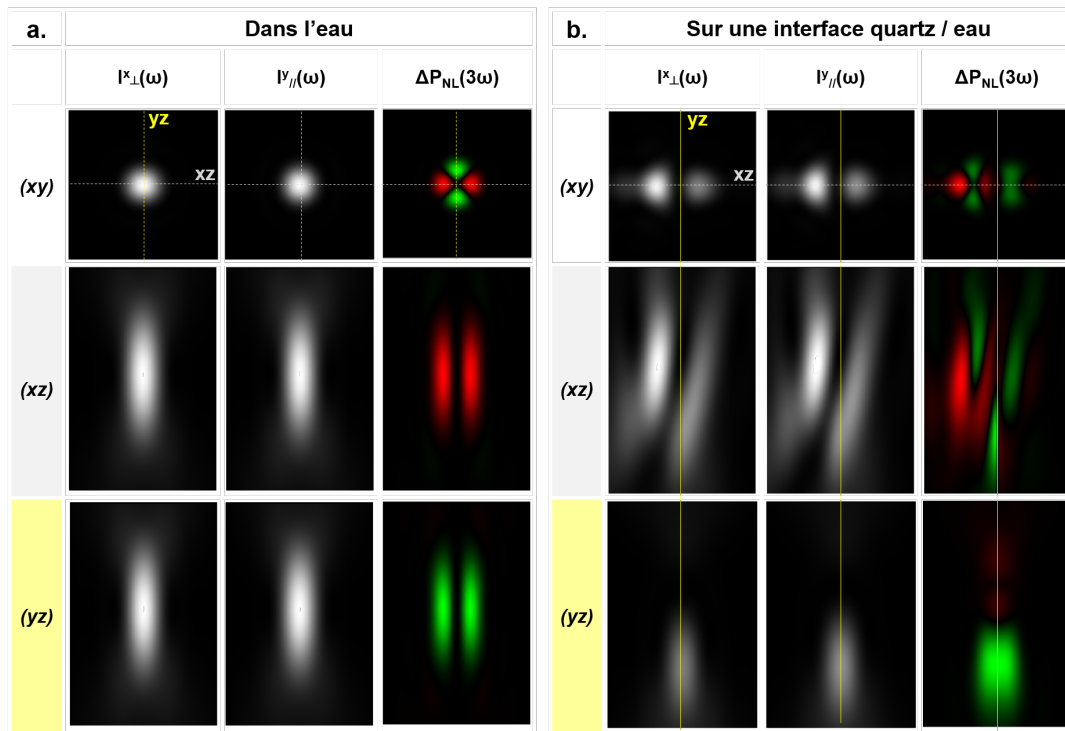


FIGURE 2.21 – Aspect du volume focal du faisceau d'excitation sur une interface verticale.

### c) Résultats des simulations FDTD sur des interfaces verticales

Dans ce paragraphe, nous nous intéressons plus précisément à la réponse PTHG calculée numériquement au voisinage d'interfaces verticales dans les conditions décrites dans l'encart 2.13. Les profils d'intensité THG ont été calculés lorsque le volume focal du faisceau d'excitation traverse l'interface, à la fois pour une polarisation d'excitation orthogonale ( $\perp$ ) et parallèle à

l'interface ( $\parallel$ ) qui correspondent aux intensités THG extrémales. Ces profils ont été moyennés respectivement sur  $2 \mu m$  et  $4 \mu m$  suivant l'axe orthogonal à l'interface pour reproduire l'opération de traitement des données expérimentales où l'on moyenne le signal THG sur un domaine de quelques microns de largeur. Le profil de modulation PTHG associé a ensuite été déduit des deux profils ( $I_{\perp}^{THG}$ ,  $I_{\parallel}^{THG}$ ) en utilisant la relation  $[sgn(I_{\perp, max}^{THG} - I_{\parallel, max}^{THG})] (I_{max}^{THG} - I_{min}^{THG}) / I_{max}^{THG}$ . La même simulation a été reproduite dans 5 conditions où le matériau 2 présente des propriétés optiques ( $n_2$  et  $\chi_2^{(3)}$ ) similaires à celles des expériences. Les résultats sont présentés sur la figure 2.22 et décrits ci-dessous.

**Encart 2.13 - Géométrie considérée dans les simulations FDTD**

Pour étudier numériquement l'effet du désaccord d'indice linéaire sur la réponse PTHG au voisinage d'une interface verticale, nous avons considéré la géométrie d'une interface verticale entre un bloc dont les propriétés optiques sont semblables à celles du quartz ( $n_1 = 1.45$  et  $\chi_1^{(3)} = 2.000$ ) et un bloc dont les propriétés optiques ( $n_2$  et  $\chi_2^{(3)}$ ) sont décrites ci-dessous :

Liquides	$n_2$ $\lambda_{exc} = 589.3 \text{ nm}$	fraction	$n_2$ $\lambda_{exc} = 1100 \text{ nm}$	$\chi_2^{(3)}$
1	1.3335	1.0000	1.3234	1.680
2	1.3800	0.7402	1.3675	2.283
3	1.4192	0.5240	1.4042	2.784
4	1.4697	0.2454	1.4515	3.431
5	1.5142	0.0000	1.4932	4.0000

Au-dessus du matériau est placé une couche de matériau avec les propriétés de l'eau de  $0.5 \mu m$  d'épaisseur. Les mesures sont réalisées à  $6 \mu m$  de profondeur.

Similairement aux résultats expérimentaux, les simulations numériques confirment que la valeur de modulation PTHG augmente lorsque la différence d'indice linéaire  $n_2 - n_1$  entre les deux matériaux augmente et confirment l'inversion de la polarisation qui maximise l'intensité THG lorsque le signe du désaccord d'indice s'inverse. Ces valeurs de modulation obtenues numériquement (courbes bleues sur la figure quasi-quantitatif avec les valeurs expérimentales (courbe rouge) sur la plage d'indices  $n_2 = [1.34 - 1.49]$ . En revanche, la modulation PTHG calculée pour  $n_2 = 1.32$  donne une valeur inattendue qui nécessitera un ajustement des paramètres de la simulation numérique en vue d'obtenir un accord quantitatif entre les résultats expérimentaux et numériques.

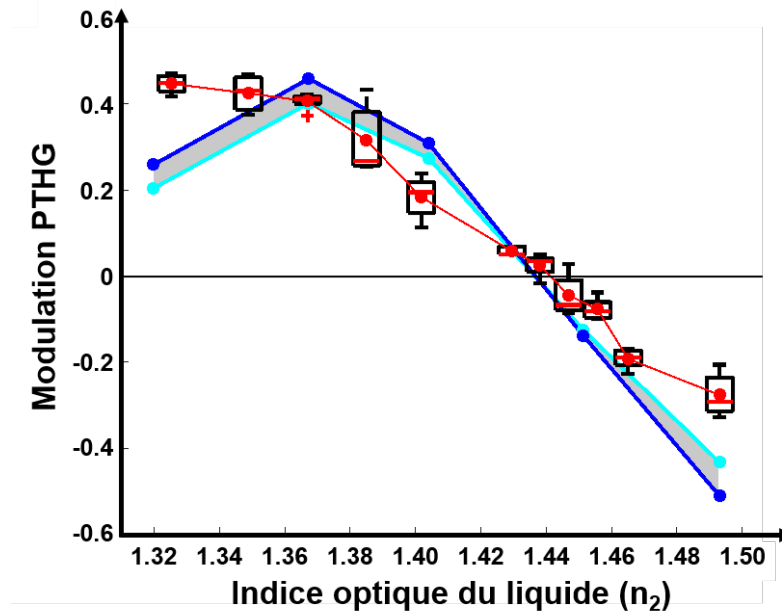


FIGURE 2.22 – Evolution de la modulation PTHG sur une interface verticale de quartz en fonction de l'indice du milieu extérieur.

#### d) Discussion sur les résultats des simulations présentés

Les simulations réalisées ont permis de décrire pour la première fois dans le contexte de la microscopie non-linéaire cohérente les distorsions subies par le volume focal à la propagation sur une interface verticale entre deux matériaux d'indices linéaires différents. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que les trois composantes du champ d'excitation subissent de **fortes distorsions** qui contribuent à l'**anisotropie de la polarisation non-linéaire induite sur l'interface**.

En résumé, la modulation PTHG observée entre des milieux isotropes possède 3 origines :

- (i) l'absence de symétrie cylindrique du champ d'excitation autour de l'axe  $z$  (cf. figure 2.20.a)
- (ii) l'absence de symétrie cylindrique de la polarisation induite au niveau d'une interface verticale entre des milieux avec des  $\chi^{(3)}$  différents avec l'orientation de la polarisation d'excitation (cf. simulations avec les fonctions de *Green*, thèse de Nicolas Olivier)
- (iii) l'absence de symétrie cylindrique du champ d'excitation induite par la présence d'une interface verticale entre des milieux avec des  $n$  différents selon l'orientation de la polarisation d'excitation (cf. figure 2.20.b)

Les amplitudes de modulation PTHG évaluées numériquement sur des interfaces verticales entre deux milieux d'indices différents présentent un accord quantitatif avec les expériences. Ces résultats valident l'approche de modélisation FDTD qui est la seule à reproduire les observations. Une perspective est donc d'utiliser ces simulations pour étudier numériquement et de manière systématique l'effet combiné de la géométrie et des désaccords d'indices des structures, à la fois pour la microscopie THG et pour d'autres contrastes non-linéaires.

### 2.3.3 Conclusion : Comparaison entre les résultats expérimentaux et numériques

Jusqu'ici, la plupart des simulations du signal THG ont simplifié le problème complexe de la génération du signal THG en découplant les effets tensoriels et d'indices linéaires sur des géométries simples où le volume focal est positionné sur l'interface entre deux matériaux isotropes homogènes avec un même indice linéaire  $n$  et des susceptibilités non-linéaires  $\chi^{(3)}$  distincts [130], [133]. Cependant une grande majorité des interfaces séparent des milieux d'indices différents, et le fort signal THG qui provient des interfaces eau-huile présente un fort désaccord d'indice. De manière expérimentale et numérique, nous avons montré l'importance des effets de désaccord des indices optiques linéaires des matériaux sur le signal PTHG mesuré sur l'interface verticale. En particulier, une forte composante de la modulation PTHG est d'autant plus grande que le désaccord d'indices entre les matériaux est élevé. La concordance entre les résultats expérimentaux et numériques réalisés dans des conditions similaires valide le modèle utilisé. Les simulations numériques ont montré que le volume focal est fortement affecté par la traversée d'une interface verticale.

Ce travail met en évidence la nécessité de prendre en compte ces effets dans les simulations qui visent à décrire la réponse THG à une polarisation d'excitation linéaire.

Plus fondamentalement, le contraste en microscopie THG a parfois été décrit comme une imagerie « passe-haut », mettant en avant les fortes variations spatiales des propriétés optiques comme sur les interfaces et les hétérogénéités. On peut aujourd'hui généraliser que ce contraste revêt aussi le rôle de « détecteur d'aberrations » ou de micro-distorsions du volume focal.

## 2.4 Caractérisation de l'ordre lipidique dans des structures organisées

Après avoir réévalué la contribution des désaccords d'indices sur la réponse THG polarimétrique sur des interfaces verticales (lipide/eau) pour un faisceau focalisé par un objectif d'ouverture numérique  $NA = 1.05$ , nous avons cherché à déterminer la **contribution de l'ordre lipidique sur la modulation PTHG**.

### 2.4.1 Résultats expérimentaux sur des vésicules lipidiques multilamellaires

Pour estimer cette seconde contribution, nous avons réalisé des acquisitions PTHG dans le plan équatorial de vésicules multilamellaires (MLVs) préparées suivant le protocole détaillé dans l'encart 2.14.

La modulation PTHG sur les MLVs a été estimée par moyennage des valeurs de modulation sur deux domaines situés sur l'interface verticale, l'un sur l'interface du haut de l'image, et l'autre sur la droite. Nous avons obtenu une modulation moyenne de  $72 \pm 3\%$  ( $N = 5$ ) qui dépasse celle sur les interfaces des gouttelettes d'huile dans de l'eau. Cette différence de modulation PTHG montre que la **capacité à détecter l'ordre lipidique dans des structures organisées** est confirmée malgré la réévaluation de la modulation artefactuelle sur des structures isotropes.

Nous avons ensuite essayé de modifier l'indice du milieu environnant des MLVs en diluant la solution contenant les MLVs avec des concentrations de TDE variables mais les MLVs présentent



**Encart 2.14 - Protocole de synthèse des MLVs**

Les vésicules lipidiques multilamellaires ont été synthétisés à partir du protocole suivant adapté de la méthode par hydratation des couches lipidiques décrite par Bangham [137]. Un volume de  $200 \mu\text{L}$  d'une solution de DMPC (1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine) (*Avanti Polar Lipids, AL, USA* de concentration  $25 \text{ mg/mL}$  a été versée dans un ballon de  $10 \text{ mL}$ , puis distillé pendant une heure avec un évaporateur rotatif. Immédiatement après, le ballon a été placé sous vide sous un dessiccateur à vide où il a été laissé pendant une nuit pour enlever le solvant de chloroforme dans sa totalité. Le film lipidique ainsi formé sur les parois du ballon a ensuite été hydraté en ajoutant  $2 \text{ mL}$  d'une solution tampon d'Hepes à  $15 \text{ mM}$  ( $\text{pH} = 7.4$  atteinte par dilution d'une solution mère ( $1 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 7.0 - 7.6$  H 0887 *Sigma-Aldrich, Missouri, USA* avec de l'eau distillée et placée dans un bain d'eau à  $38^\circ$  pendant une heure. Une agitation douce du ballon décolle les bicouches de lipides des parois pour former les MLVs. Une gouttelette de cette solution est déposée entre une lame de verre et une lamelle pour l'imagerie. Les acquisitions sont ici réalisées à la température environnante  $20^\circ$  (inférieure à la température de transition de phase des lipides).

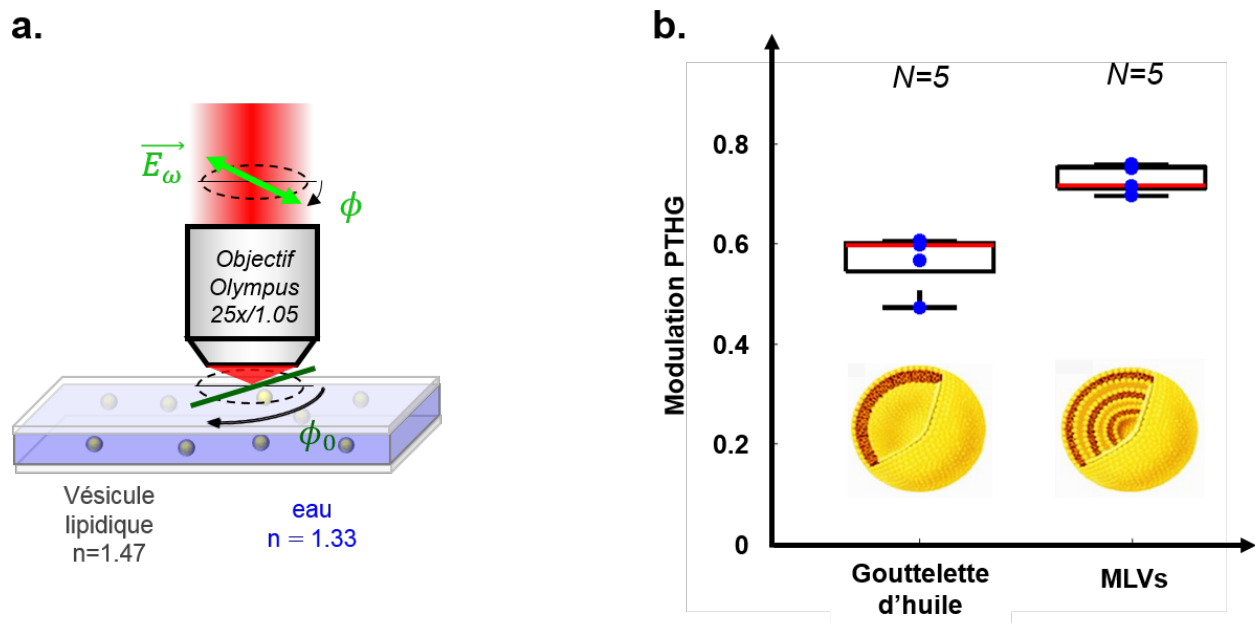


FIGURE 2.23 – Contribution de l'ordre lipidique sur la modulation PTHG. a. Dispositif expérimental. b. Comparaison des amplitudes de modulation PTHG sur l'interface d'une gouttelette d'huile et d'une MLVs.

des défauts structurels visibles sur les images THG avec du signal émergent des interfaces internes. On peut imputer ces défauts structurels à des perturbations dans les forces de surface des MLVs.

## 2.4.2 Estimation de la contribution de l'ordre lipidique

Compte tenu du fait que le signal PTHG issu de l'interface verticale de gouttelettes lipidiques isotropes et des MLVs suit la même dépendance  $A + B \cdot \cos^2(\phi - \phi_0)$  avec un maximum pour une modulation PTHG évaluée sur l'interface dans un milieu aqueux ( $57 \pm 6 \%$ ), on peut en déduire l'amplitude de la modulation PTHG induite par l'ordre lipidique :

$$M_{\text{ordre moléculaire}} = M_{MLVs} - M_{\text{gouttelette lipidique}} \quad (2.24)$$

On trouve  $M_{\text{ordre moléculaire}} \simeq 15 \%$ .

## 2.4.3 Conclusion

Nous avons retrouvé une amplitude de modulation PTHG ( $72 \pm 3 \%$ ) sur l'interface des MLVs proche de celle estimée par Zimmerley et al. ( $73 \pm 7.5 \%$ ). En comparant cette modulation avec la modulation artefactuelle sur des gouttelettes d'huile (modèle isotrope) estimée à  $57 \pm 6 \%$ , cette surmodulation - bien qu'elle soit plus faible qu'escomptée - contient bien une **information sur l'ordre lipidique**.

Dans la pratique, dès que la modulation PTHG mesurée sur une interface verticale entre un milieu lipidique et un milieu environnant aqueux dépasse le seuil de  $60 \%$ , elle rend compte de l'anisotropie du matériau.

## 2.5 Effets d'interfaces

Dans cette partie, nous décrivons des **effets qui affectent le signal THG et potentiellement les autres signaux multiphotons au voisinage d'interfaces verticales**, et qui n'ont pas encore fait l'objet d'études systématiques dans la littérature.

### 2.5.1 Dédoubléments d'interfaces

Un **dédoublement du pic THG** a été observé expérimentalement et numériquement au niveau d'interfaces verticales entre des matériaux avec des indices linéaires très différents lorsque le faisceau d'excitation se propage sur quelques microns le long de l'interface (cf. figure 2.24). En effet, sur une interface verticale entre un bloc de quartz et de l'eau, on observe que le signal THG principal s'écarte de l'interface et qu'un signal THG plus faible apparaît vers l'intérieur du quartz (cf. figure 2.24.a). La carte de modulation PTHG transverse calculée à partir des acquisitions polarimétriques indique que la modulation atteint des valeurs élevées et varie en fonction de la profondeur sur ces deux domaines. De plus, la polarisation d'excitation qui maximise les signaux THG observés sur l'interface est orthogonale à l'interface (de couleur cyan sur la carte angulaire).

De manière similaire, la simulation numérique réalisée dans des conditions identiques aux expériences fait apparaître ce même dédoublement du pic THG (cf. figure 2.24.b). Le profil THG selon l'axe  $x$  présenté ici correspond à un faisceau d'excitation focalisé à  $6 \mu m$  sous la surface horizontale supérieure. On peut également remarquer que la modulation PTHG présente des valeurs distinctes sur les deux pics.

Un aspect important qui doit attirer notre attention est que les maxima des signaux ne sont

plus situés précisément au niveau de l'interface (cf. figure 2.24.b), ce qui induit un biais dans la localisation de l'interface à partir du contraste THG.

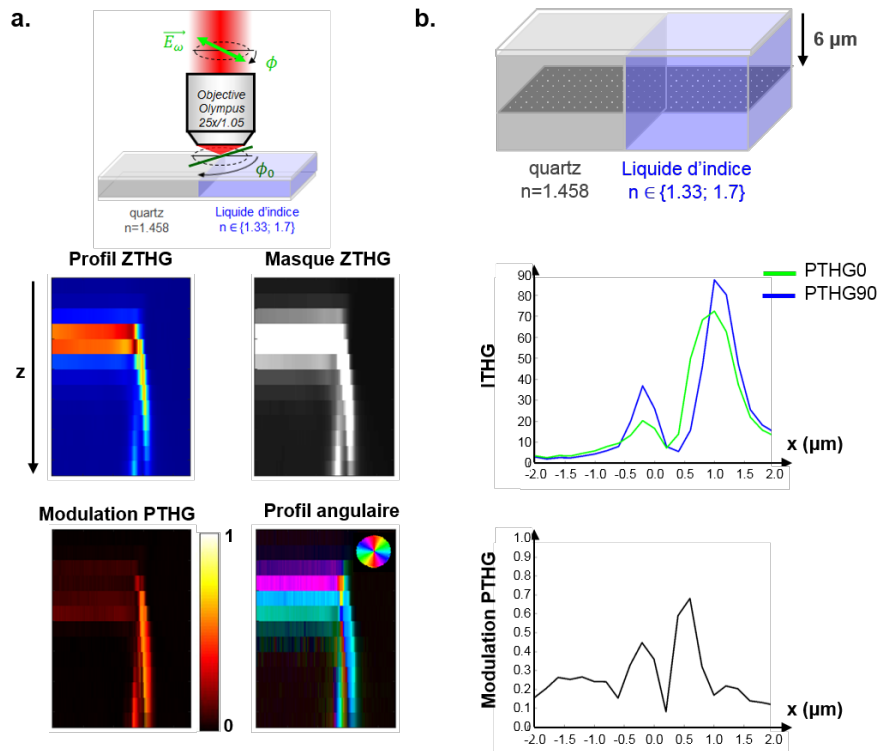


FIGURE 2.24 – Dédoublage du signal THG sur une interface verticale quartz/eau. a. Schéma du dispositif expérimental. Cartes ( $xz$ ) du signal THG, du masque utilisé, de la modulation PTHG et de l'angle  $\phi_0$ . b. Profil du signal THG calculé numériquement lorsque le volume focal traverse l'interface verticale le long de l'axe ( $x$ ) à  $6 \mu m$  de profondeur sous l'interface horizontale supérieure.

### 2.5.2 Localisation des signaux THG et 2PEF au voisinage d'une interface verticale

De même que les désaccords d'indices linéaires affectent le signal THG au niveau d'interfaces verticales, l'ensemble des signaux multiphotons sont potentiellement affectés par des effets similaires. De récentes expériences d'acquisitions séquentielles des signaux THG et 2PEF sur une interface verticale entre du quartz et de l'eau avec un colorant (fluorescéine) montrent en effet que le signal 2PEF détecté s'éloigne de l'interface verticale lorsque le faisceau d'excitation se propage sur plusieurs dizaines de microns.

De nouvelles mesures systématiques confrontées à des simulations numériques modélisant des signaux non-linéaires (THG, 2PEF, CARS notamment) permettront d'estimer les erreurs d'estimation dans la localisation des interfaces.

## 2.6 Résumé du chapitre 2

Dans ce chapitre 2, nous avons présenté plusieurs résultats importants pour la microscopie THG résolue en polarisation :

- un **formalisme analytique généralisé** qui décrit la réponse THG résolue en polarisation dans le volume et sur les interfaces de matériaux biologiques anisotropes
- une caractérisation expérimentale et numérique (avec une nouvelle approche de simulations par différences finies) de l'**influence du désaccord d'indice linéaire** sur le signal PTHG émergeant d'**interfaces verticales entre des milieux isotropes**. Cette étude a permis de mettre en évidence un type d'artefact largement ignoré dans la littérature sur la microscopie non-linéaire polarisée : le volume focal subit de **fortes distorsions au voisinage d'une interface verticale** entre des milieux d'indices optiques différents. Ces distorsions sont à l'origine d'une **modulation artefactuelle de la réponse PTHG**.
- une évaluation expérimentale de la **contribution de l'ordre moléculaire** sur la modulation de la réponse PTHG observée au niveau d'une interface verticale d'un milieu anisotrope. Les deux derniers points de cette étude visent à faire une **interprétation quantitative des données PTHG** en tenant compte de la géométrie.

Parmi les perspectives de cette étude, une série d'expériences en contraste THG polarimétrique sur des biominéraux (calculs rénaux, otolithes, etc.) prochainement achevées vont tirer profit du formalisme présenté pour identifier la nature/ l'orientation des biocristaux.

De nouvelles simulations permettront d'évaluer le signal PTHG sur **différentes géométries d'échantillons isotropes**. Pour simuler l'anisotropie des milieux, il faudrait implémenter des tenseurs non-diagonaux dans les propriétés des matériaux, ce qui n'est pas possible avec le logiciel de simulations actuellement utilisé.

L'ajout éventuel d'un **système d'imagerie par réflectance confocale** (sensible uniquement aux effets d'indices linéaires) sur le microscope THG permettrait de découpler les effets d'indices linéaires et de susceptibilité non-linéaire  $\chi^{(3)}$ .

## Chapitre 3

# Microscopie THG polarimétrique rapide pour l'imagerie *in vivo*

## Sommaire

<b>3.1</b>	<b>Choix du dispositif d'imagerie PTHG rapide</b>	<b>84</b>
<b>3.2</b>	<b>Intégration d'un système de commutation rapide de la polarisation dans le microscope</b>	<b>88</b>
<b>3.3</b>	<b>Développement d'un système d'acquisition XPY</b>	<b>101</b>
<b>3.4</b>	<b>Calibration des modalités de commutation PTHG et C-L-THG</b>	<b>103</b>
<b>3.5</b>	<b>Analyse de l'ordre moléculaire de structures biologiques</b>	<b>105</b>
<b>3.6</b>	<b>Détection <i>in vivo</i> des domaines biréfringents dans les matériaux biologiques</b>	<b>117</b>
<b>3.7</b>	<b>Conclusion du chapitre 3</b>	<b>123</b>



---

Nous avons vu dans le chapitre précédent que la dépendance du signal THG avec la polarisation d'excitation permet d'extraire efficacement l'**ordre moléculaire** et l'**anisotropie de matériaux organisés**. Du fait de la résolution temporelle limitée des dispositifs PTHG classiques, la microscopie PTHG a été utilisée jusqu'ici pour l'imagerie d'**échantillons inorganiques immobiles** en science des matériaux (cristaux liquides nématiques [126]) et d'**échantillons biologiques faiblement dynamiques** (spicules larvaires d'oursins [128], vésicules multilamellaires à température ambiante [133], chromoplastes de carottes oranges [138], vésicules lipidiques dans des cellules de mammifères [139]).

Cependant, les structures biologiques imagées dans leur environnement physiologique présentent fréquemment un **caractère fortement dynamique** caractérisé par un déplacement, une déformation et/ou un changement structural de l'ordre moléculaire à une échelle temporelle inférieure à la seconde. Compte tenu de la résolution temporelle du dispositif d'imagerie PTHG actuel - limitée à quelques secondes - l'imagerie de ces échantillons en contraste PTHG induit nécessairement des **artefacts de mouvement** qui compromettent l'extraction de leurs caractéristiques structurales.

Pour être capable d'extraire des propriétés d'anisotropie, d'ordre et d'orientation moléculaires sur ces échantillons biologiques dynamiques avec une précision submicrométrique en s'affranchissant des artefacts de mouvement, il est impératif de disposer d'un dispositif dont la résolution temporelle est inférieure à la dynamique des échantillons. La nouvelle **modalité de contraste THG polarimétrique rapide** que nous avons développée permet de gagner deux ordres de grandeur sur la résolution temporelle par rapport au système précédent pour atteindre une résolution de l'ordre de la **dizaine de millisecondes** à l'échelle d'un pixel. Elle repose sur la combinaison d'un **dispositif de commutation rapide de la polarisation d'excitation** réalisée avec un modulateur électro-optique (EOM) et d'un **nouveau mode d'acquisition des images** où la polarisation est commutée entre chaque balayage sur les lignes. La résolution temporelle correspond donc ici à l'intervalle de temps qui s'écoule entre l'acquisition du signal pour une première et une dernière polarisation sur un même pixel. Cette modalité ouvre ainsi un nouveau champ d'applications pour l'imagerie PTHG *in vivo* sur des échantillons biologiques.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons spécifiquement à deux types de structures biologiques dont les dynamiques de déformation rendent difficiles leur caractérisation : d'une part, des particules précurseurs des otolithes qui se déplacent dans la cavité de l'oreille interne des poissons-zèbres avec une vitesse entre 1 et 50  $\mu\text{m/s}$  [140], et d'autre part, des vésicules lipidiques multilamellaires (MLVs) qui se déforment dans des intervalles de temps inférieurs à la seconde lorsqu'elles sont soumises à une transition de phase induite par un échauffement.

Dans un premier temps, nous allons exposer les raisons qui nous ont conduits à mettre en œuvre cette **stratégie** et la manière dont elle se positionne par rapport aux autres approches décrites dans la littérature. Ensuite, nous décrivons précisément les étapes successives de l'implémentation de la configuration optique intégrant un modulateur électro-optique pour contrôler la **commutation rapide entre des états de polarisation incidents linéaires**. Enfin, nous présentons le principe de fonctionnement du **nouveau système d'acquisition XPY** et la **calibration du mode d'imagerie rapide PTHG** (commutation entre des états linéaires) et celle d'un second mode **C-L-THG** (commutation entre des états linéaires et circulaires) obtenu sans peine à partir du premier mode.

Dans un second temps, nous présentons deux catégories d'applications qui tirent pleinement profit du développement technique de cette nouvelle modalité d'imagerie PTHG rapide. La première consiste à **détecter l'ordre moléculaire sur des structures biologiques dynamiques**. A cet effet, nous avons mis au point une **nouvelle méthodologie pour extraire l'ordre moléculaire** - qui repose sur le calcul des coefficients de Fourier en chaque pixel de l'image en intensité THG résolue en polarisation. Cette application a été illustrée par la mesure de la désorganisation moléculaire sur des structures lipidiques induite par une transition de phase, puis par la détection de la nature cristalline des particules d'otolithe qui flottent dans l'oreille interne de l'embryon de poisson-zèbre.

La seconde catégorie d'applications vise à **détecter des microstructures biréfringentes dans des échantillons biologiques dynamiques**. Nous avons caractérisé la sensibilité de notre système sur des échantillons modèles présentant des degrés divers d'anisotropie (gouttelettes d'huile, otolithe, MLVs), puis nous avons montré la capacité de notre système à détecter *in vivo* des vésicules biréfringentes dans les cellules intestinales du ver *c-elegans*.

## 3.1 Choix du dispositif d'imagerie PTHG rapide

Avant de discuter du choix du dispositif que nous avons développé pour améliorer la résolution temporelle de la microscopie THG polarimétrique, nous proposons un bref état de l'art des dispositifs décrits dans la littérature pour commuter la polarisation en microscopie multiphotonique, et notamment pour la microscopie par génération de seconde harmonique.

### 3.1.1 Etat de l'art des dispositifs de commutation de la polarisation utilisés en microscopie multiphotonique

De nombreuses approches ont été présentées pour commuter la polarisation, depuis le système classique de rotation d'une lame demi-onde jusqu'à des systèmes innovants qui utilisent des modulateurs à cristaux liquides ou des modulateurs électro-optiques pour améliorer la résolution temporelle des acquisitions polarimétriques dans le but d'imager des tissus *in vivo*.

#### - Dispositif d'imagerie PTHG classique « lente »

Le dispositif d'imagerie PTHG classique - similaire à celui rapporté dans [74] - est celui qui a été utilisé jusqu'à présent pour réaliser des acquisitions PTHG. Il repose sur la combinaison d'une rotation des états de polarisation réalisée grâce à une lame demi-onde montée sur un système de rotation mécanique inséré au niveau de la pupille avant de l'objectif, avec un mode d'acquisition XYP - où une image est acquise pour chaque orientation de la polarisation d'excitation. La résolution temporelle d'une acquisition PTHG dépend ici de la durée d'acquisition des images (de l'ordre d'une centaine de millisecondes dans des conditions standards) et de la durée de commutation de la polarisation réalisée par les moteurs (de l'ordre de quelques dizaines de milliseconde en incluant un temps de commande, un temps de rotation et un temps de stabilisation). Une acquisition PTHG typique réalisée avec ce dispositif dure plusieurs secondes pendant lesquelles l'échantillon peut bouger ou se déformer. Il faut également considérer le bruit mécanique introduit par les moteurs dans le microscope qui peut venir perturber les acquisitions.

### - Intégration d'un modulateur optique à cristaux liquides

Lien et al. [141] ont montré que l'utilisation d'un modulateur optique à cristaux liquides suivi d'une lame quart-d'onde est adéquate pour contrôler précisément l'angle de la polarisation d'excitation pour la microscopie PSHG. Ce dispositif permet de faire tourner plus rapidement (environ 30  $ms$  pour un pas de  $10^\circ$ ) et plus précisément la polarisation qu'un contrôle manuel ou motorisé de la polarisation grâce à son contrôle en tension. L'ajout d'une seconde quart-d'onde permet également d'obtenir des états de polarisation circulaires gauche et droite, ce qui n'est pas possible avec une lame demi-onde unique.

### - Utilisation d'un modulateur électro-optique

Pour améliorer la résolution temporelle des acquisitions résolues en polarisation, Stoller et al. [142] ont proposé en 2002 un nouveau dispositif d'imagerie PSHG innovant qui permet de tourner continûment et rapidement la direction de la polarisation incidente grâce à la combinaison d'un EOM dont la tension est modulée à haute fréquence (4  $kHz$ ) et d'une lame quart-d'onde statique. Les deux premières harmoniques du signal SHG modulé à la fréquence de l'EOM - enregistrées via deux systèmes de détection synchrones - permettent ensuite de remonter aux propriétés optiques des matériaux.

On peut noter que le temps de réponse des EOM - de l'ordre de la microseconde à la dizaine de microsecondes - est bien plus rapide que celui des deux dispositifs de commutation de la polarisation précédents. De plus, contrairement aux modulateurs à cristaux liquides qui nécessitent une calibration de l'angle de rotation avec la tension appliquée, la réponse de l'EOM est linéaire avec la tension appliquée.

Un système similaire a également été implémenté pour les imageries CARS et SRS résolues en polarisation par l'équipe de S. Brasselet [143]. Ce dispositif combine un modulateur électro-optique et un modulateur acousto-optique qui viennent moduler - respectivement - la polarisation et l'intensité du faisceau de pompe pour sonder les propriétés d'ordre et d'orientation de molécules spécifiques dans des structures qui se déforment à une échelle temporelle inférieure à la seconde. La résolution temporelle sur chaque pixel rapportée est ici de 50  $\mu s$ .

DeWalt et al. ont présenté le système d'ellipsométrie *NOSE* (de l'anglais *Nonlinear Optical Stokes Ellipsometry*) pour la microscopie SHG qui permet de retrouver les observables dépendantes de la polarisation sur des structures cristallines à une cadence vidéo (résolution temporelle de 150  $ns$  sur chaque pixel) grâce à une modulation de la polarisation à 8  $MHz$  réalisée avec un EOM, un balayage rapide et une détection par numérisation synchrone. [144]

Une autre variante de ce dispositif a été proposée par Tanaka et al. pour s'adapter à une détection par comptage de photons. Leur système commute d'un état de polarisation horizontale à un état vertical sur chaque pixel grâce à un modulateur électro-optique pour accéder à une résolution temporelle de 122  $\mu s$  sur chaque pixel. [145]

### - Combinaison de deux modulateurs électro-optiques indépendants

Une nouvelle méthode de contrôle rapide de la polarisation permettant de générer l'ensemble des états de polarisation de la lumière (linéaires, circulaires et elliptiques de n'importe quelle ellipticité et orientation) a été rapportée par Kaneshiro et al. [146]. Elle repose sur l'implémentation de deux modulateurs électro-optiques successifs indépendants avec des orientations différentes de leurs axes principaux. L'avantage d'un tel système est de générer tous les états possibles de la polarisation et de compenser directement le retard de phase éventuellement introduit par les éléments optiques, cependant il est davantage complexe, coûteux et nécessite un espace suffisant pour être installé.

### 3.1.2 Discussion sur la stratégie à adopter

#### - Choix du dispositif de commutation

Pour obtenir une résolution temporelle sur chaque pixel qui soit de l'ordre de la dizaine de millisecondes, il faut pouvoir commuter les états de polarisations à l'échelle de la dizaine de microsecondes, ce qui est possible grâce à l'implémentation d'un modulateur électro-optique. De plus, la configuration proposée par Stoller et al. [142] est adéquate pour commuter entre des états de polarisation linéaires, sans toutefois introduire des facteurs de complexité inutiles dans notre microscope.

#### - Choix du mode d'acquisition

Comme notre microscope actuel ne dispose pas d'un système d'acquisition rapide d'images avec une détection synchrone mais d'une détection numérique avec des photomultiplicateurs à comptage de photons, un temps élémentaire est nécessaire pour collecter l'intensité sur chaque pixel pour une polarisation donnée. Nous avons donc cherché à adapter notre mode d'acquisition à ce nouvel outil de commutation rapide de la polarisation.

Trois modes d'acquisitions sont possibles :

- (i) commutation de la polarisation entre la collection d'intensité sur un même pixel (mode d'acquisition PXY)
- (ii) commutation de la polarisation entre l'imagerie des lignes (mode d'acquisition XPY)
- (iii) commutation de la polarisation entre l'acquisition des images (mode d'acquisition XYP)

Dans le choix du mode d'acquisition, nous avons cherché à optimiser la **résolution temporelle** (temps écoulé entre les mesures d'intensité THG sur un pixel pour la première polarisation et pour la dernière polarisation) sans dégrader la **durée totale de l'acquisition de la pile d'images résolues en polarisation**. Pour cela, nous avons estimé les durées de ces deux grandeurs pour chacun des 3 modes. Nous avons également comparé ces temps avec ceux de notre dispositif motorisé actuel qui fonctionne avec un mode d'acquisition XYP. A titre indicatif, le moteur de rotation actuel de la lame demi-onde a une vitesse de 55 tours par minute, c'est-à-dire qu'il faut une dizaine de millisecondes pour faire tourner la lame demi-onde de  $5^\circ$ , et donc la polarisation de  $10^\circ$ . Il faut ajouter à ce temps de commutation un temps de stabilisation de l'asservissement - estimé à plusieurs dizaines de millisecondes supplémentaires - ce qui totalise une durée d'environ 100 *ms*.

Nous présentons dans les tableaux suivants les temps caractéristiques calculés pour deux acquisitions typiques où la durée d'acquisition par pixel pour une polarisation donnée est de 10  $\mu s$  (fréquence de balayage de 100 *kHz* nécessaire pour obtenir un SNR convenable sur les images THG). Le premier cas correspond à une acquisition de  $25 \times 50$  pixels réalisée pour 4 polarisations, et le second à une acquisition sur  $100 \times 100$  pixels avec 18 polarisations. Le temps de retour à la ligne estimé correspond à la moitié du temps de balayage d'une ligne acquise sans commutation de la polarisation. La durée de commutation de la polarisation avec l'EOM a été évaluée à 10  $\mu s$ .

Modes	Résolution temporelle (ms)	Durée de l'acquisition (s)
mode XYP + lame d'onde motorisée	195	0.2
mode XYP + EOM	56	0.1
mode XPY + EOM	1.12	0.1
mode PXY + EOM	0.08	0.1

TABLE 3.1 – Résolutions temporelles et durées totales d'acquisitions PTHG réalisées pour 4 polarisations incidentes différentes et  $25 \times 50$  pixels en utilisant le mode lent actuel ou un des 3 modes avec une commutation rapide de la polarisation entre les pixels (PXY), entre les lignes (XPY) ou entre les images (XYP).

Modes	Résolution temporelle (ms)	Durée de l'acquisition (s)
mode XYP + lame d'onde motorisée	3385	3.4
mode XYP + EOM	2550	2.7
mode XPY + EOM	25.5	2.7
mode PXY + EOM	0.38	4.0

TABLE 3.2 – Résolutions temporelles et durées totales d'acquisitions PTHG réalisées pour 18 polarisations incidentes différentes et  $100 \times 100$  pixels.

Une comparaison rapide des durées obtenues avec les différents dispositifs montre que la résolution temporelle est améliorée de plusieurs ordres de grandeur pour les modes PXY et XPY associés à une commutation rapide de la polarisation (EOM) par rapport au dispositif précédent qui combine un mode XYP avec un système de commutation lent (lame d'onde motorisée). Le mode PXY permet notamment de gagner un facteur 1000 et le mode XPY gagne un facteur 100 sur la résolution temporelle. On peut noter que la durée totale des acquisitions obtenue pour les dispositifs à commutation lente et rapide est quasiment identique. Dans le but de minimiser les effets importants d'absorption par le tissu induits par un éclairage continu sur un même domaine de l'échantillon, nous avons préféré l'**implémentation du mode XPY** au mode PXY, ce qui nous permet d'atteindre une résolution temporelle de l'ordre de la dizaine de millisecondes.

En définitive, nous avons choisi de combiner le dispositif optique de commutation rapide de la polarisation réalisée avec **un EOM et une lame quart-onde** avec un **mode d'acquisition XPY** où la polarisation est commutée entre le balayage des lignes pour obtenir une résolution temporelle de la dizaine de millisecondes à l'échelle du pixel. C'est également ce dispositif qui a été implémenté dans notre laboratoire pour la microscopie PSHG rapide par G. Ducourthial et M-C Schanne-Klein pour venir sonder la redistribution des fibres de collagène sur des tissus de peau de souris soumises à un étirement mécanique. [147]

## 3.2 Intégration d'un système de commutation rapide de la polarisation dans le microscope

Nous présentons dans cette seconde partie l'**intégration du dispositif de commutation rapide de la polarisation** dans notre microscope. Après avoir présenté des **éléments de compréhension généraux sur la configuration des optiques** dans ce dispositif, nous détaillons les **étapes de la mise en place du dispositif**, puis les stratégies mises en œuvre pour **optimiser la pureté des états de polarisation linéaires** au niveau de la pupille avant de l'objectif qui se trouvent fortement déformés à la traversée des éléments optiques du système.

### 3.2.1 Principe de génération d'états de polarisation linéaires de plusieurs orientations

Nous proposons dans les paragraphes suivants quelques éléments informatifs pour comprendre le **principe de fonctionnement** d'un EOM, puis la **configuration optique** dans laquelle il a été implémenté, justifiée par une **description mathématique** et par une **description géométrique**.

#### a) Principe de fonctionnement du modulateur électro-optique

Les modulateurs électro-optiques sont utilisés pour modifier les propriétés du faisceau de lumière, telles que leur phase, leur amplitude ou leur polarisation. Le principe des EOM repose sur l'application d'un champ électrique sur un cristal placé en leur centre pour en modifier ses propriétés de biréfringence via l'introduction d'un déphasage contrôlé entre les indices de ses axes principaux. A la propagation à travers ce cristal biréfringent, les deux composantes orthogonales de la polarisation d'une onde lumineuse vont ainsi accumuler des retards différents. Un contrôle rigoureux de l'amplitude du champ électrique appliqué sur le cristal, de l'orientation des axes neutres du cristal et de l'orientation de la polarisation de l'onde lumineuse sont des paramètres clés pour ajuster les états de polarisation du faisceau à la sortie de l'EOM.

#### b) Configuration optique proposée par Stoller et al. pour commuter rapidement entre des états de polarisation linéaires

Nous nous intéressons ici plus précisément aux orientations relatives entre les axes neutres des optiques et la polarisation de la lumière pour obtenir des états de polarisation linéaires d'orientations variables. Le dispositif optique proposé par Stoller et al. repose sur l'association d'un EOM positionné entre deux lames d'onde immobiles - une demi-onde (HWP1) et une quart-d'onde (QWP1) dont les orientations sont décrites sur la figure 3.1.

La lame demi-onde permet d'orienter précisément la polarisation linéaire issue du faisceau laser collimaté à  $45^\circ$  des axes neutres de l'EOM. De cette manière, les projections de la polarisation incidente sur chacun des deux axes neutres de l'EOM dans le plan  $xy$  sont d'amplitudes égales. L'EOM qui fonctionne comme un déphaseur d'angle variable va ainsi introduire un déphasage modulable entre les deux composantes de la polarisation incidente et générer des polarisations linéaires (déphasage nul entre les deux composantes), des polarisations circulaires (déphasage de  $90^\circ$ ) et des états elliptiques intermédiaires selon la tension qui lui est appliquée.



La lame quart d'onde - placée à la sortie de l'EOM et dont les axes sont orientés à  $45^\circ$  des axes de l'EOM - corrige l'ellipticité des états de polarisation pour obtenir des états linéaires dont l'orientation varie par rapport à l'orientation incidente selon la tension appliquée à l'EOM. Par exemple, la polarisation linéaire incidente dont les composantes ne subissent pas de déphasage de la part de l'EOM (tension nulle) ressort parallèle à un des axes de la lame quart-d'onde et n'est donc pas affectée (cf. ellipse de polarisation verte sur la figure 3.1). De même, la polarisation linéaire incidente rendue circulaire (tension associée à un déphasage de  $90^\circ$  entre les axes neutres de l'EOM) ressort également linéaire après la traversée de la lame quart-d'onde (cf. ellipse de polarisation orange).

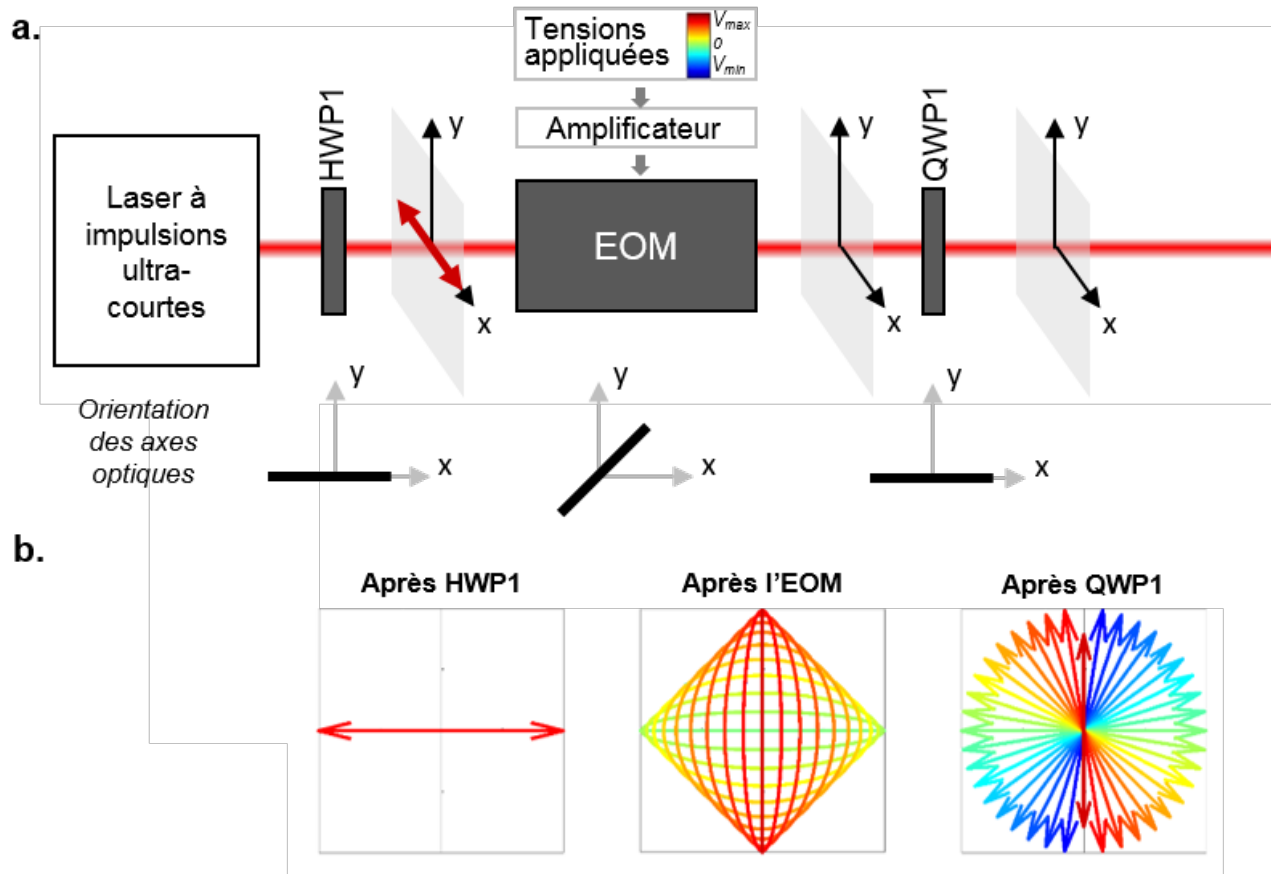


FIGURE 3.1 – a. Illustration du dispositif expérimental utilisé par Stoller et al. [142] b. Graphes des états de polarisation générés à la traversée des éléments optiques en fonction de la tension appliquée à l'EOM.

### c) Description mathématique de la commutation entre des polarisations linéaires

Pour mieux comprendre le choix des orientations relatives entre les axes neutres des optiques et la polarisation de la lumière, nous présentons ici les équations qui relient la **tension appliquée au cristal** et l'**état de polarisation généré** à la sortie du cristal en nous appuyant sur l'ouvrage de référence [73]. Le cas considéré ici est semblable à notre dispositif avec un EOM en configuration transverse doté d'un cristal *KDP* (cristal uniaxe avec une maille qui possède une symétrie hexagonale du groupe  $\bar{4}2m$ ).

### - Description des effets électro-optique dans l'EOM

Dans un premier temps, on s'intéresse ici à décrire le **déphasage induit par l'EOM sur les composantes orthogonales du champ électrique de l'onde incidente**.

En configuration transverse, l'application d'une tension entre les électrodes crée un champ électrique (selon une direction  $y'$ ) sur le cristal uniaxe (axe extraordinaire orienté selon  $y'$ ) de l'EOM selon une direction orthogonale à la direction de propagation de l'onde (suivant  $z$ ) (cf. figure 3.2.a). En conséquent, les indices optiques propres du cristal sont modifiés au premier ordre (effet Pockels) de la manière suivante (pour une dérivation complète du calcul voir [73]) (cf. figure 3.2.b) :

$$\begin{cases} n_{x'} = n_o - \frac{1}{2}n_0^3 r_{63} E_{y'} \\ n_{y'} = n_e \\ n_z = n_o + \frac{1}{2}n_0^3 r_{63} E_{y'} \end{cases} \quad (3.1)$$

Le déphasage relatif introduit entre les composantes selon  $x'$  et  $y'$  du champ électrique de l'onde incidente s'écrit à son tour :

$$\varphi = \varphi_{x'} - \varphi_{y'} = (n_{x'} - n_{y'}) \frac{2\pi L}{\lambda} = (n_o - n_e) \frac{2\pi L}{\lambda} - \frac{n_0^3 r_{63} E_{y'}}{2} \frac{2\pi L}{\lambda} \quad (3.2)$$

Le champ électrique appliqué entre les deux électrodes du cristal de largeur  $d$  s'exprime aussi :

$$E_{y'} = \frac{V}{d}$$

D'où :

$$\varphi = (n_o - n_e) \frac{2\pi L}{\lambda} - \frac{n_0^3 r_{63} V}{2d} \frac{2\pi L}{\lambda} = \varphi_0 - \frac{\pi V}{V'_\pi} \quad (3.3)$$

avec  $\varphi_0 = (n_o - n_e) \frac{2\pi L}{\lambda}$  et  $V'_\pi = \frac{d\lambda}{n_0^3 r_{63} L}$

On voit ici que le déphasage introduit par l'EOM sur les composantes orthogonales de l'onde lumineuse incidente varie linéairement avec la tension appliquée. De plus, on peut noter que la valeur de  $V'_\pi$  - qui correspond à la tension nécessaire pour induire un changement de phase de  $\pi$  - dépend inversement de la longueur  $L$  du cristal qui est relativement grande, ce qui permet de décrire l'ensemble des états de polarisation en appliquant à l'EOM des tensions relativement basses accessibles avec un amplificateur classique.

### - Action du système optique sur la polarisation incidente

Dans un second temps, nous cherchons l'équation qui relie le **déphasage introduit par l'EOM sur la polarisation avec l'état de polarisation sortant**. Pour modéliser l'action du dispositif optique sur la polarisation incidente, le formalisme de Jones offre une description vectorielle adéquate des états de polarisation (vecteurs de Jones) et de l'action de chaque composant optique (matrices de Jones) sur la polarisation.

L'onde lumineuse - supposée monochromatique et plane - se propage suivant la direction  $z$ . On considérera que sa polarisation est orientée suivant l'axe  $x$  à la sortie du laser. Son amplitude peut donc être représentée dans la base  $\mathcal{B}_0(x, y, z)$  par le vecteur :

$$J_{incident}|_{\mathcal{B}_0} \propto A_0 \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (3.4)$$

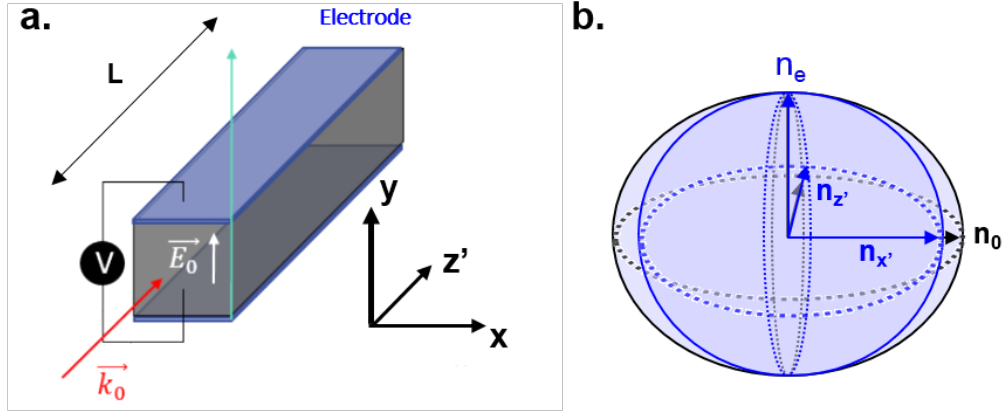


FIGURE 3.2 – a. Schéma illustratif de la propagation du faisceau lumineux à travers le cristal d'un EOM utilisé en configuration transverse. b. Modification de l'ellipsoïde des indices avec l'application d'un champ électrique selon la direction  $y$  parallèle à l'axe extraordinaire du cristal.

On suppose qu'un axe neutre de l'EOM forme un angle  $\theta_1$  avec l'axe  $x$  dans la base  $\mathcal{B}_0$  et que la lame quart-d'onde a un axe neutre incliné à  $\theta_2$  de cet axe neutre de l'EOM auquel est associé la base  $\mathcal{B}_1$ . L'amplitude du champ sortant s'écrit dans la base  $\mathcal{B}_2$  associée à la lame quart-d'onde comme un produit des matrices de Jones associées aux différents milieux optiques et de matrices de changements de repères entre les bases des éléments optiques :

$$J_{\text{sortant}}(z, t) = J_{\frac{\lambda}{4}}|_{\mathcal{B}_2} P_{\mathcal{B}_1 \rightarrow \mathcal{B}_2}^{-1} J_{EOM}|_{\mathcal{B}_1} P_{\mathcal{B}_0 \rightarrow \mathcal{B}_1}^{-1} J_{\text{incident}}|_{\mathcal{B}_0} \quad (3.5)$$

$$J_{\text{sortant}}(z, t) \propto \begin{pmatrix} -i & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \cos(\theta_2) & \sin(\theta_2) \\ -\sin(\theta_2) & \cos(\theta_2) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} e^{i\frac{\varphi}{2}} & 0 \\ 0 & e^{-i\frac{\varphi}{2}} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \cos(\theta_1) & \sin(\theta_1) \\ -\sin(\theta_1) & \cos(\theta_1) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (3.6)$$

$$J_{\text{sortant}}(z, t) \propto E_0 \begin{pmatrix} i \left[ e^{i\frac{\varphi}{2}} \cos(\theta_1) \cos(\theta_2) - e^{-i\frac{\varphi}{2}} \sin(\theta_1) \sin(\theta_2) \right] \\ e^{i\frac{\varphi}{2}} \cos(\theta_1) \sin(\theta_2) + e^{-i\frac{\varphi}{2}} \sin(\theta_1) \cos(\theta_2) \end{pmatrix} \quad (3.7)$$

Notons que l'angle  $\varphi$  est le déphasage introduit par l'EOM sur le champ électrique du faisceau lumineux. Pour que les polarisations sortantes soient linéaires pour n'importe quelle phase  $\varphi$  appliquée, il faut que les deux composantes de ce vecteur soient en phase. Une solution qui satisfait cette condition est  $\theta_1 = -\theta_2 = \frac{\pi}{4}$ , c'est-à-dire que la polarisation arrive sur l'EOM avec une incidence de  $\frac{\pi}{4}$  et que l'axe neutre de la lame quart-d'onde soit orientée à  $\frac{\pi}{4}$  des axes neutres de l'EOM. Dans ces conditions, la polarisation s'écrit dans la base  $\mathcal{B}_2$  (qui est également la base  $\mathcal{B}_0$ ) comme :

$$A_{\text{sortant}}(z, t) \propto \begin{pmatrix} \cos(\frac{\varphi}{2}) \\ -\sin(\frac{\varphi}{2}) \end{pmatrix} \quad (3.8)$$

On voit que la **polarisation sortante est linéaire** et que l'orientation de son grand axe dépend linéairement du déphasage entre les axes neutres du cristal. Par conséquent, l'**orientation de la polarisation dépend linéairement de la tension appliquée sur le cristal de l'EOM**.

#### d) Description géométrique de la commutation entre des polarisations linéaires

Nous proposons dans ce paragraphe une **description géométrique de l'effet du dispositif optique** sur la polarisation incidente. La sphère de Poincaré - qui est une représentation 3D du vecteur de Stokes (décrite dans l'encadré 3.1) - est un outil extrêmement intéressant pour visualiser l'action opérée par chaque élément optique (décrit dans l'encadré 3.2) sur un état de polarisation. Nous avons ainsi représenté sur la sphère de Poincaré l'effet des éléments optiques de notre dispositif sur la polarisation incidente. (cf. figure 3.4)

La polarisation linéaire de la lumière issue du laser est représentée sur l'équateur de la sphère de Poincaré par le point **A**. L'axe neutre de la lame demi-onde HWP1 est orienté de sorte que la lame transforme la polarisation linéaire incidente en une polarisation linéaire orientée selon la direction  $x$ . Sur la sphère de Poincaré, cet effet est représenté par une rotation d'angle  $180^\circ$  autour de son axe rapide qui transforme le **A** en un point **B** - situé à l'intersection entre l'équateur et l'axe  $S_1$ . (cf. figure 3.4.a)

L'EOM - dont les axes neutres sont orientés à  $45^\circ$  des axes  $x$  et  $y$  - agit comme un déphaseur de phase variable. Son action est représentée par une translation à la surface de la sphère de l'état de polarisation **B** le long du méridien passant par l'axe  $S_1$  jusqu'au point **C** dont le degré de longitude dépend de la tension appliquée. (cf. figure 3.4.b)

Enfin, la lame quart-d'onde placée après l'EOM dont l'axe neutre est orienté selon l'axe  $x$  corrige l'ellipticité des états de polarisation pour obtenir des polarisations linéaires. Cet effet est représenté par une rotation dans le sens direct des états de polarisation d'un angle de  $90^\circ$  autour de l'axe  $S_1$ . On peut visualiser que l'ensemble des états générés sont situés le long de l'équateur, c'est-à-dire qu'il s'agit bien d'états de polarisation linéaires. (cf. figure 3.4.c) On peut remarquer ici de manière géométrique que l'orientation du grand axe de la polarisation dépend linéairement du déphasage induit par l'EOM sur le champ électrique de la lumière.

#### e) Conclusion

Dans cette sous-partie, nous avons exposé comment l'association d'un modulateur électro-optique, d'une lame demi-onde et d'une lame quart-d'onde peut être utilisée de manière efficace pour **commuter entre des états de polarisation linéaires**.

En nous appuyant sur un formalisme mathématique et sur une description géométrique, nous avons vu que la première lame demi-onde permet d'orienter correctement la polarisation incidente par rapport aux axes de l'EOM. Ce dernier introduit de l'ellipticité sur la polarisation, tandis que la lame quart-d'onde corrige leur ellipticité pour obtenir des états linéaires.

### 3.2.2 Mise en place du système de commutation entre des polarisations linéaires

Dans cette partie, nous présentons les étapes successives de la **mise en place du dispositif optique** avec le réglage de l'orientation des optiques pour obtenir une commutation entre des états de polarisation linéaires (PTHG). Nous présentons ensuite le travail d'**optimisation de la pureté des états de polarisation au niveau de la pupille avant de l'objectif** pour corriger les distorsions induites à la traversée des optiques entre le dispositif optique et l'objectif. Nous avons également **caractérisé les déformations subies par la polarisation dans l'ensemble du champ de vue**. Enfin, nous présentons un second mode de commutation obtenu facilement à partir du premier mode pour **commuter entre des polarisations linéaires et circulaires**.

**Encart 3.1 - Représentation des états de polarisation sur la sphère de Poincaré**

Les états de polarisation de la lumière peuvent être représentés de manière géométrique sur la sphère unitaire de Poincaré par des points dont les coordonnées vectorielles sont décrites par le vecteur de Stokes :

$$S = \begin{pmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} |E_x|^2 + |E_y|^2 \\ |E_x|^2 - |E_y|^2 \\ 2\Re(E_x E_y^*) \\ -2\Im(E_x E_y^*) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} I_0 + I_{90} \\ I_0 - I_{90} \\ I_{45} - I_{135} \\ I_R - I_L \end{pmatrix} = I_{tot} \begin{pmatrix} 1 \\ \cos(2\phi)\cos(2\alpha) \\ \sin(2\phi)\cos(2\alpha) \\ \sin(2\alpha) \end{pmatrix} \quad (3.9)$$

On voit qu'il existe une relation entre l'intensité pour des composantes orthogonales de la polarisation et des paramètres qui représentent l'ellipse de polarisation ( $\phi$  : angle de l'orientation du grand axe de l'ellipse par rapport à l'axe  $x$  et  $\alpha$  : angle d'ellipticité).

La norme du vecteur - donnée par le premier coefficient - décrit le degré de polarisation de l'état : les états complètement polarisés sont représentés sur la surface de la sphère, tandis que les états partiellement polarisés sont représentés à l'intérieur de la sphère.

Les états de polarisation sont représentés en coordonnées sphérique par leur angle d'azimut ( $2\phi$ ) et leur angle d'élévation ( $2\alpha$ ), qui sont respectivement le double de l'angle formé par l'axe azimutal de l'ellipse de polarisation et le double de l'ellipticité. Par conséquent, les polarisations linéaires sont représentées sur l'équateur, notamment deux polarisations orthogonales sont représentées par des points diamétralement opposés sur l'équateur. Les polarisations circulaires sont représentées au niveau des pôles.

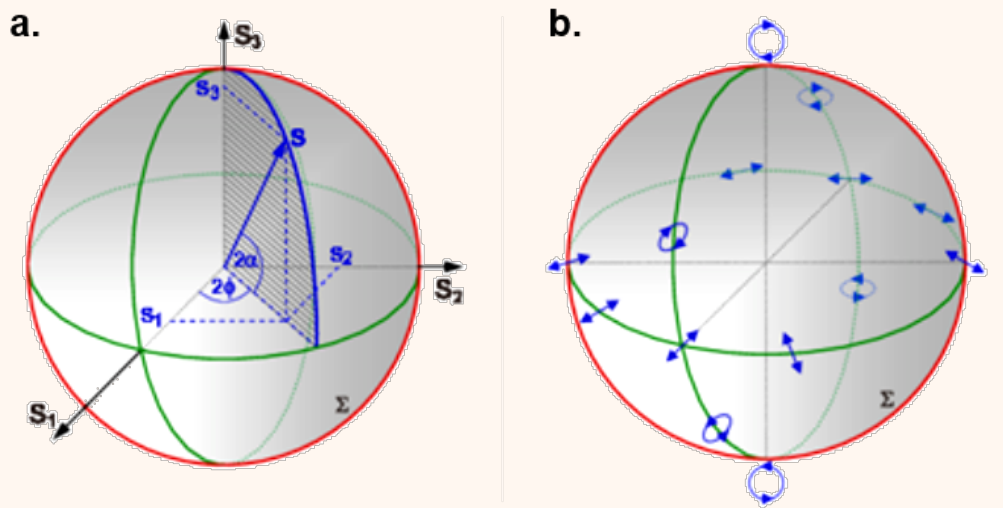


FIGURE 3.3 – Sphère de Poincaré adaptée de [148] a. Description de la correspondance entre les coefficients du vecteur de Stokes et la sphère. b. Représentation des états de polarisation sur la sphère.

**Encart 3.2 - Effets géométriques des lames d'onde sur la sphère de Poincaré**

L'action d'un milieu optique sur un état de polarisation de la lumière peut également être décrit sur la sphère de Poincaré.

Un **déphaseur** d'angle  $\phi$  opère une rotation d'angle  $\phi$  autour de son axe rapide dans le sens direct.

Les lames demi-onde et quart-d'onde sont des cas particuliers de déphaseurs :

Une **lame demi-onde** (déphaseur d'angle  $180^\circ$ ) transforme un état de polarisation en son symétrique (rotation d'angle  $180^\circ$ ) par rapport au méridien de son axe neutre.

Une **lame quart-d'onde** (déphaseur d'angle  $90^\circ$ ) fait tourner un état de polarisation de  $90^\circ$  autour de son axe rapide dans le sens direct.

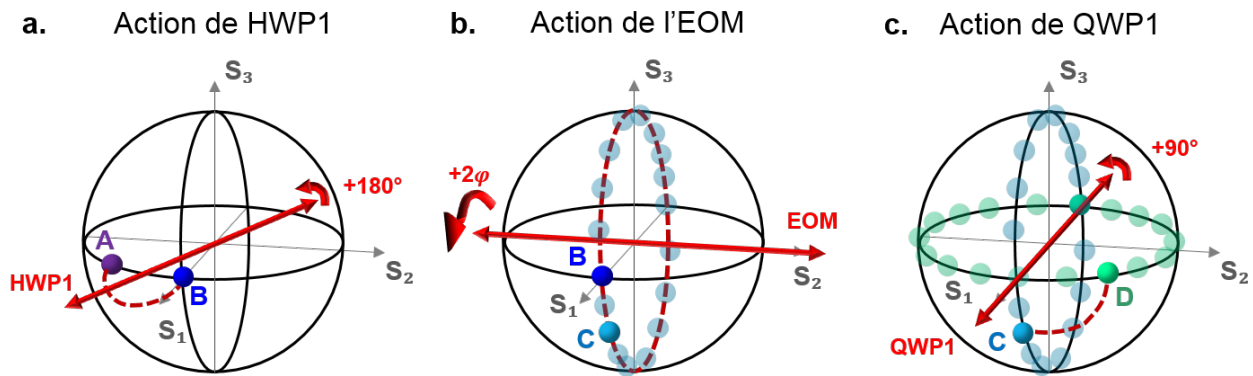


FIGURE 3.4 – Visualisation géométrique de l'effet des optiques sur la polarisation incidente. a. Représentation de l'effet de la lame demi-onde HWP1 qui transforme la polarisation **A** en une polarisation **B** linéaire orientée selon l'axe  $x$ . b. Action de l'EOM qui se comporte en déphaseur d'angle variable pour transformer la polarisation **B** en une polarisation **C** sur le méridien. c. Effet de la lame quart-d'onde QWP1 qui corrige l'ellipticité des polarisations **C** en des polarisations **D** linéaires.

### a) Mise en place du dispositif optique

Ce dispositif optique a été installé sur le microscope multiphoton à balayage point par point décrit au chapitre II. Compte tenu de la faible ouverture de l'EOM et de l'espace limité sur la table optique du microscope, il a été placé à la sortie du laser sur une nouvelle voie du set-up parallèle à la voie principale qui peut ainsi être contournée lorsqu'on veut limiter les pertes en transmission pour des acquisitions non-résolues en polarisation ou pour des acquisitions en contraste CARS où le contrôle de la longueur du chemin optique est crucial pour synchroniser les temps d'arrivées sous l'objectif des impulsions provenant des deux faisceaux. L'EOM est placé entre une lame demi-onde HWP1 et une lame quart-d'onde QWP1 comme représenté sur la figure 3.5. L'ensemble des réglages a été réalisé pour un faisceau incident à la longueur d'onde  $\lambda = 1100 \text{ nm}$  polarisé horizontalement (suivant l'axe  $x$ ).

Nous utilisons l'EOM *350-150 Conoptics, CT, USA* dont les caractéristiques sont récapitulées dans la table 3.4. Il est commandé en tension par des signaux issus de la boîte d'acquisition *I/O (National Instrument, USA)* puis amplifiés par un module amplificateur opérationnel à haute tension modulé à très haute fréquence (*302 RM, Conoptics, CT, USA*).



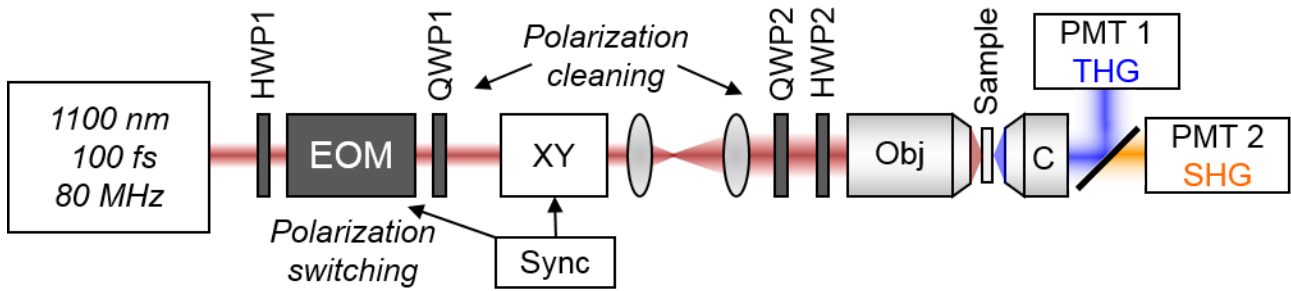


FIGURE 3.5 – Schéma du dispositif expérimental

Longueurs d'onde	entre 240 <i>nm</i> et 1100 <i>nm</i>
Configuration	transverse
Dimensions	25.4 × 25.4 × 16.2 <i>cm</i> <sup>3</sup> )
Cristal	KDP
Bande passante	$DC > 200 \text{ kHz}$
$V_{\pi}$	375 V

TABLE 3.3 – Table des caractéristiques de l'EOM 350-150 *Conoptics*.

#### - Déviation du faisceau

Pour dévier le faisceau du laser accordable depuis la voie classique vers la nouvelle voie, nous avons installé deux miroirs montés sur des montures magnétiques. Deux miroirs fixes additionnels permettent d'envoyer le faisceau à travers les deux lames d'onde et l'EOM puis de le rediriger vers la voie classique.

#### - Réglage du support de l'EOM

La première étape d'alignement a consisté à installer le support du modulateur. Le réglage des vis du support du modulateur a été réalisé de sorte à optimiser la puissance en sortie d'un tube d'alignement de petite ouverture - fourni par le constructeur *Conoptics* - installé sur la monture grâce à un puissance-mètre placé après le tube.

#### - Installation et orientation initiale des lames d'onde

Pour orienter convenablement les lames d'onde, il convient au préalable de déterminer l'orientation de leurs axes neutres par rapport à la polarisation du faisceau incident. Pour ce faire, nous avons utilisé un polariseur monté sur une platine de rotation placée devant le puissance-mètre. D'après la loi de Malus, l'extinction de la puissance est atteinte lorsque l'axe du polariseur est perpendiculaire au grand axe d'une polarisation linéaire. Nous avons orienté l'axe neutre du polariseur perpendiculairement à la direction de la polarisation incidente dans le plan d'incidence, puis nous avons placé la lame demi-onde en amont de la monture de l'EOM et l'avons tournée de sorte à obtenir un minimum de puissance après le polariseur en position fixe, ce qui signifie que l'axe neutre de la lame demi-onde est aligné avec l'axe de la polarisation incidente. Nous avons procédé de même avec la lame quart-d'onde. Nous avons ainsi aligné les axes neutres des deux lames sur la polarisation incidente qui est parallèle à l'axe  $x$ .

### - Installation de l'EOM

L'EOM a ensuite été placé dans la monture de manière à ce que les électrodes - visibles au niveau de la face d'entrée de l'EOM - soient orientées à 45° de l'horizontale. Comme ce réglage est approximatif mais qu'il est difficile d'ajuster précisément l'orientation de l'EOM, nous avons ensuite procédé à un second réglage de l'orientation des lames d'onde.

### - Réglage précis de l'orientation des lames d'onde

Pour orienter précisément la polarisation linéaire qui arrive dans l'EOM à 45° de ses axes neutres, nous avons ensuite cherché l'orientation exacte des axes neutres de l'EOM. Pour cela, nous avons orienté la lame demi-onde de sorte que la polarisation qui traverse l'EOM soit inchangée pour toutes les valeurs de tension appliquées, ce qui nous indique qu'elle est parallèle à un des axes neutres de l'EOM. Nous l'avons ensuite réorientée précisément à 22.5° de cette position. En comparaison de sa position initiale, la lame demi-onde a été tournée d'un angle correctif d'un degré dans le sens négatif et la lame quart-d'onde de deux degrés dans le sens négatif (double de la rotation de la première lame d'onde). (cf. annexe D)

### - Mesures des états de polarisation

Pour vérifier la validité de notre alignement, nous avons mesuré l'ellipticité et l'orientation des deux axes de l'ellipse de polarisation des états générés pour des tensions de contrôle entre  $-1.0\text{ V}$  et  $+1.0\text{ V}$  avec des pas incrémentiels de  $0.1\text{ V}$  (avant amplification).

L'ellipticité a été calculée comme le rapport  $\epsilon = \sqrt{\frac{I_{min}}{I_{max}}}$  où  $I_{min}$  et  $I_{max}$  sont les valeurs extrémales de l'intensité mesurée après l'analyseur rotatif. Nous avons trouvé une ellipticité résiduelle maximale de 1 % juste après la lame quart-d'onde pour l'ensemble des états de polarisation générés par les tensions discrètes appliquées à l'EOM, ce qui prouve la grande précision de notre alignement.

L'orientation du grand axe des polarisations varie linéairement entre des angles de 0° et 174° lorsque la tension appliquée balaie la plage de tensions disponibles ( $[-1\text{ V}; 1\text{ V}]$ ). Compte tenu de la résolution polarimétrique utilisée en routine pour réaliser des mesures PTHG (mesure du signal PTHG pour des orientations de la polarisation incidente tous les 10° entre 0° et 170°), la plage angulaire disponible ici est tout-à-fait satisfaisante.

Sur la première colonne de la figure 3.6, on peut visualiser le diagramme polaire de 4 états de polarisation générés juste après la lame QWP1 où l'amplitude du champ électrique de l'onde lumineuse est tracée en fonction de l'angle du polariseur.

Nous avons ensuite déterminé la pureté des polarisations générés au niveau de la pupille avant de l'objectif.

### - Caractérisation des états de polarisation sous l'objectif

Comme l'EOM est situé à l'extérieur du microscope, le faisceau se propage ensuite à travers un grand nombre d'optiques - qui sont autant de sources potentielles de distorsions de la polarisation - avant d'atteindre l'objectif. Une vérification de la pureté des états de polarisation du faisceau au niveau de la pupille avant de l'objectif est indispensable pour être en mesure de réaliser des mesures PTHG fiables.

Une caractérisation précise des états de polarisation révèle que les polarisations ont subi de fortes distorsions à la propagation ou à la réflexion sur les éléments optiques du microscope entre le contrôleur de la polarisation et la pupille avant de l'objectif. D'une part, la rotation des axes n'évolue plus parfaitement linéairement avec la tension appliquée, et d'autre part, l'ellipticité varie fortement (entre 0 % et 80 % selon les états de polarisation). (cf. colonne 2 de la figure 3.6). On remarque que la distorsion affecte principalement deux directions orthogonales,

qui provient certainement de l'alignement d'un des axes propres des éléments optiques.

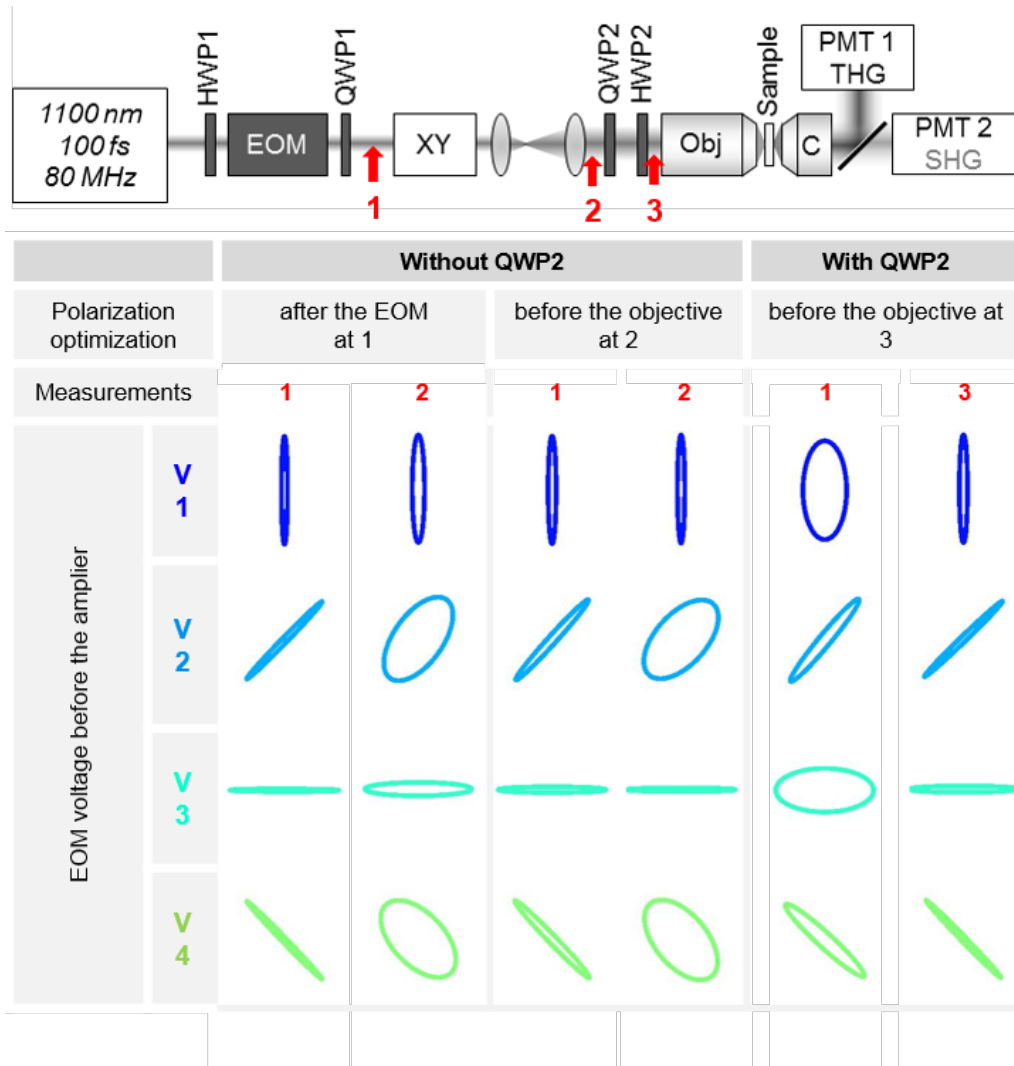


FIGURE 3.6 – Optimisation des états de polarisation d'excitation. Ellipses de polarisation de 4 états générés par 4 tensions différentes appliquées à l'EOM et mesurés à plusieurs endroits du chemin optique après optimisation de la pureté de l'ensemble des états de polarisation générés par une rampe de tension au niveau de : la première quart-d'onde après l'EOM (position 1), avant la seconde quart d'onde (position 2) et après la seconde quart d'onde (position 3).

### b) Optimisation de la pureté des états de polarisation sous l'objectif

Nous présentons dans la suite les stratégies successives que nous avons mises en œuvre pour minimiser la distorsion des états de polarisation. Comme les mesures des états de polarisation pour différentes tensions appliquées à l'EOM sont longues et répétitives, nous avons réutilisé un programme de caractérisation automatique des polarisations - créé par Guillaume Ducourthial - qui contrôle la synchronisation des commandes en tension appliquées à l'EOM, la rotation d'un polariseur (avec une précision au degré près) et l'enregistrement automatique des mesures d'intensité avec un puissance-mètre *via* un programme *Matlab*.

#### - Stratégie 1 : Identification des sources de distorsion de la polarisation

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer les optiques qui induisent de fortes

distorsions sur la polarisation. De manière prévisible (cf. [146]), les miroirs (argentiques, dichroïques et les miroirs galvanométriques) sont des sources de distorsion importantes qui introduisent plusieurs pourcents d'ellipticité à chaque réflexion / passage. Le remplacement des miroirs argentiques par de nouveaux miroirs neufs de meilleure qualité (*Miroirs IDEX PS-PM-1025-C, Melles-Griot*) n'a pas permis d'améliorer significativement la pureté des états de polarisation. Cependant, nous nous sommes aperçus que le retrait des miroirs dichroïques multicouches diélectriques qui séparent et recombinaient les voies du laser et du miroir dichroïque qui renvoie les signaux en épidétection vers les détecteurs améliore fortement la conservation des états de polarisation. Pour cette raison, nous avons modifié le chemin optique sur la table en montant les deux miroirs dichroïques sur des montures magnétiques pour pouvoir les enlever aisément pour les acquisitions polarimétriques. Nous avons également changé le miroir dichroïque en épidétection par un miroir neuf de plus faible épaisseur (*Semrock FF705-Di01-40x55*).

**- Stratégie 2 : Réorientation de la lame quart-d'onde (QWP1)**

Après le retrait des miroirs dichroïques sur la table optique et le changement de celui en épidétection, nous avons cherché une nouvelle orientation de la lame quart-d'onde placée après l'EOM (QWP1) qui permettrait d'obtenir des états de polarisation plus purs sous l'objectif. Nous ne sommes pas arrivés ici à diminuer l'ellipticité de manière significative. Les colonnes 3 et 4 de la figure 3.6 illustrent les ellipses des états de polarisation après la lame QWP1 et au niveau de la pupille avant de l'objectif après optimisation à cette dernière position.

**- Stratégie 3 : Ajout d'une seconde lame quart-d'onde avant l'objectif**

La troisième approche mise en œuvre pour obtenir des états de polarisation avec une ellipticité satisfaisante au niveau de la pupille avant de l'objectif a consisté à introduire une seconde lame quart-d'onde (QWP2) à proximité de la pupille d'entrée de l'objectif pour ajouter un degré de liberté supplémentaire à la correction de la pureté des états de polarisation.

Nous avons réalisé le réglage des lames QWP1 et QWP2 par itérations successives en mesurant l'ellipticité de la polarisation sous l'objectif pour une série de valeurs de la rampe de tension appliquées à l'EOM. Au terme de ce processus d'optimisation, nous avons obtenu une ellipticité résiduelle maximale à l'entrée de l'objectif inférieure à 6 % pour l'ensemble des polarisations générées et une excellente linéarité pour l'évolution de l'orientation du grand axe avec la tension appliquée. On peut se reporter ici à la figure 3.7 pour les graphes d'ellipticité et d'orientation de la polarisation avec la tension appliquée à l'EOM.

La première quart-d'onde (QWP1) est utilisée ici pour précompenser la distorsion induite par les optiques, tandis que la seconde (QWP2) corrige effectivement l'ellipticité des états générés par l'EOM (cf. ellipses des états de polarisation illustrées par les deux dernières colonnes de la figure 3.6).

Le tableau suivant présente les orientations des lames d'onde et la valeur d'ellipticité maximale obtenue pour l'ensemble des états de polarisation générés avant l'objectif en appliquant à l'EOM une rampe de tension dans la configuration où le seul dichroïque présent est celui en épidétection.

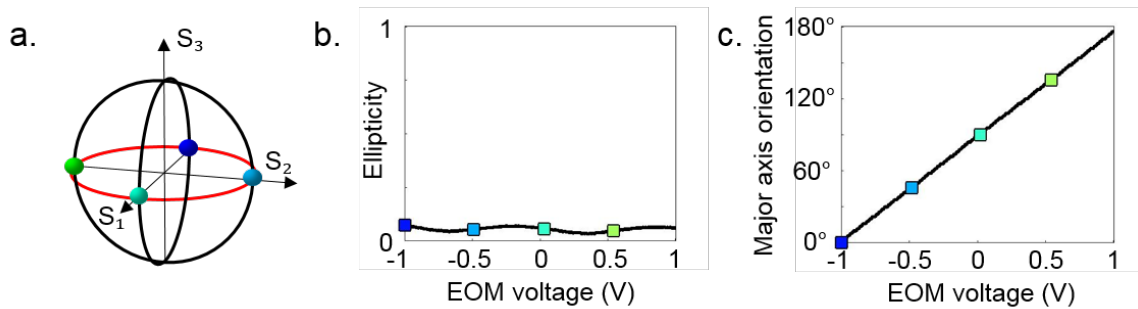


FIGURE 3.7 – Optimisation au niveau de la pupille avant de l'objectif des polarisations d'excitation utilisées pour le mode de commutation PTHG. a. Représentation de la commutation entre des états linéaires par rotation le long de l'équateur de la sphère de Poincaré. b. Graphes de l'ellipticité. c. graphe de l'orientation du grand axe de la polarisation pour des états générés en appliquant à l'EOM une rampe de tension.

Conditions	Orientations
HWP1	$-1^\circ$
QWP1	$32^\circ$
QWP2	$10^\circ$
HWP2	$30^\circ$
Ellipticité	6 %

TABLE 3.4 – Table des orientations des optiques et de l'ellipticité associée.

Pour compenser les distorsions d'ellipticité, on aurait pu également considérer la solution proposée par Belanger et al. [149] qui consiste à ajouter un dichroïque incliné à  $45^\circ$  du plan  $(xy)$ . Même si ce dispositif vise spécifiquement à corriger l'action d'un autre dichroïque, on peut s'attendre à ce que les déformations induites sur la polarisation par les optiques du set-up - qui ont en commun un axe propre - soient comparables à celle d'un dichroïque. Une seconde solution pertinente aurait été d'introduire un compensateur de Soleil-Babinet pour maintenir les états de polarisation.

En bref, grâce à l'ajout d'une seconde lame quart-d'onde (QWP2), nous avons réussi à obtenir des états de polarisation linéaires d'une grande pureté (ellipticité maximale de 6 % sur l'ensemble des états générés).

### c) Caractérisation des états de polarisation dans le champ de vue

Après avoir amélioré significativement la pureté de l'ensemble des états linéaires de polarisation au niveau de la pupille avant de l'objectif lorsque les miroirs galvanométriques sont orientés de sorte à focaliser le faisceau d'excitation au centre du champ de vue, nous avons caractérisé la **pureté des états de polarisation dans l'ensemble du champ de vue**. Pour cela, nous avons réalisé des mesures de caractérisation des états de polarisation générés au niveau de la pupille avant de l'objectif pour différentes positions du volume focal dans le champ de vue atteintes en modifiant l'orientation des miroirs galvanométriques. Nous avons ensuite interpolé les valeurs d'ellipticité résiduelle et de déviation de l'orientation du grand axe de l'ellipse par rapport à celle au centre du champ pour obtenir les cartes de ces paramètres sur le champ (cf. figure 3.8a et b).

On observe que l'ellipticité est dégradée sur les bords du champ jusqu'à atteindre 18 % et que l'orientation de la polarisation varie également de plusieurs degrés (jusqu'à 6%) entre le centre du champ et les régions extérieures. Pour réaliser des mesures de THG polarimétriques valables où les polarisations d'excitation présentent une grande pureté en terme d'ellipticité, nous avons réalisé l'ensemble des mesures sur une zone au centre du champ de dimensions  $200 \times 200 \mu m^2$ .

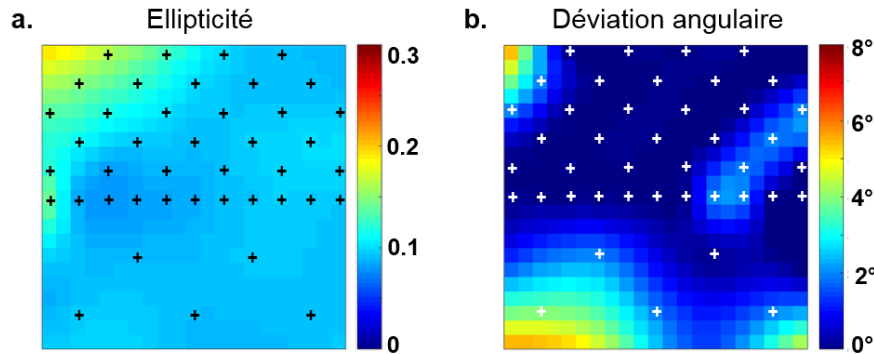


FIGURE 3.8 – Caractérisation de l'état de la polarisation dans le champ ( $700 \times 700 \mu m^2$ ). a. Mesures de l'ellipticité résiduelle dans le champ pour une polarisation incidente linéaire. b. Déviation angulaire du grand axe de l'ellipse de polarisation par rapport à celui de la polarisation au centre du champ.

#### d) Basculement du mode de commutation PTHG vers un mode C-L-THG

Il est ici utile de se souvenir qu'en l'absence de la première lame quart-d'onde, la polarisation qui sort de l'EOM décrit successivement des états linéaires, elliptiques et circulaires lorsque l'EOM est commandé par une rampe de tension. La lame QWP1 corrige à présent les déformations de la polarisation induites par les optiques entre l'EOM et la lame QWP2, tandis que la lame QWP2 corrige l'ellipticité des états de polarisation pour obtenir des états linéaires.

Une propriété intéressante que nous avons déduite est que lorsque nous orientons la lame QWP2 à  $45^\circ$  de sa position pour obtenir des états linéaires, nous retrouvons des polarisations qui décrivent successivement des états linéaire et circulaire lorsque l'EOM est soumis à une rampe de tension. Le dispositif optique permet ainsi d'obtenir **deux modalités de commutation de la polarisation** : soit la rotation d'une polarisation linéaire dans le plan transverse à l'axe de propagation (mode PTHG) soit une succession d'états de polarisation intermédiaires entre une polarisation linéaire et circulaire (mode C-L-THG).

Cette seconde modalité de commutation C-L-THG peut être représentée par un déplacement de l'état de polarisation le long d'un méridien à la surface de la sphère de Poincaré (cf. figure 3.9). On observe sur le graphe d'ellipticité présenté qu'elle varie quasi-linéairement et périodiquement entre 99 % - associée à une polarisation circulaire - et 6 % - pour la polarisation linéaire sur la plage de tensions appliquées à l'EOM. Le grand axe de l'ellipse de polarisation possède une orientation constante sur deux segments de tensions distincts et la différence angulaire entre ces deux orientations est égale à  $90^\circ$ . De manière plus explicite, cette configuration permet de passer **alternativement entre deux polarisations circulaires (l'une gauche et l'autre droite) et deux polarisations linéaires orthogonales**.



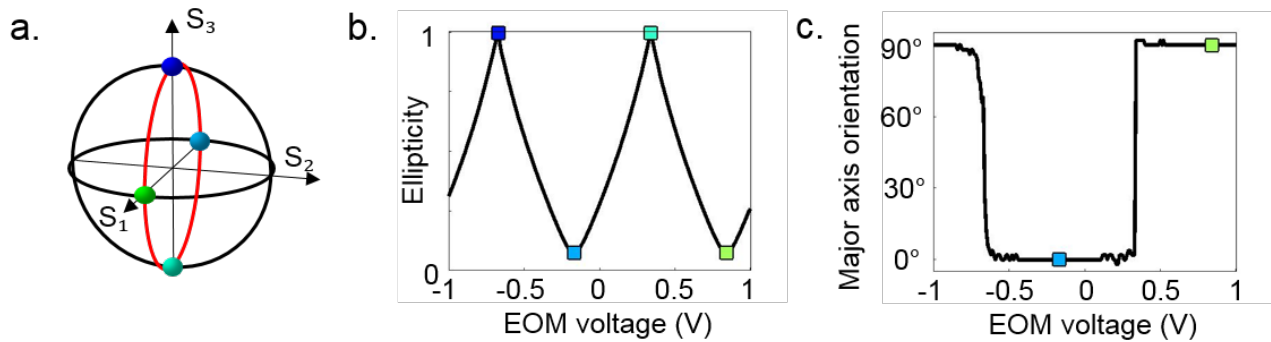


FIGURE 3.9 – Description des polarisations d'excitation utilisées pour le mode de commutation C-L-THG. a. Représentation de la commutation entre des états circulaires et linéaires par un déplacement le long d'un méridien de la sphère de Poincaré. b. Variations de l'ellipticité entre 6 % et 99 % lorsque la tension appliquée à l'EOM varie sur la plage disponible. c. Basculement de l'orientation du grand axe de la polarisation entre deux positions orthogonales pour une certaine valeur de tension.

### 3.2.3 Conclusion

Dans cette partie, nous avons présenté les étapes successives de la **mise en place du dispositif optique** avec le réglage de l'orientation des optiques pour obtenir une commutation entre des états de polarisation linéaires (PTHG). Nous avons ensuite expliqué le travail d'**optimisation de la pureté des états de polarisation au niveau de la pupille avant de l'objectif** pour corriger les distorsions induites à la traversée des optiques entre le dispositif optique et l'objectif. Nous avons également présenté une **caractérisation des déformations subies par la polarisation dans l'ensemble du champ de vue**. Enfin, nous avons présenté un second mode de commutation qui permet de **commuter facilement entre des polarisations linéaires et circulaires** à partir du premier mode.

## 3.3 Développement d'un système d'acquisition XPY

Pour rappel, la stratégie du nouveau système d'acquisition PTHG rapide s'appuie sur la capacité à commuter rapidement entre des états de polarisation pour être en mesure d'acquérir des images polarimétriques où la rotation de la polarisation s'effectue entre le balayage des lignes. Dans cette partie, nous allons décrire ce nouveau **système d'acquisition (XPY)** qui consiste à balayer chaque ligne autant de fois qu'il y a d'états de polarisation avant de balayer la ligne suivante.

### 3.3.1 Implémentation de l'acquisition XPY

Pour implémenter le mode d'acquisition XPY, nous avons réutilisé et modifié un programme *Labview* écrit par G. Ducourthial pour la microscopie PSHG rapide. Ce programme synchronise le **contrôle de la tension envoyée à l'EOM**, les **tensions envoyées aux miroirs galvanométriques X et Y** et la **collection des signaux au niveau des PMTs** par l'intermédiaire d'une carte d'acquisition *I/O* (*National Instrument, USA*).

A l'aide des chronogrammes présentés sur la figure 3.10, nous allons décrire précisément la procédure d'acquisition de données. Une première ligne est balayée en appliquant une tension linéaire  $x$  sur le miroir galvanométrique en  $X$  pour une première polarisation incidente fixée (tension constante  $P_1$  appliquée à l'EOM) et pour une position fixe du miroir galvanométrique  $Y$  (tension constante  $y_1$ ). Pendant le retour à la ligne du miroir galvanométrique  $X$ , la polarisation incidente est commutée en appliquant une seconde tension  $P_2$  à l'EOM. La même ligne est ensuite balayée une seconde fois pour cette seconde polarisation, et ainsi de suite pour l'ensemble des polarisations. Pendant ce temps, l'intensité est collectée par un PMT et enregistrée sur la première ligne d'une matrice de dimensions  $N_{colonnes} \times N_p$  (nombre de colonnes  $\times$  nombre d'états de polarisation) par  $N_{lignes}$  (nombre de lignes). Au terme de l'imagerie de cette première ligne, une seconde ligne est imagée similairement en appliquant une seconde tension constante  $y_2$  au miroir galvanométrique en  $Y$ , les mesures d'intensité sont stockées dans la seconde ligne de la matrice. Et ainsi de suite pour l'imagerie des autres lignes de l'image.

A posteriori, on vient redécouper cette grande matrice pour récupérer une pile de  $N_p$  images de dimensions  $N_{lignes} \times N_{colonnes}$ , associées chacune à un état de polarisation.

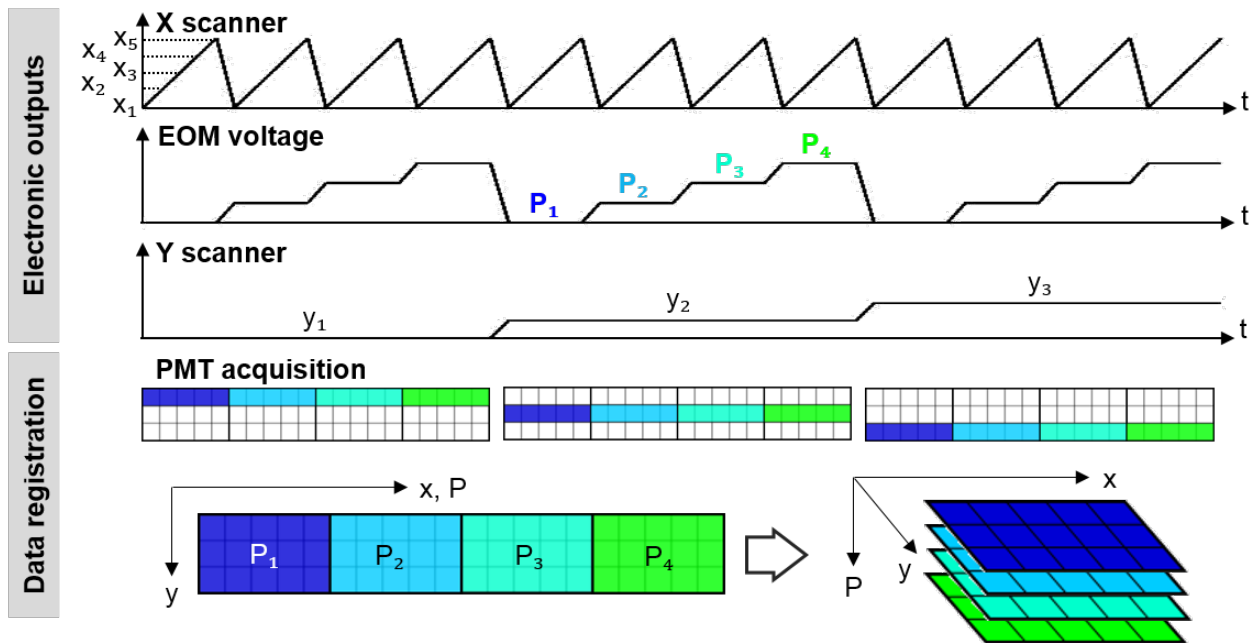


FIGURE 3.10 – Chronogrammes des signaux envoyés aux miroirs galvanométriques ( $X$  et  $Y$ ) et à l'EOM. Schéma de la collection des signaux harmoniques avec le mode d'acquisition XPY.

### 3.3.2 Discussion sur la résolution temporelle

La résolution temporelle de la mesure polarimétrique est ici calculée comme la durée qui s'écoule entre l'imagerie d'un pixel pour un premier état de polarisation de l'excitation et l'imagerie de ce même pixel pour le dernier état de polarisation. Comme nous l'avons déjà discuté dans la première partie de ce chapitre, la résolution temporelle de ce nouveau mode d'acquisition correspond à la durée pour imaginer  $(N_p - 1)$  fois la même ligne. Par exemple, dans le cas typique d'une ligne de 400 pixels avec  $5 \mu s$  d'acquisition par pixel et en incluant le retour à la ligne, cela prend  $8 ms$  pour sonder 4 états de polarisation ou  $36 ms$  pour sonder 18 états de polarisation. Nous sommes donc parvenus à gagner un facteur 100 sur la résolution temporelle.

## 3.4 Calibration des modalités de commutation PTHG et C-L-THG

Préalablement à l'imagerie des échantillons en contrastes PTHG et/ou C-L-THG, une calibration du système est indispensable pour **déterminer la référence de la polarisation d'excitation** et pour **corriger la dépendance de l'intensité d'excitation avec la polarisation**.

### 3.4.1 Méthode

La présence de deux systèmes de détection en transmission permet d'acquérir simultanément les signaux SHG et THG. Nous avons utilisé la dépendance du signal SHG sur les grains d'amidon pour calibrer la référence de l'orientation de la polarisation linéaire [150]. Cette calibration a été effectuée en ajustant l'orientation de la lame demi-onde HWP2 avant l'objectif de sorte à orienter la polarisation incidente parallèlement à l'axe  $y$  vertical dans le plan d'imagerie. Les imageries PTHG, C-L-THG, PSHG et C-L-SHG réalisées dans le plan équatorial des grains d'amidon offrent également une illustration intuitive des deux modes de commutation de la polarisation de notre système.

#### ***Encart 3.3 - Propriétés optiques des grains d'amidon de pommes de terre***

Les grains d'amidon (fécules) imagés - extraits de tubercules de pommes de terre - proviennent d'une préparation achetée dans le commerce. A l'échelle macroscopique, ils présentent l'aspect d'une poudre blanche. A l'échelle microscopique, les grains d'amidon individuels ont un diamètre entre 10 et 35  $\mu m$  et une forme arrondie. Leur structure moléculaire présente des couches concentriques - d'épaisseurs entre 120 et 400  $\mu m$  - de nature cristallines et semi-cristallines formées par l'agencement des molécules d'amylopectine (65 %) et d'amylose (20 %). Il a été rapporté que les grains d'amidon présentent une forte réponse SHG [151] liée à l'agencement des molécules d'amylopectine en une structure non-centrosymétrique (symétrie  $6mm$  hexagonale) [152]. La biréfringence positive des grains d'amidon est également révélée par la présence de croix Maltaises en microscopie optique polarisée.

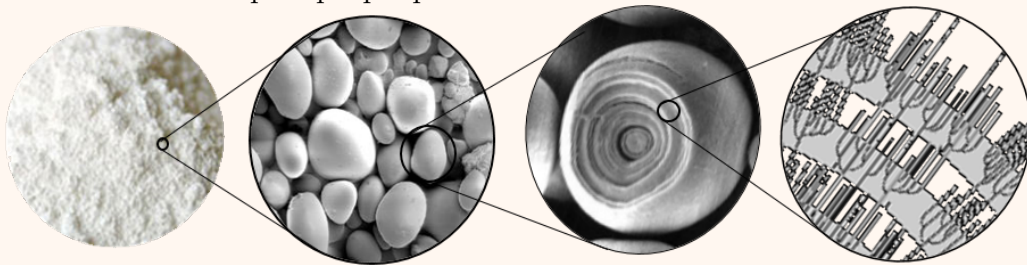


FIGURE 3.11 – Description multi-échelle de la structure des grains d'amidon

#### ***Encart 3.4 - Matériel et méthode : Montage des granules d'amidon***

Des granules d'amidon extraits de pommes de terre ont été montés sur une lame de verre mouillée et recouverts par une lamelle de verre.

### 3.4.2 Calibration du mode PTHG

#### a) Choix de la référence de l'orientation de la polarisation

Nous avons choisi d'orienter la référence de la polarisation d'excitation du mode PTHG selon l'axe  $y$  (i.e. axe vertical dans le plan d'imagerie). Dans ce but, les signaux PSHG et PTHG ont été enregistrés sur un grain d'amidon en commutant entre des états de polarisations linéaires avec notre nouveau dispositif d'imagerie rapide (en général 18 polarisations avec un pas angulaire de  $10^\circ$ ) pour plusieurs orientations de la lame demi-onde HWP2.

La figure 3.12 présente deux acquisitions PSHG et PTHG pour 4 polarisations linéaires orientées à  $45^\circ$  les unes des autres après calibration de la lame HWP2. Ces polarisations d'excitation sont situées à l'intersection entre l'équateur et les axes  $S_1$  et  $S_2$  de la sphère de Poincaré. La réponse SHG est maximale sur les domaines où les molécules d'amylopectine sont quasi-parallèles à l'orientation de la polarisation incidente. Le contraste SHG apparaît ainsi sous l'aspect d'un sablier dont l'orientation donne l'orientation de la polarisation incidente. Le signal THG - issu de l'interface entre le grain et l'eau environnante - est maximal sur les domaines où la polarisation est orthogonale à l'interface. On peut noter l'absence de signal à l'intérieur de la structure malgré son caractère biréfringent.

Pour éliminer la dépendance des signaux SHG et THG avec la polarisation incidente linéaire, les images polarimétriques peuvent être moyennées. On peut voir sur la figure 3.12.c que l'image SHG moyennée présente un contraste relativement homogène dans le grain d'amidon, et que l'image THG moyennée présente un contraste homogène sur l'interface.

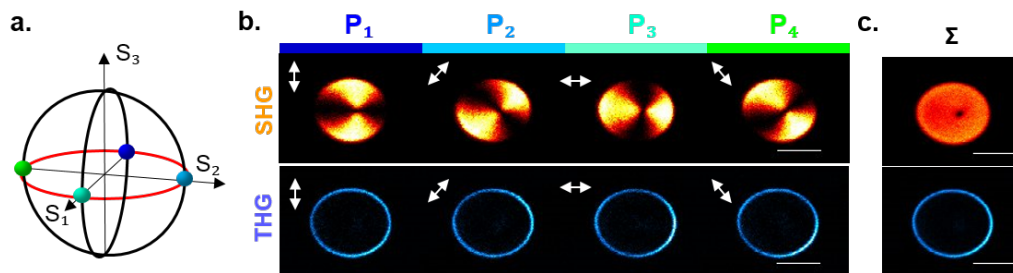


FIGURE 3.12 – Acquisitions PTHG et PSHG quasi-simultanées sur des granules d'amidon. a. Représentation des polarisations incidentes considérées sur la sphère de Poincaré. b. Images PSHG et PTHG. Barres d'échelle :  $10 \mu m$ . c. Sommes des 4 acquisitions.

#### b) Correction de la dépendance en intensité de l'excitation avec l'orientation de la polarisation

Bien que l'ellipticité et l'orientation du grand axe des ellipses de polarisation générées soient parfaitement contrôlées, l'intensité de l'excitation sous l'objectif varie avec l'état de polarisation créé. Ces variations en intensité sont causées par des défauts de transmission anisotropiques des éléments optiques et n'ont pas pu être corrigées avec notre dispositif optique. Pour réaliser des mesures quantitatives de la dépendance du signal THG avec la polarisation sur un échantillon, il est indispensable de corriger ces variations qui sont amplifiées à l'ordre 3 par le processus à 3 photons. La correction consiste à appliquer un post-traitement où chaque image d'une pile PTHG est divisée par un facteur associé à la polarisation d'excitation. Ce facteur est obtenu en moyennant puis en normalisant le signal PTHG collecté sur une lame de verre horizontale. Par ailleurs, pour la longueur d'onde utilisée ( $\lambda = 1100 \text{ nm}$ ), le cristal de l'EOM n'introduit

pas de dispersion, il n'a donc pas été utile d'ajuster la durée des impulsions pour améliorer la puissance moyenne détectée sous l'objectif.

### 3.4.3 Calibration du mode C-L-THG

Le même type de calibration a été réalisé avec le second mode d'imagerie C-L-THG pour que l'orientation de la lame HWP2 permette de générer sous l'objectif une première polarisation d'excitation linéaire parallèle à l'axe  $y$  (i.e. axe vertical dans le plan d'imagerie). Les 4 états de polarisation d'intérêt (2 circulaires et 2 linéaires) sont représentés sur la sphère de Poincaré au niveau des intersections entre le méridien défini par les axes  $S_1$  et  $S_3$  et les axes  $S_1$  et  $S_3$ . (cf. figure 3.13.a). Sur l'acquisition C-L-SHG réalisée après calibration de la lame HWP2 (cf. figure 3.13.b), on peut remarquer que la réponse du contraste SHG à une polarisation d'excitation circulaire est quasi-homogène dans le granule et fait ainsi disparaître l'effet de dépendance de la réponse SHG observé pour une polarisation linéaire. Le contraste C-SHG moyenné sur les deux acquisitions réalisées avec des polarisations circulaires donne en effet un résultat quasi-identique au moyennage sur les réponses PSHG. L'avantage ici est qu'on peut obtenir un contraste indépendant de la polarisation d'excitation avec l'acquisition de deux images seulement. En revanche, le signal THG s'éteint au niveau de l'interface de l'amidon lorsque la polarisation devient circulaire. Le moyennage des deux images L-THG pour les deux polarisations d'excitation linéaires orthogonales permet de s'affranchir de manière satisfaisante de la dépendance de la réponse THG à l'orientation de la polarisation d'excitation.

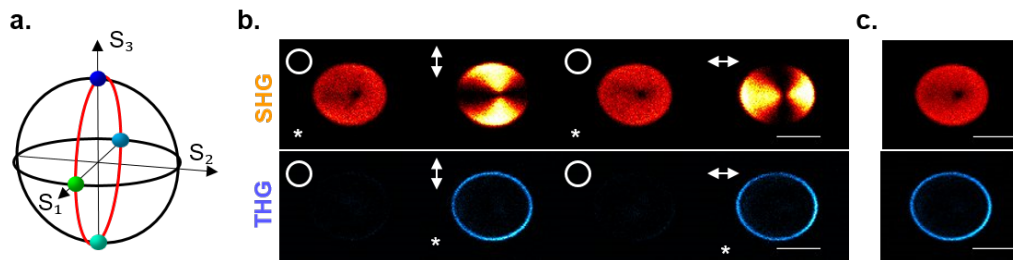


FIGURE 3.13 – Acquisitions C-L-SHG et C-L-THG séquentielles sur des granules d'amidon. a. Représentation des polarisations incidentes considérées sur la sphère de Poincaré. b. Images C-L-SHG et C-L-THG. Barres d'échelle :  $10 \mu m$ . c. Sommes de 2 acquisitions C-SHG et L-THG.

## 3.5 Analyse de l'ordre moléculaire de structures biologiques

Dans cette partie nous présentons une première application pour **mesurer l'ordre moléculaire sur des structures biologiques dynamiques** qui tire pleinement profit du développement technique de cette nouvelle modalité d'imagerie PTHG rapide. A cet effet, nous avons mis au point une **nouvelle méthodologie pour extraire l'ordre moléculaire** - basée sur le calcul des coefficients de Fourier en chaque pixel de l'image en intensité THG résolue en polarisation. Cette application a été illustrée par la mesure de la **désorganisation moléculaire sur des structures lipidiques** induite par une transition de phase, puis par la **détection de la nature cristalline des particules d'otolithe** qui flottent dans l'oreille interne de l'embryon de poisson-zèbre.

### 3.5.1 Développement d'une méthode d'analyse de l'ordre moléculaire par Transformée de Fourier

Nous allons décrire dans cette partie la méthode d'analyse de l'ordre moléculaire qui repose sur le calcul des coefficients de Fourier en chaque pixel de l'acquisition THG résolue en polarisation. Cette méthode vient remplacer l'analyse par fit, particulièrement coûteuse en terme de temps de calcul.

#### - Calcul des coefficients de Fourier

Par définition, la transformée de Fourier (TF) d'une fonction  $f$  continue et T-périodique s'écrit  $\tilde{f} = \sum_{n \in \mathbb{Z}} \tilde{c}_n(f) \delta_n$  avec le coefficient de Fourier complexe à l'ordre  $n$  tel que  $\tilde{c}_n(f) = \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} f(x) e^{-i \frac{2\pi n x}{T}} dx$ .

On peut montrer que la TF du signal THG d'interface :

$$I_{int}(\phi) = A + B \cdot \cos^2(\phi - \phi_0) \quad (3.10)$$

est égale à :

$$\tilde{I}_{int}(\phi) = \tilde{c}_0 \delta_0 + \tilde{c}_1 \delta_1 + \tilde{c}_1^* \delta_{-1} \quad (3.11)$$

avec  $\tilde{c}_0 = A + \frac{B}{2}$  et  $\tilde{c}_1 = \frac{B}{4} e^{-2i\phi_0}$ .

Similairement, la TF du signal THG de biréfringence réalisé par accord de phase qui suit la dépendance suivante :

$$I_{bulk}(\phi) = A + B \cdot \cos^4(\phi - \phi_0) \cdot \sin^2(\phi - \phi_0) \quad (3.12)$$

s'écrit :

$$\tilde{I}_{bulk}(\phi) = \tilde{c}_0 \delta_0 + \tilde{c}_1 \delta_1 + \tilde{c}_2 \delta_2 + \tilde{c}_3 \delta_3 + \tilde{c}_1^* \delta_{-1} + \tilde{c}_2^* \delta_{-2} + \tilde{c}_3^* \delta_{-3} \quad (3.13)$$

avec  $\tilde{c}_0 = A + \frac{B}{16}$ ,  $\tilde{c}_1 = \frac{B}{64} e^{-2i\phi_0}$ ,  $\tilde{c}_2 = -\frac{B}{32} e^{-4i\phi_0}$  et  $\tilde{c}_3 = -\frac{B}{64} e^{-6i\phi_0}$ .

L'aspect des signaux THG théoriques d'interface et de biréfringence et leur décomposition de Fourier sont présentés sur la figure 3.14. Comme les signaux THG de biréfringence ont une dépendance plus complexe avec la polarisation que le signal THG d'interface, les coefficients de Fourier nuls apparaissent pour un ordre plus élevé (à partir de l'ordre 4). Cette spécificité sera utilisée par la suite pour construire des masques spécifiques des régions d'interfaces et de bulk. Les cartes des coefficients de Fourier calculés en chaque pixel des piles d'images PTHG utilisent l'algorithme de transformée de Fourier rapide défini sur *Matlab* (FFT : Fast Fourier Transform) (cf. figure 3.15).

#### - Méthode de construction des masques

Nous avons développé une méthode pour construire des masques sélectifs des régions d'interface ou du bulk par seuillage du coefficient de détermination  $\mathcal{R}^2$  calculé entre le signal polarimétrique mesuré et le signal reconstruit à partir de coefficients de Fourier - d'ordres bien choisis - déduits du signal polarimétrique brut.



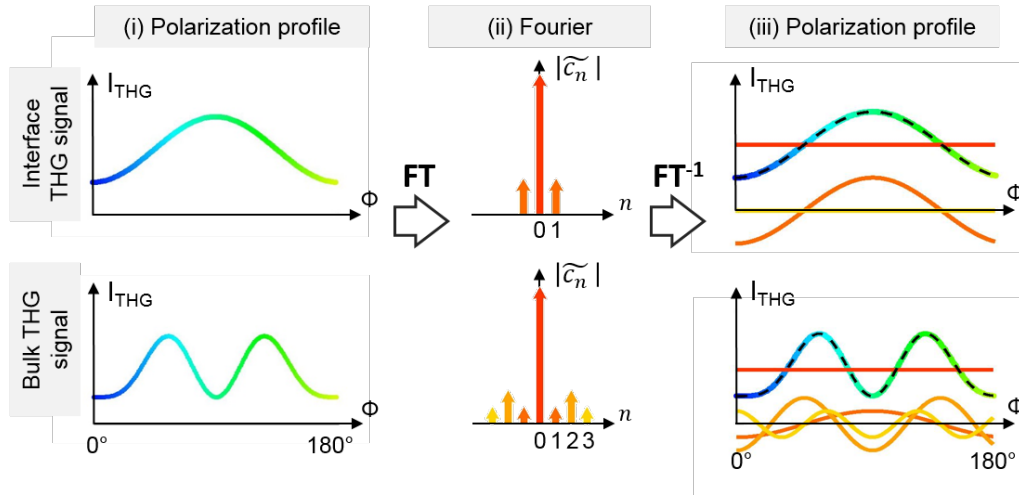


FIGURE 3.14 – Méthode d'analyse FT-PTHG du signal PTHG sur un pixel unique. a. Profils d'intensité PTHG théoriques des signaux issus de l'interface (en haut) et du volume (en bas) de matériaux anisotropes. b. Amplitudes correspondantes des coefficients de Fourier obtenues par un traitement FT à une dimension. c. Reconstruction des signaux PTHG basée sur les 4 premiers coefficients de Fourier.

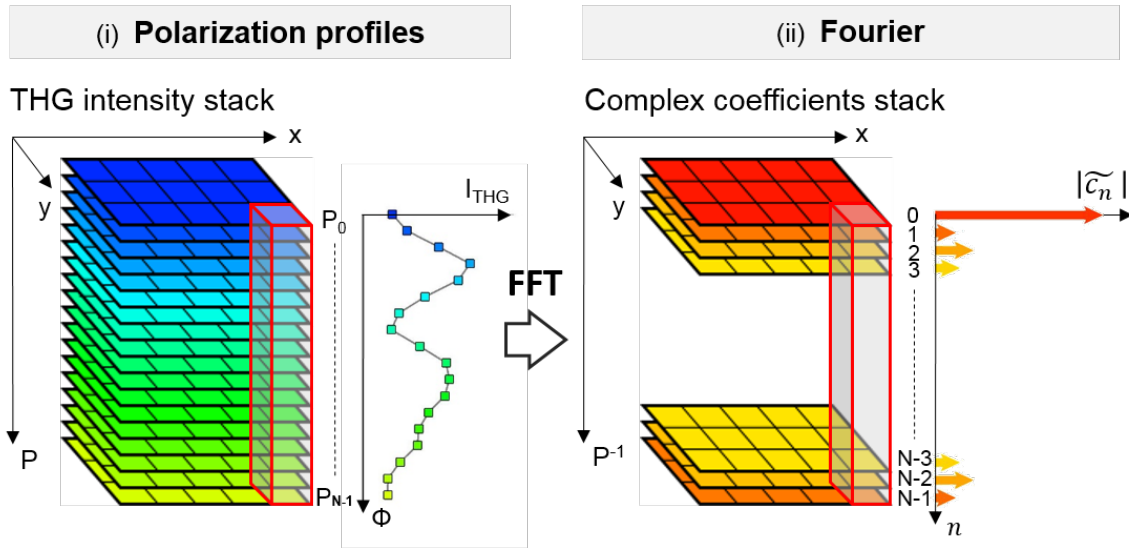


FIGURE 3.15 – Méthode d'analyse des images PTHG par transformée de Fourier. a. Matrice du signal PTHG réarrangée. b. Traitement FT en deux dimensions.

Le coefficient de détermination est défini par :

$$\mathcal{R}^2 = \text{corr}(\hat{y}, y)^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \in [0, 1] \quad (3.14)$$

avec  $n$  le nombre de mesures polarimétriques réalisées,  $y_i$  la valeur de la  $i^e$  mesure,  $\hat{y}_i$  la  $i^e$  valeur du signal reconstruit et  $\bar{y}$  la valeur moyenne des mesures polarimétriques. Ce coefficient est égal au carré du coefficient de corrélation linéaire entre les valeurs reconstruites  $\hat{y}_i$  et les mesures  $y_i$ . Il est habituellement utilisé pour déterminer la qualité de prédiction d'une régression linéaire.



Suite à la remarque du paragraphe précédent qui décrivait la spécificité des décompositions de Fourier des signaux provenant des interfaces (termes non-nuls d'ordres 0 et 1 uniquement) et du bulk (termes non-nuls d'ordre 0, 1, 2 et 3), nous définissons de manière systématique les trois fonctions suivantes :

$$\bar{I}_{Interface}(\phi) = |\tilde{c}_0| + 2 |\tilde{c}_1| \cdot \cos [2(\phi - \arg(\tilde{c}_1))] \quad (3.15)$$

$$\bar{I}_{Bulk}(\phi) = |\tilde{c}_0| + 2 |\tilde{c}_2| \cdot \cos [2(\phi - \arg(\tilde{c}_2))] \quad (3.16)$$

$$\bar{I}_{Int+Bulk}(\phi) = |\tilde{c}_0| + 2 |\tilde{c}_1| \cdot \cos [2(\phi - \arg(\tilde{c}_1))] + 2 |\tilde{c}_2| \cdot \cos [2(\phi - \arg(\tilde{c}_2))] + 2 |\tilde{c}_3| \cdot \cos [2(\phi - \arg(\tilde{c}_3))] \quad (3.17)$$

La fonction 3.15 qui fait intervenir uniquement les ordres 0 et 1 est utilisée efficacement pour construire un masque sélectif des régions d'interface. La seconde fonction 3.16 qui comporte seulement les coefficients de Fourier d'ordres 0 et 2 est employée pour construire un masque sélectif des régions de bulk en rejetant les régions avec des interfaces. L'équation 3.17 qui fait intervenir les 4 premiers coefficients de Fourier permet de construire un masque des régions de bulk et d'interfaces indifféremment. Les masques sont créés en choisissant un seuil sur les cartes des coefficients de détermination associées aux trois fonctions.

#### - Méthode d'extraction des cartes de modulation

Les cartes de modulation et d'angle moléculaire ont ensuite été déduites des cartes des coefficients de Fourier. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'amplitude de modulation du signal PTHG d'interface - définie par  $M = (I_{max}^{THG} - I_{min}^{THG}) / I_{max}^{THG}$  - renseigne sur l'ordre moléculaire de la structure étudiée. Ce signal suit une relation de dépendance avec l'orientation  $\phi$  de la polarisation de la forme  $A + B \cdot \cos^2(\phi - \phi_0)$ , de sorte que la valeur du coefficient de modulation peut être estimée précisément à partir des paramètres  $A$  et  $B$  obtenus par un fit sur le signal THG d'interface :  $M = B / (A + B)$ . Dans le cadre du développement de notre analyse par transformée de Fourier, ce coefficient peut également être déduit à partir des amplitudes des deux premiers coefficients de Fourier :

$$M = \frac{4 \cdot |\tilde{c}_1|}{|\tilde{c}_0| + 2|\tilde{c}_1|} \quad (3.18)$$

#### - Méthode d'extraction des cartes d'angle moléculaire

L'angle moléculaire moyen est estimé à partir du signal d'interface par  $\phi_0 = -\arg(\tilde{c}_1) / 2$  et à partir du signal de biréfringence dans le volume par  $\phi_0$  ou  $\phi_0 + \pi/2$  en fonction du type d'accord de phase et de paramètres géométriques.

### 3.5.2 Application biologique 1 : Etude de la désorganisation des structures lipidiques soumises à un échauffement

Dans cette sous-partie, nous présentons une première application de la **détection de l'ordre moléculaire sur des structures lipidiques dynamiques** en utilisant le mode d'acquisition PTHG rapide. A travers l'étude du signal PTHG sur des MLVs - qui sont des systèmes modèles constitués d'une superposition de couches lipidiques concentriques (cf. figure 3.16.a) - nous montrons la **pertinence de l'approche par transformée de Fourier FT-PTHG** développée précédemment pour extraire rapidement l'ordre et l'orientation moléculaire à l'échelle

submicrométrique. Nous venons ensuite caractériser la **désorganisation moléculaire induite dans ces structures lipidiques** par une élévation de la température de l'échantillon au-delà de leur température de transition de phase.

### a) Contrastes PTHG sur une MLV à température ambiante

Des solutions aqueuses contenant plusieurs dizaines de MLVs ont été synthétisées suivant le même protocole que celui décrit au chapitre 2. Nous avons ensuite réalisé sur ces MLVs des acquisitions en PTHG rapide avec 18 polarisations incidentes linéaires et un pas angulaire de  $10^\circ$ .

Pour la description des signaux qui suit, on se reportera à l'image du contraste PTHG0 réalisée pour une polarisation parallèle à l'axe  $y$  (parallèle à l'axe vertical dans le plan d'imagerie) sur la figure 3.16.b. Les contrastes PTHG sur les MLVs font apparaître **deux types de signaux THG** associés à deux mécanismes de génération distincts du fait du caractère biréfringent des MLVs :

- (i) un **signal typique des hétérogénéités** sur l'interface entre la MLV et le solvant environnant.
- (ii) un **signal de biréfringence réalisé par accord de phase** dans le volume de la MLV, moins contrasté que le signal d'hétérogénéité.

Comme nous l'avons discuté dans le chapitre précédent, ces deux signaux présentent des dépendances différentes avec la polarisation d'excitation. Les profils des intensités PTHG issues de deux domaines - l'un à la périphérie de la MLV et l'autre à l'intérieur - sont présentés sur la figure 3.16.c. On observe que l'intensité du signal d'interface est maximale pour une polarisation d'excitation parallèle aux liaisons C-C, c'est-à-dire orthogonale à l'interface. En revanche, le signal lié à la biréfringence dans un domaine intérieur à la MLV présente deux maxima quand la polarisation varie en  $0^\circ$  et  $180^\circ$ .

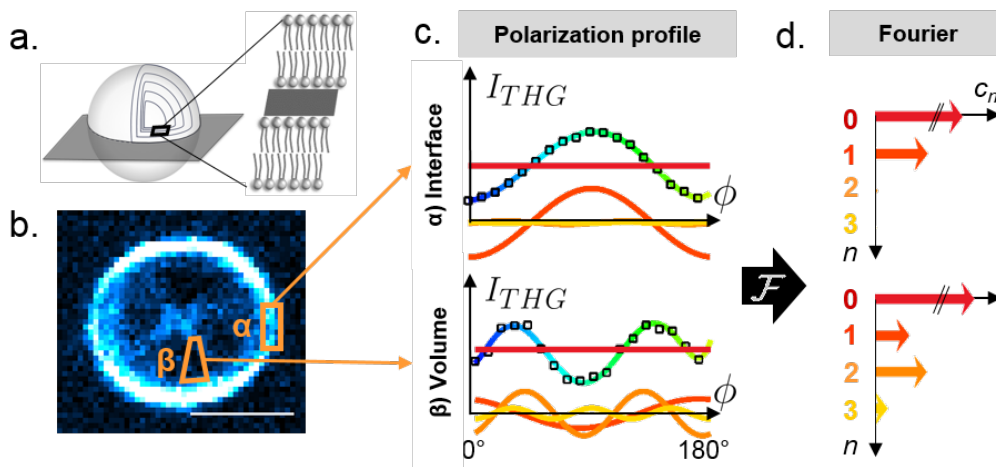


FIGURE 3.16 – Investigation de l'ordre moléculaire sur une vésicule lipidique multilamellaire (MLV) via une analyse de Fourier sur l'intensité PTHG. a. Schéma illustratif de la structure moléculaire d'une MLV. b. Image PTHG0 d'une MLV issue d'une séquence de 18 images PTHG acquises pour 18 polarisations d'excitation linéaires avec un pas angulaire de  $10^\circ$ . Barre d'échelle :  $5 \mu m$ . c. Profils d'intensité PTHG et d. coefficients de Fourier extraits sur deux domaines situés sur l'interface et dans le volume.

Du fait de leur dépendance différente avec l'orientation de la polarisation d'excitation, ces deux signaux possèdent des signatures de Fourier distinctes. En effet, le signal d'interface présente des coefficients d'amplitude nulle à partir du second ordre, tandis que le signal de biréfringence présente des composantes quasi-nulles à partir de l'ordre 4 et une amplitude du coefficient d'ordre 2 supérieure à celui de l'ordre 1 (cf. figure 3.16.d).

### b) Analyse FT-PTHG des signaux PTHG par transformée de Fourier

Pour analyser les signaux PTHG sur chaque pixel, nous avons utilisé la **méthodologie FT-PTHG** - développée précédemment - qui repose sur le calcul des coefficients de Fourier de la réponse THG selon la variable de la polarisation d'excitation. Nous avons extrait des cartes des coefficients par transformée de Fourier, puis construit des masques sélectifs de l'interface et de l'intérieur de la MLV, et enfin nous avons extrait des cartes de l'ordre moléculaire et d'orientation des lipides à l'échelle submicrométrique.

#### - Calcul des cartes des coefficients de Fourier

La première étape de cette analyse repose sur le calcul de la transformée de Fourier de la pile d'images résolue en polarisation. Comme on peut le voir sur la figure 3.17, les signaux d'interface sont dominés par les deux premiers coefficients de Fourier ( $c_0, c_1$ ). En revanche, les signaux liés à la biréfringence sont caractérisés par la présence additionnelle des coefficients d'ordres supérieurs à l'ordre 2 ( $c_2$  et  $c_3$ ).

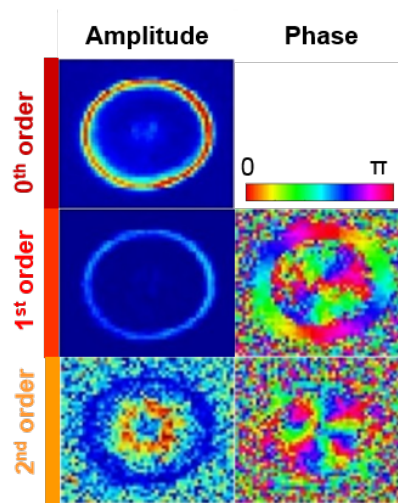


FIGURE 3.17 – Cartes d'amplitude et d'angle des trois premiers coefficients de Fourier.

#### - Construction des masques

Nous avons ensuite tiré profit des différences dans les signatures spectrales des signaux THG polarimétriques d'interface et de biréfringence pour construire de manière automatique des masques binaires sélectifs de **l'interface et du domaine intérieur**. Nous avons procédé en déterminant des seuils adaptés sur deux coefficients de détermination  $\mathcal{R}^2$  calculés entre le signal PTHG réel et le signal reconstruit  $\bar{I}(\phi)$  à partir de coefficients de Fourier bien choisis. Pour rappel, le masque d'interface utilise la fonction  $\bar{I}_{Interface}(\phi)$  calculée à partir des coefficients de Fourier  $c_0$  et  $c_1$ , tandis que le masque de bulk est calculé à partir de la fonction  $\bar{I}_{Bulk}(\phi)$  qui utilise les coefficients  $c_0, c_2$  et  $c_3$ . Les filtres ont ensuite été érodés puis dilatés avec les fonctions *imerode* et *imdilate* sur *Matlab*. La figure 3.18 présente les masques sélectifs de l'interface et de la région intérieure de la MLV.

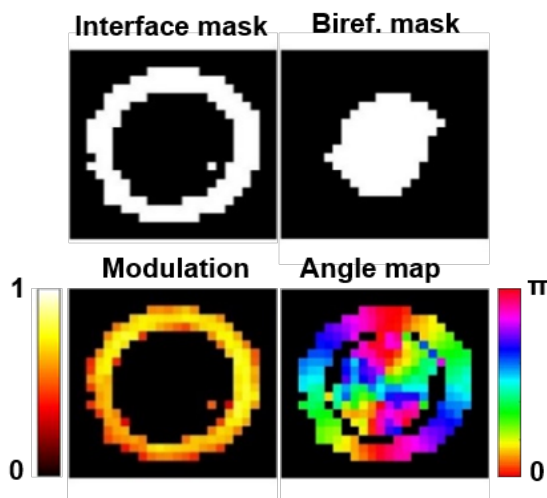


FIGURE 3.18 – Masques, cartes de modulation PTHG et d'angles moléculaires obtenus à partir d'une analyse par transformée de Fourier.

#### - Extraction de l'ordre moléculaire via la carte de modulation

Parallèlement, nous avons calculé la carte de l'amplitude de modulation à partir des amplitudes des deux premiers coefficients de Fourier  $M = \frac{4 \cdot |\tilde{c}_1|}{|\tilde{c}_0| + 2|\tilde{c}_1|}$ . Pour extraire l'ordre moléculaire de manière spécifique sur l'interface, nous avons appliqué le masque d'interface sur la carte de modulation. La carte de modulation spécifique de l'interface est présentée sur la figure 3.18.

#### - Extraction de l'orientation des axes cristallins via la carte angulaire

De manière similaire, nous avons déterminé l'orientation des axes cristallins en appliquant les masques d'interface et de bulk sur la carte angulaire. Comme les dépendances des signaux THG avec la polarisation d'excitation sont différentes sur l'interface et dans le bulk, il convient de les traiter séparément. L'orientation des axes cristallins sur l'interface des MLVs s'obtient directement avec la phase du coefficient de Fourier à l'ordre 1. Par des considérations sur l'accord de phase dans le bulk, nous avons vu dans le chapitre II que l'angle moyen déduit de deux pics d'intensité rapprochés de la réponse PTHG donne l'orientation de l'axe lent. De plus, l'axe extraordinaire d'un cristal biréfringent uniaxe négatif (i.e. l'axe rapide) se déduit de la réponse PTHG dans le bulk en rajoutant une phase de  $\pi/2$  à l'axe ordinaire (axe lent). Ce qui revient ici à ajouter une phase de  $\pi/2$  à la phase du coefficient de Fourier à l'ordre 1 pour trouver l'orientation de l'axe extraordinaire (= l'axe des lipides) dans le bulk. La carte de l'orientation des lipides ainsi obtenue est présentée sur la figure 3.18. En accord avec les propriétés structurales connues des MLVs, les lipides sont orientés radialement au niveau du plan équatorial.

#### b) Description de la désorganisation des lipides

Nous avons ensuite cherché à valider la capacité de notre système d'imagerie PTHG rapide pour décrire la désorganisation moléculaire sur des MLVs soumises à une élévation de la température. Les changements de conformation des bicouches de lipides induits par une élévation de la température sont décrits plus en détail dans l'encart 3.5. La difficulté qui s'oppose généralement à l'imagerie polarimétrique sur des MLVs ayant subies une transition de phase est qu'elles se déforment avec une dynamique inférieure à la seconde. Notre dispositif d'imagerie permet

ici d'imager ce type d'échantillons grâce à sa résolution temporelle de l'ordre de la dizaine de millisecondes.

### Encart 3.5 - Désorganisation des lipides (à partir de [153])

Pour une température suffisamment faible (inférieure à la température de transition de phase des lipides), la plupart des liaisons C-C des chaînes hydrocarbonées des lipides sont en configuration "*trans*", qui est la configuration la plus stable. Les chaînes des lipides sont parallèles les unes avec les autres et la bicouche lipidique possède une conformation ordonnée de type  $\beta$ .

L'apport d'énergie au système *via* une élévation de la température, augmente la mobilité moléculaire caractérisée notamment par une probabilité plus importante d'induire le passage des liaisons C-C d'une configuration "*trans*" vers une configuration "*cis*" gauche ou droite. Dans les bicouches lipidiques, les orientations des chaînes des lipides présentent donc une plus grande dispersion angulaire associée à une conformation désordonnée  $\alpha$  de la bicouche.

Lorsque la conformation des chaînes lipidiques est ordonnée, la fluidité membranaire est faible, tandis que lorsque la conformation est désordonnée, la fluidité augmente.

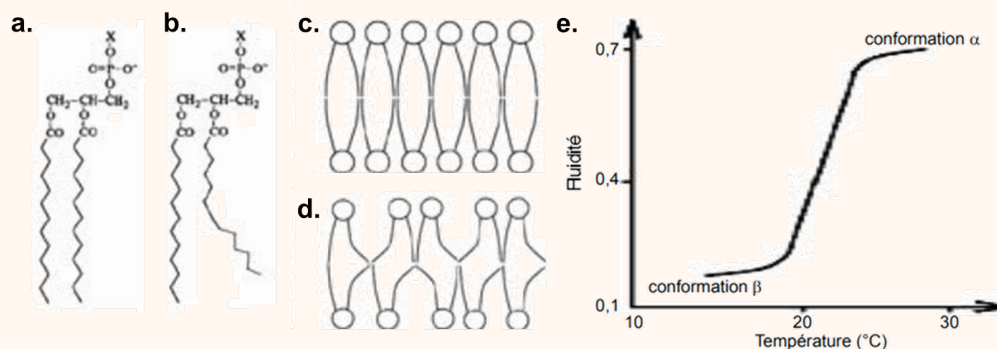


FIGURE 3.19 – Description de la désorganisation des lipides. a. Phospholipide en configuration tout- "*trans*". b. Phospholipide avec une liaison gauche. c. Membrane en conformation  $\beta$ . d. Membrane en conformation  $\alpha$ . e. Mesure de la fluidité du DMPC en fonction de la température. Adapté de [153].

Nous avons ici réalisé des acquisitions PTHG successives sur les mêmes MLVs ( $N=8$ ) à température ambiante ( $20^{\circ}\text{C}$ ) et à température élevée ( $38^{\circ}\text{C}$ ), c'est-à-dire en dessous et au-dessus de leur température de transition à  $24^{\circ}$  (cf. encart 3.6).

Pour chaque acquisition, nous avons extrait les valeurs de l'amplitude de la modulation PTHG sur les pixels de l'interface des structures en utilisant la méthode d'analyse FT-PTHG. La figure 3.20.a présente les histogrammes des amplitudes de modulation sur les pixels de l'interface d'une MLV à  $20^{\circ}\text{C}$  (histogramme bleu) puis portée à  $38^{\circ}\text{C}$  (histogramme gris). On observe une diminution des valeurs de modulation et une plus grande dispersion des valeurs de modulation lorsque la température augmente.

Les données sur l'évolution de l'amplitude de modulation moyenne sur  $N = 8$  MLVs sont reportées sur la figure 3.20.b. On observe une diminution significative de l'amplitude de modulation de 70 % à 55 % lorsque la température passe de  $20^{\circ}\text{C}$  à  $38^{\circ}\text{C}$ .

**Encart 3.6 - Matériel et méthode : Conditions d'imagerie des MLVs**

Les expériences avec une température ajustable ont été menées en utilisant une micro-chambre Oko-Lab (*H301-T-UNIT-BL-PLUS, USA*). L'imagerie PTHG de chaque échantillon a été réalisée successivement à 20°C (température ambiante de la pièce, système éteint) et à 38°C (contrôle de la température de la chambre réalisé). Ces deux températures sont en-dessous et au-dessus de la température de transition des lipides de DMPC (24°C)

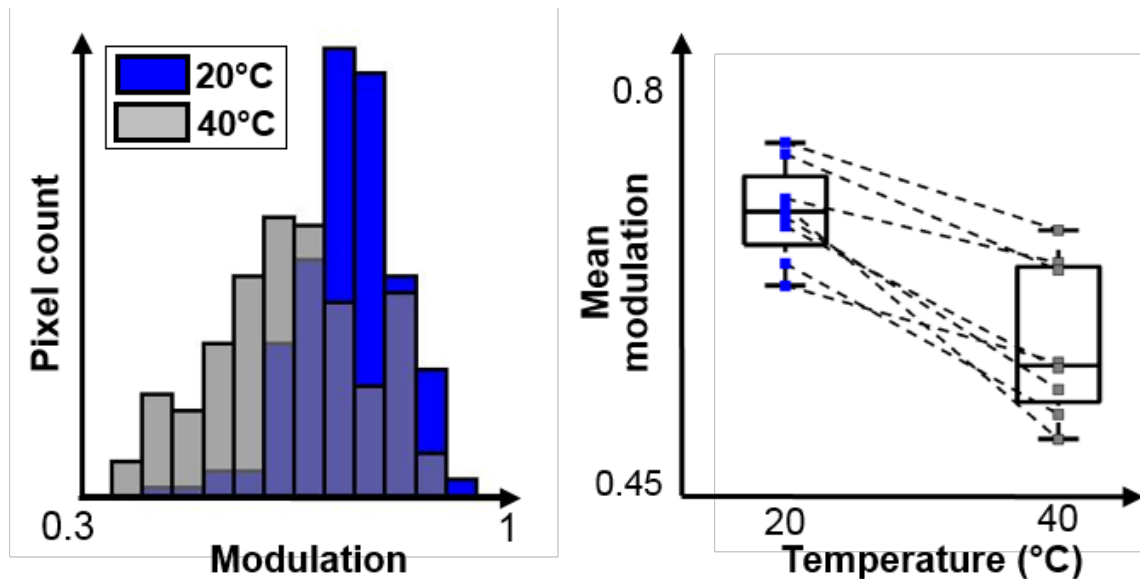


FIGURE 3.20 – Désorganisation de la structure lipidique. a. Histogrammes de l'amplitude de modulation PTHG sur les pixels de l'interface d'une MLV soumise à une transition de phase induite par une élévation de la température. b. Données statistiques des valeurs moyennes mesurées sur 8 MLVs

#### d) Conclusion

Nous avons présenté dans cette partie une première application de la **détection de l'ordre moléculaire sur des structures lipidiques dynamiques** en utilisant le mode d'acquisition PTHG rapide. A travers l'étude du signal PTHG sur des MLVs - qui sont des systèmes modèles constitués d'une superposition de couches lipidiques concentriques (cf. figure 3.16.a) - nous avons montré la **pertinence de l'approche par transformée de Fourier FT-PTHG** développée précédemment pour extraire rapidement l'ordre et l'orientation moléculaire à l'échelle submicrométrique. Nous avons ensuite caractérisé la **désorganisation moléculaire induite dans ces structures lipidiques** par une élévation de la température au-delà de leur température de transition de phase. Ce dernier résultat valide la capacité de notre technique à sonder l'organisation dans des échantillons qui se déforment à des dynamiques inférieures à la seconde.



### 3.5.3 Application biologique 2 : Détection de la biominéralisation des particules précurseurs des otolithes dans l'oreille interne du poisson zèbre

Nous présentons ici une seconde application de la microscopie PTHG rapide où nous avons exploré la possibilité de **déterminer la nature (cristalline/isotrope) de particules présentes dans l'environnement 3D dynamique de l'oreille interne de l'embryon du poisson-zèbre** au cours des stades précoces de formation de l'otolithe.

Ces particules précurseurs des otolithes - dont nous rappelons quelques spécificités dans l'encart 3.7 - présentent un caractère fortement dynamique lié à un déplacement 3D rapide (vitesse entre 1 et 50  $\mu\text{m/s}$  [140]) induit par un courant rapide dans la cavité otique. Cette forte dynamique, conjuguée à leur formation particulière - difficile à reproduire dans un environnement *ex vivo* - et la difficulté de leur appliquer un marquage ont empêché jusqu'à ce jour de conclure précisément la nature de ces particules. Pour cette raison spécifique, nous avons cherché à les imager avec notre dispositif optique et à étudier leur réponse polarimétrique.

#### ***Encart 3.7 - Particules endogènes dans les cavités des otolithes***

L'otolithe est une structure minéralisée de petite taille présente dans l'oreille interne des vertébrés. Il est impliqué dans la détection de la gravité et de l'accélération pour l'équilibration des organismes. Il est constitué principalement d'aragonite, une forme de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ).

Chez les poissons-zèbres, dans les quelques heures avant et après l'apparition de l'otolithe (entre les stades embryonnaires 20 hpf et 24 hpf), des particules micrométriques apparaissent de manière éphémère dans la cavité otique.

#### ***Encart 3.8 - Matériel et méthode : Imagerie des particules d'otolithe endogènes***

Les particules endogènes qui nagent autour des otolithes dans la cavité otique ont été imagées sur des embryons âgés de 20 à 24 hpf issus de la lignée transgénique *Casper* développée par [154] et élevée dans l'animalerie du laboratoire. Les œufs sont conservés dans un incubateur à 28°C jusqu'à ce qu'ils aient atteint les stades souhaités pour l'imagerie. Après avoir enlevé mécaniquement les chorions sur les plus jeunes embryons, les embryons ont été anesthésiés par immersion dans une solution de tricaine diluée à 0.016 % préparée à partir d'une solution de base (*MS-222 Sigma, St. Louis, MO, USA*) et de l'eau provenant de l'animalerie. Les embryons ont ensuite été incorporés dans une solution d'agarose à basse température de fusion (*Invitrogen, cat 15517-014, Carlsbad, CA, USA*) diluée à 2 % pour être immobilisés, puis ont été montés sur le fond d'une petite boîte de Petri scellée par une lamelle de verre. Un petit volume de la solution de tricaine mentionnée a été versé dans la boîte de Petri pour imager l'échantillon avec l'objectif 25× à immersion. L'imagerie a été réalisée à température ambiante (20°C). L'imagerie a été réalisée par immersion de l'objectif dans la boîte de Petri remplie de la solution de tricaine mentionnée.



Nous avons imagé ces particules sur des embryons âgés de 20 à 24 hpf de la lignée *Casper* (pour plus de détails voir l'encart 3.8). Des expériences préliminaires ont permis de valider la présence d'un fort contraste THG issu de ces particules à l'intérieur de la cavité otique localisée derrière la tête du poisson-zèbre (cf. figures 3.21.a et b).

Nous avons ensuite réalisé des acquisitions avec notre système PTHG à commutation rapide de la polarisation sur ces particules pour déterminer leur nature (isotrope/anisotrope). Ces acquisitions ont été conduites sur un champ d'environ  $2.5 \times 10 \mu\text{m}$  pour 4 polarisations orientées à  $45^\circ$  les unes des autres. Après avoir appliqué un seuillage sur l'intensité THG moyennée des 4 images de la pile, les particules ont été isolées avec la fonction *regionprops* sur *Matlab*. La valeur moyenne de l'intensité PTHG sur chaque particule a ensuite été calculée pour chacune des polarisations, puis la valeur de la modulation sur chaque particule a été extraite. La figure 3.21.c reprend ces différentes étapes du processus d'analyse.

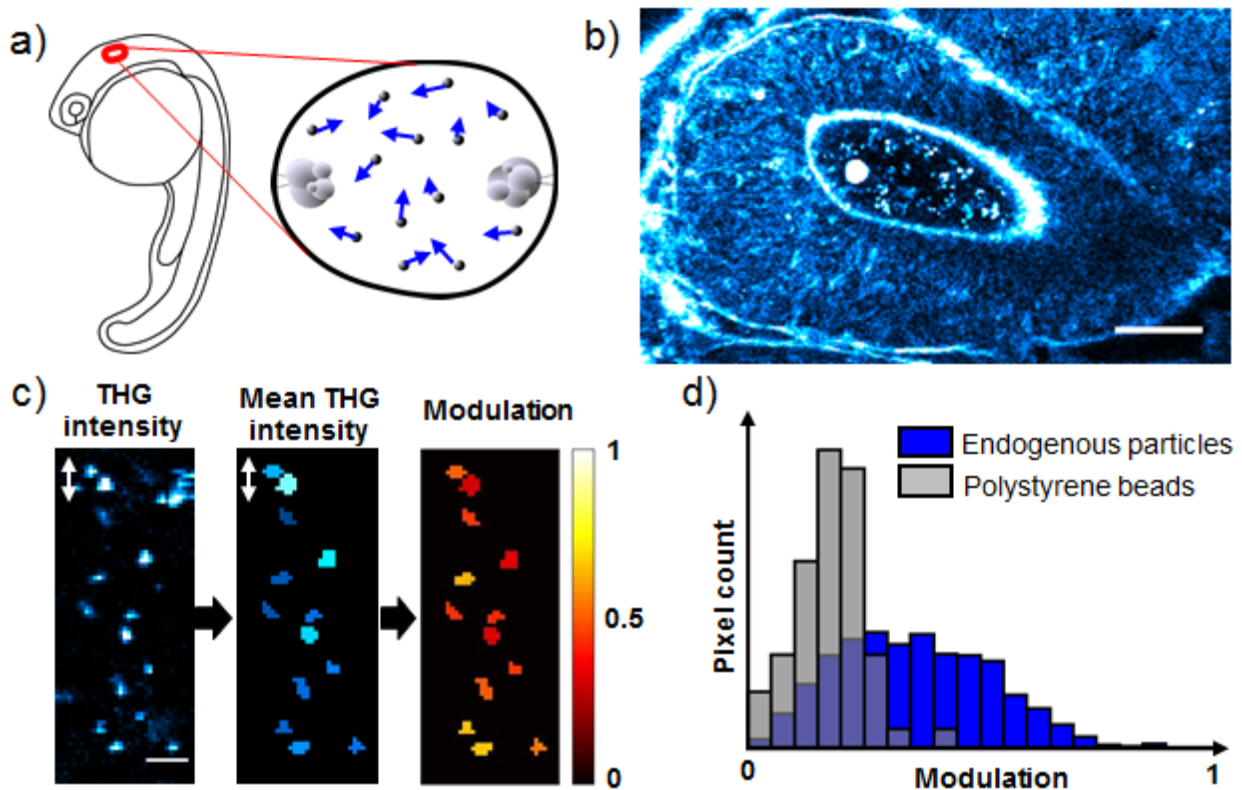


FIGURE 3.21 – Détection *in vivo* de l'anisotropie de particules endogènes flottant dans la cavité otique de l'embryon de poisson-zèbre. a. Schéma de la cavité de l'otolithe vers 22 hpf. b. Imagerie THG de la cavité de l'otolithe avec les microparticules flottantes. Barre d'échelle :  $20 \mu\text{m}$ . c. Extraction de la valeur moyenne de l'amplitude de modulation PTHG sur les microparticules. d. Histogramme de la modulation PTHG sur les microparticules d'otolithe endogènes (en bleu) et sur les billes de polystyrène injectées (en gris).

Pour interpréter les résultats des mesures PTHG sur les particules endogènes, nous avons réalisé 3 expériences de contrôle, présentées ci-dessous :

#### - 1<sup>e</sup> expérience contrôle :

La première expérience a consisté à comparer la réponse PTHG sur les particules endogènes avec celle obtenue sur des microbilles de polystyrène fluorescentes introduites dans la cavité

otique par microinjection (protocole décrit dans l'encadré 3.9). Les valeurs des amplitudes de modulation mesurées sur ces deux types de particules sont présentées sur l'histogramme de la figure 3.21.d. La modulation mesurée sur les particules endogènes est égale à  $35\% \pm 16\%$  alors que les billes isotropes en polystyrène - injectées dans la cavité et qui servent de contrôle - présentent une modulation sensiblement plus faible de  $18\% \pm 8\%$ . Cette différence de modulation révèle la nature cristalline anisotrope de ces microparticules flottantes.

**- 2<sup>e</sup> expérience contrôle :**

Un second type de contrôle a été réalisé sur des billes de polystyrène immobiles dans la configuration décrite dans l'encart 3.10 et sur la figure 3.22.b. On trouve une réduction de l'amplitude de la modulation de  $35 \pm 16\%$  sur les particules endogènes à  $16 \pm 12\%$  sur les billes immobiles.

**- 3<sup>e</sup> expérience contrôle :**

Un troisième type de contrôle a été réalisé avec et sans commutation de la polarisation incidente. On observe une diminution de l'amplitude de la modulation mesurée sur les particules endogènes, sur les billes de polystyrènes injectées dans la cavité et immobilisées dans l'agarose, respectivement de  $35 \pm 16\%$  à  $20 \pm 12\%$ , de  $18 \pm 8\%$  à  $14 \pm 8\%$  et de  $16 \pm 12\%$  à  $9 \pm 8\%$ . On pourrait s'attendre à voir chuter considérablement l'amplitude de modulation, cependant cette modulation PTHG résiduelle mesurée en l'absence de commutation de la polarisation est de nature artéfactuelle. Elle trouve son origine dans le mouvement des particules et dans les bruits de mesure. Cependant, ces mesures contrôles montrent que la modulation PTHG mesurée sur des microparticules d'otolithe endogènes est statistiquement supérieure à celle sur des billes injectées et ne peut être attribuée qu'à l'anisotropie du matériau. (cf. figure 3.22)

***Encart 3.9 - Matériel et méthode : Imagerie des particules injectées dans la cavité otique***

Les embryons contrôles âgés de 30 hpf ont subi une microinjection d'un volume de  $0.5\text{ nL}$  d'une solution de micro-billes fluorescentes dans une des deux cavités otiques en utilisant une seringue de microinjection en verre. La solution de billes fluorescentes injectées - de diamètre de  $1\ \mu\text{m}$  - a été préparée par dilution à la concentration  $0.01\%$  d'une solution de base (*Invitrogen, F8821, Carlsbad, CA, USA*) avec de l'eau distillée.

***Encart 3.10 - Matériel et méthode : Imagerie des micro-billes statiques***

Des micro-billes non fluorescentes (*Sigma, LB11, Darmstadt, Germany*) de  $1.1\ \mu\text{m}$  de diamètre ont été incorporées à de l'agarose puis déposées sur une lame de verre et recouvertes d'une lamelle de verre pour être imagées.

**c) Conclusion**

Ces expériences démontrent la capacité unique du dispositif d'acquisitions PTHG rapide pour la détection de la biominéralisation *in vivo* sur des échantillons dynamiques.

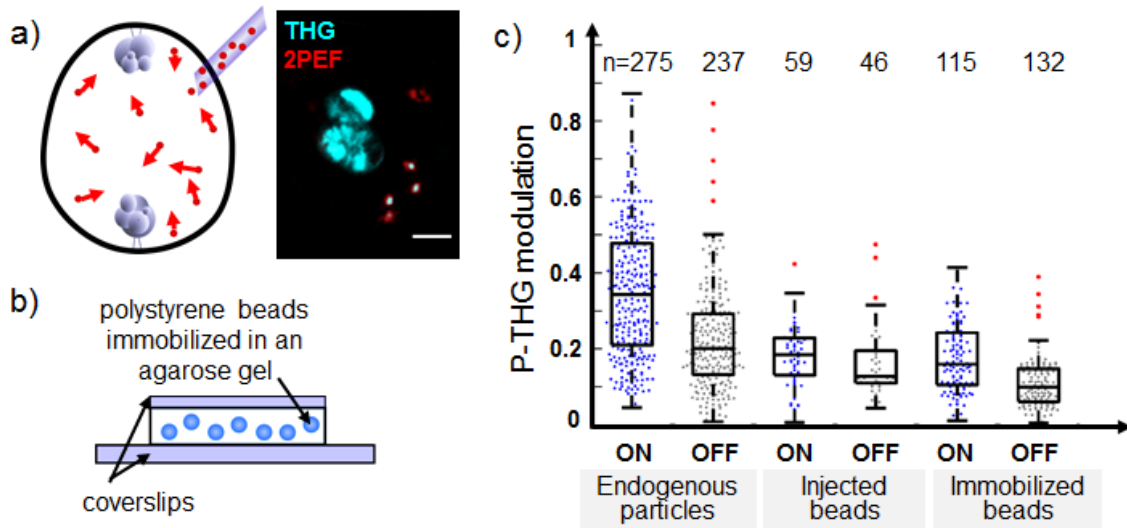


FIGURE 3.22 – Mesures de la modulation PTHG sur des microparticules de la cavité de l’otolithe et sur des billes de polystyrène. a. A gauche, Schéma d’une injection de microparticules fluorescentes dans la cavité de l’otolithe du poisson-zèbre. A droite, imageries THG et 2PEF simultanées des billes injectées. Barre d’échelle :  $10 \mu\text{m}$ . b. Schéma du montage des billes de polystyrène incorporées dans un gel d’agarose. c. Amplitudes de modulation mesurées sur des microparticules endogènes, des billes fluorescentes de polystyrène injectées et des billes de polystyrène immobiles, avec et sans commutation de la polarisation. Le nombre de particules analysées est indiqué au-dessus de chaque histogramme.

### 3.5.4 Conclusion de la partie 5

Nous avons rapporté dans cette partie deux applications sur des environnements biologiques dynamiques qui tirent pleinement profit du **développement de la PTHG rapide** et d’une **nouvelle méthode d’analyse FT-PTHG des signaux PTHG par transformée de Fourier** pour **détecter l’ordre moléculaire sur des structures biologiques dynamiques**. La nouvelle méthodologie consiste en effet à extraire l’ordre moléculaire en utilisant le calcul des coefficients de Fourier en chaque pixel de l’image en intensité THG résolue en polarisation. Nous avons montré une capacité nouvelle à mesurer la **désorganisation moléculaire sur des structures lipidiques** induite par une transition de phase, puis nous avons réussi à **détecter la nature cristalline des particules d’otolithe** qui flottent dans l’oreille interne de l’embryon de poisson-zèbre.

## 3.6 Détection *in vivo* des domaines biréfringents dans les matériaux biologiques

Une propriété de la réponse THG polarimétrique - qui a été rappelée dans le chapitre précédent mais qui est rarement mentionnée dans la littérature - est que le signal THG issu des interfaces d’échantillons isotrope s’évanouit pour une polarisation circulaire, tandis que le signal issu du volume de matériaux biréfringents est préservé. De sorte que l’acquisition d’images THG pour deux états de polarisation incidents, l’un linéaire (L-THG) et l’autre circulaire (C-THG), révèle efficacement les propriétés d’anisotropie dans les matériaux.

Comme il a été évoqué plus haut, notre dispositif de commutation rapide a pu être optimisé pour obtenir des états de polarisation linéaires et circulaires pour des valeurs de tension particulières appliquées à l'EOM. Nous avons tiré profit de cette capacité pour développer un **nouveau mode d'acquisition C-L-THG rapide** qui bascule rapidement entre des polarisations circulaires et linéaires dans la perspective de **détecter la présence de domaines biréfringents dans des structures biologiques anisotropes**.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une **caractérisation de la sensibilité de cette méthode de détection de la biréfringence** sur des échantillons modèles, puis dans un second temps nous l'avons appliquée dans un contexte *in vivo* à la **détection des vésicules biréfringentes dans les cellules intestinales du vers *c-elegans***.

### 3.6.1 Caractérisation de la sensibilité de la méthode de détection de la biréfringence

Pour caractériser la sensibilité de cette méthode de détection de la biréfringence, nous avons enregistré des images C-L-THG sur des échantillons biologiques modèles caractérisés par des degrés différents d'anisotropie. Les expériences ont été conduites successivement sur une **gouttelette d'huile** (structure isotrope), un **cristal d'otolithe** (structure fortement biréfringente) et une **vésicule multilamellaire** (structure semi-anisotrope). Pour extraire le degré de biréfringence sur ces structures, nous avons développé une nouvelle méthodologie que nous décrivons dans le paragraphe suivant.

#### a) Méthodologie d'analyse des acquisitions C-L-THG

Le contraste relatif entre les images C-THG et L-THG est d'autant plus élevé que le degré de biréfringence des structures est important. Pour rendre compte quantitativement du niveau de biréfringence, nous avons défini un **paramètre d'anisotropie** normalisé défini par :

$$C_{Anisotropie} = \frac{CTHG}{LTHG + CTHG} \quad (3.19)$$

A partir de chaque acquisition d'images C-L-THG, nous avons extrait la carte de ce paramètre  $C_{Anisotropie}$ .

#### b) Etude de la réponse C-L-THG sur 3 échantillons modèles

Nous nous sommes intéressés à 3 types d'échantillons qui possèdent des degrés d'anisotropie différents. Sur la figure 3.23 sont présentés pour chaque échantillon : les images C-THG et L-THG, la carte du paramètre d'anisotropie - filtrée avec un masque construit en fixant un seuil sur les images L-THG pour éliminer le bruit - et les histogrammes des valeurs de ce paramètre sur chaque pixel de la carte :

##### (i) Gouttelette d'huile :

Sur la gouttelette d'huile, le signal L-THG apparaît au niveau de l'interface entre la gouttelette et l'eau environnante (cf. fig. 3.23.a). Ce signal d'interface s'évanouit intégralement pour une polarisation incidente circulaire. Par conséquent, la carte du paramètre d'anisotropie et l'histogramme déduit de cette carte présentent des valeurs faibles (comprises entre 0 – 0.2) qui rendent compte du caractère isotrope de la structure moléculaire de la gouttelette d'huile.

(ii) *Otolithe d'un embryon de poisson-zèbre* :

En revanche, un signal L-THG apparaît dans le volume de l'otolithe et ce signal est préservé sur l'image C-THG. On peut également noter que les domaines qui produisent un signal C-THG sont légèrement plus étendus que ceux qui génèrent un signal L-THG. Le signal L-THG réalisé par accord de phase dépend en effet de l'orientation relative entre les axes cristallins et la polarisation incidente, tandis que le signal C-THG généré présente un aspect similaire au signal L-THG moyenné pour plusieurs orientations d'une polarisation d'excitation linéaire. A l'intérieur de la structure, les valeurs du coefficient d'anisotropie présentent des valeurs élevées - avec une répartition gaussienne autour de 50 % - en accord avec les propriétés de biréfringence du matériau.

(iii) MLV :

La structure de la MLV présente une réponse intermédiaire entre les deux cas précédents : le signal L-THG d'interface disparaît sur l'image C-THG, alors que le signal L-THG issu du volume - réalisé par accord de phase - est conservé sur l'image C-THG. On note ici aussi que le signal C-THG est généré sur l'intégralité de la surface intérieure de la MLV, alors que le signal L-THG présente une hétérogénéité spatiale sous l'aspect d'une croix dont l'orientation dépend de l'orientation de la polarisation incidente avec les axes neutres de la structure. Sur l'histogramme des valeurs du paramètre d'anisotropie, deux groupes de valeurs se détachent du diagramme : des valeurs proches de 0 associées à l'extinction du signal sur l'interface et des valeurs plus élevées issues de l'intérieur de la MLV qui décrivent la propriété d'anisotropie de la structure.

### c) Discussion sur la pertinence du paramètre d'anisotropie

Dans les trois cas précédents, les cartes du paramètre d'anisotropie permettent une identification directe des signaux de biréfringence. De plus, ils convergent vers la définition d'une valeur de référence - évaluée à 0.17 - qui peut être utilisée comme une valeur seuil de la sensibilité de notre système pour détecter la présence de régions avec des propriétés anisotropes dans l'échantillon sondé.

## 3.6.2 Application biologique : Détection des vésicules biréfringentes dans les cellules intestinales du ver *c-elegans*

Après avoir développé un paramètre de mesure du degré de biréfringence et caractérisé la sensibilité de cette méthode sur des cas modèles, nous l'avons ensuite appliquée dans un contexte *in vivo* pour la **détection des vésicules biréfringentes dans les cellules intestinales du ver *c-elegans***.

Nous avons réalisé des acquisitions C-L-THG sur des vers *c-elegans* préparés suivant le protocole 3.12.

### a) Visibilité des vésicules dans les cellules intestinales en contraste C-L-THG

Les acquisitions L-THG fournissent des images morphologiques très contrastées des nombreuses vésicules micrométriques dans les cellules intestinales et de l'épithélium (cf. figure 3.25.a). Ce fort contraste qui émerge des structures est attribuable à la fois à leur dimension (de l'ordre du micron) et à leur composition riche en lipides.



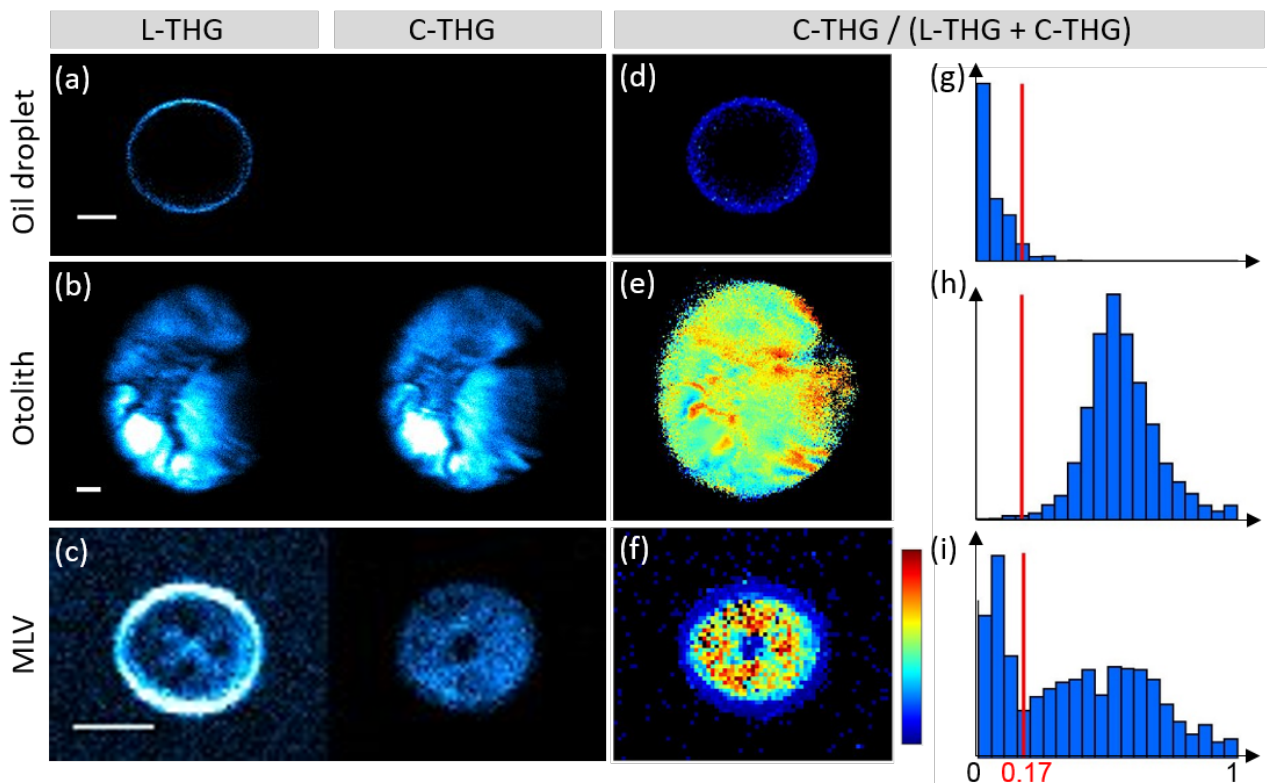


FIGURE 3.23 – Détection de structures biologiques biréfringentes en utilisant le mode de commutation C-L-THG et la méthodologie développée ci-dessus. (a-c) Acquisitions C-L-THG, (d-f) cartes et (g-i) histogrammes du paramètre d'anisotropie sur une gouttelette d'huile (isotrope), un otolith d'embryon de poisson-zèbre âgé de 3 jours (biréfringent) et sur une MLV (semi-biréfringent). Barre d'échelle :  $5 \mu m$ .

A la différence du contraste L-THG, le contraste C-THG s'évanouit sur la plupart des vésicules mais persiste seulement sur quelques rares vésicules (cf. figure 3.25.b). La carte d'anisotropie (cf. figure 3.25.c) montre que le paramètre d'anisotropie atteint sur ces dernières vésicules une valeur supérieure à 0.17, ce qui traduit leur caractère biréfringent avec un degré d'anisotropie supérieur au seuil de sensibilité de notre dispositif.

## b) Discussion

Nous avons utilisé ici une **nouvelle modalité d'imagerie C-L-THG rapide** réalisée avec un dispositif optique de commutation rapide entre une polarisation linéaire et une polarisation circulaire combinée à une **analyse ratiométrique** *via* le calcul d'un paramètre d'anisotropie en chaque pixel. Grâce à ces développements, nous avons été capable d'identifier *in vivo* et sans marquage les vésicules biréfringentes parmi les vésicules des cellules intestinales du ver. A partir de cartes d'anisotropie extraites sur un volume 3D, on pourrait également envisager d'identifier facilement et en 3D la fraction de vésicules biréfringentes localisées dans les cellules intestinales.



**Encart 3.11 - Vésicules lipidiques dans les cellules intestinales du ver *c-elegans***

Les cellules intestinales du ver *c-elegans* contiennent une forte densité de vésicules lipidiques dont une faible proportion de granules présentent de fortes propriétés de biréfringence et sont des organelles reliées aux lysosomes - comme il a été montré en microscopie à polariseurs croisés par [155].

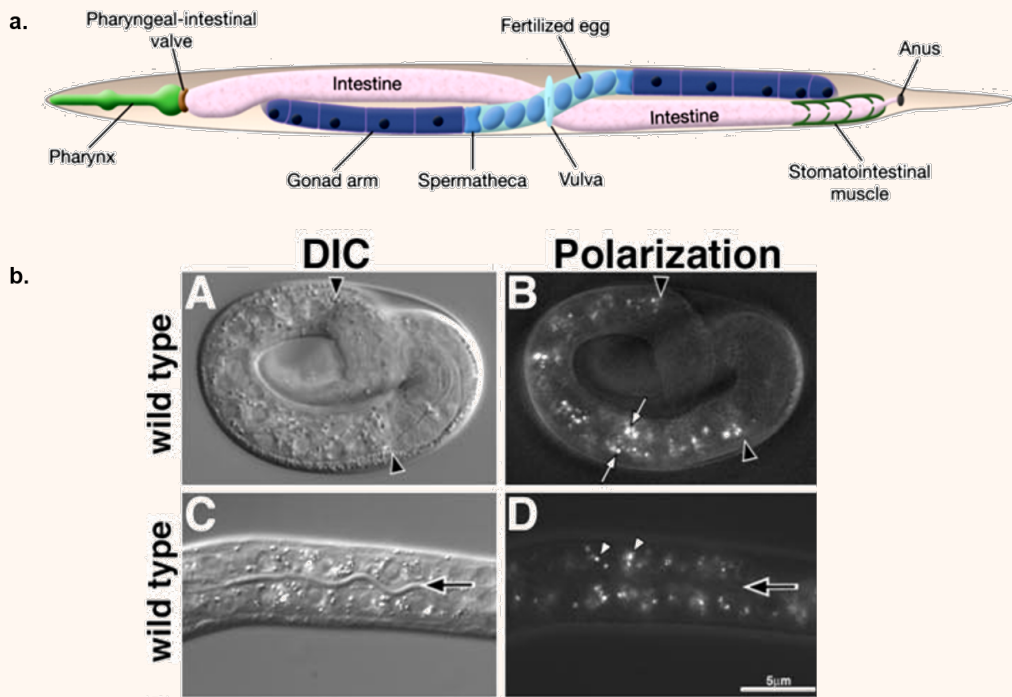


FIGURE 3.24 – Anatomie du ver *c-elegans*. Adapté de [156]. Imagerie DIC et en polarisation d'un ver *c-elegans* de souche sauvage. Adapté de [155].

**Encart 3.12 - Matériel et méthode :**

Les vers *c-elegans* imagés proviennent de la souche sauvage *Bristol N2*. Les nématodes ont été élevés à 20°C sur des plaques NGMensemencées avec des bactéries *E. coli* de la souche *OP50*. Le montage des nématodes pour l'imagerie a été réalisé sur une couche d'agarose à 10 % préparée sur une lamelle de verre. Des larves L4 ou des jeunes adultes ont ensuite été transférés dans une goutte de billes de polystyrène (*Polyscience Inc. cat 00876, Warrington, PA, USA*) sans traitement anesthésiant. Une lamelle de verre a ensuite été ajoutée et les animaux ont été imagés immédiatement.

**3.6.3 Conclusion de la partie 6**

Dans cette partie, nous avons montré que le **mode d'acquisition C-L-THG rapide** combiné avec une **analyse ratiométrique** à l'échelle submicrométrique permet de **détecter efficacement la présence de domaines biréfringents dans des environnements biologiques *in vivo***.

L'étude de cas modèles (gouttelettes d'huile, MLVs et otolithes) nous a permis de fixer une valeur supérieure du seuil de la sensibilité de notre système pour détecter la biréfringence des

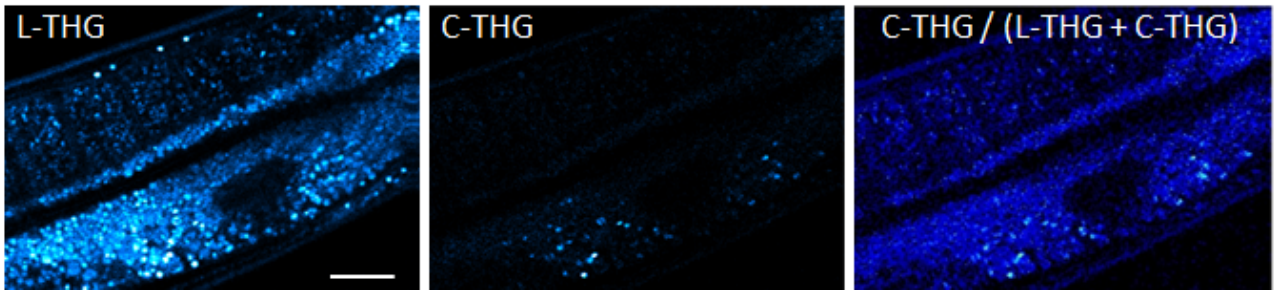


FIGURE 3.25 – Détection des vésicules biréfringents dans le ver *c-elegans*. a. Imagerie L-THG. b. Imagerie C-THG. Carte d'anisotropie.

échantillons. Pour affiner la caractérisation du seuil de sensibilité de cette technique de détection de la biréfringence qui est limitée à la fois par la faible dimension des vésicules que l'on veut sonder et par leur degré de biréfringence, on pourrait réaliser des acquisitions sur des MLVs de dimensions différentes avec des degrés d'anisotropie différents.

A partir de cette caractérisation préliminaire, nous avons ensuite appliqué cette méthode dans un contexte *in vivo* à la **détection des vésicules biréfringentes dans les cellules intestinales du ver *c-elegans***. Un avantage de cette technique sur la microscopie confocale avec des polariseurs croisés est sa capacité à venir sonder des échantillons dans des environnements *in vivo* dynamiques.

## 3.7 Conclusion du chapitre 3

Dans ce chapitre, nous avons présenté notre nouveau dispositif d'imagerie PTHG basé sur la combinaison d'une commutation rapide de la polarisation (de l'ordre de la dizaine de microsecondes) avec un mode d'acquisition XPY où la polarisation est commutée entre les lignes pour atteindre une **résolution temporelle sur les mesures polarimétriques de l'ordre de la dizaine de millisecondes** à l'échelle du pixel.

Nous avons optimisé ce système pour réaliser deux types d'acquisitions : (i) une **imagerie PTHG** qui repose sur le balayage de la polarisation d'excitation d'états linéaires situés le long de l'équateur de la sphère de Poincaré et (ii) une **imagerie C-L-THG** avec une polarisation d'excitation qui décrit des états linéaires et circulaires le long d'un méridien.

Nous avons ensuite illustré l'adéquation de notre système d'imagerie pour venir **sonder les orientations moléculaires ou les symétries** dans le plan d'imagerie sur des échantillons qui se déforment ou qui sont en mouvement à une échelle temporelle inférieure à la seconde sans subir d'artefacts de mesures liés au mouvement.

D'une part, en utilisant le mode P-THG, nous avons démontré sa capacité à **mesurer la désorganisation moléculaire induite par une transition de phase sur des structures lipidiques**, puis à **détecter la nature cristalline des particules d'otolithe** qui flottent dans l'oreille interne de l'embryon de poisson-zèbre. Pour ces acquisitions PTHG, nous avons développé une **nouvelle méthodologie d'analyse de l'ordre moléculaire par transformée de Fourier** pour extraire rapidement des informations des acquisitions PTHG.

D'autre part, nous avons montré le potentiel de ce système d'imagerie utilisant le mode C-L-THG pour **détecter des microstructures biréfringentes dans des échantillons biologiques dynamiques**. Nous avons caractérisé la sensibilité de notre système sur des échantillons modèles présentant des degrés divers d'anisotropie (gouttelettes d'huile, otolithe, MLVs), puis nous avons montré la capacité de notre système à détecter *in vivo* des vésicules biréfringentes dans les cellules intestinales du ver *c-elegans*. Nous avons développé ici un nouvel outil pour extraire des informations sur l'anisotropie des structures avec une **méthode ratiométrique à partir des images L-C-THG**.

# Chapitre 4

## Imagerie THG multi-échelle des tissus myélinisés dans le CNS de la souris et du poisson-zèbre

### Sommaire

4.1 Caractérisation des contrastes THG et P-THG dans le CNS de souris et du poisson-zèbre	126
4.2 Imagerie THG du cervelet de souris sur un modèle de sclérose en plaques	165

---

L'identification *in vivo* des changements pathologiques de la myéline dans le CNS humain à partir du contraste IRM est une étape décisive dans le diagnostic de pathologies neurodégénératives. Cependant l'intérêt des IRM 1T ou 3T - dont sont équipés les hôpitaux - est limité pour la détection de nouvelles lésions de petites dimensions dans la substance blanche, de lésions de taille quelconque dans la matière grise, ainsi que pour le diagnostic de changements pathologiques diffus dans la substance blanche d'apparence normale qui se développent chez des individus atteints de sclérose en plaques. Les techniques d'imagerie d'IRM 7T ou DIR 3T - récemment développées et encore peu déployées en milieu hospitalier - permettent de visualiser ces types de lésions grâce à leur meilleure sensibilité. Cependant leur résolution (de l'ordre de 200  $\mu m$ ) reste insuffisante pour résoudre des fibres individuelles de quelques microns de diamètre.

A l'inverse, le champ d'application des techniques d'imagerie résolues à l'échelle de l'axone unique est restreint à des tissus de faible épaisseur (de l'ordre de quelques centaines de microns) à cause de leur faible pénétration. Les microscopies de fluorescence confocales et à deux photons ont par exemple été utilisées avec succès pour imager *ex vivo* des tissus myélinisés fixés et des tranches vivantes, ainsi que pour l'imagerie *in vivo* de petits échantillons transparents comme le poisson-zèbre ou de souris via une fenêtre crânienne. Ces techniques d'imagerie requièrent toutefois un marquage de la myéline qui n'est pas toujours réalisable ou fiable.

A ce jour, l'utilisation des techniques d'imagerie optique sans marquage (OCT, SCoRe, CARS) capables de détecter des changements pathologiques dans la microstructure des tissus myélinisés comme la présence de fibres démyélinisées est encore marginale dans les études *in vivo*. De plus, la compréhension du contraste qu'elles fournissent sur les tissus myélinisés reste incomplète. Le développement de méthodes de microscopie quantitative sans marquage permettant de caractériser la myéline *in situ* reste un enjeu très important. Ce développement est souhaitable, non seulement pour extraire des informations robustes sur l'évolution des changements pathologiques à l'échelle de la fibre individuelle et du tissu dans la perspective d'une meilleure corrélation entre ces changements et les signes cliniques observés, mais également pour évaluer l'efficacité de traitements thérapeutiques dans le cadre d'essais cliniques.

Dans ce chapitre 4, nous montrons que la microscopie THG se positionne comme une technique prometteuse pour l'imagerie des tissus myélinisés non marqués grâce à sa résolution submicrométrique et sa grande sensibilité. En nous appuyant sur les avancements présentés dans les chapitres précédents (cf. chapitre 2 pour la compréhension du contraste P-THG sur des interfaces verticales entre des milieux d'indices différents et chapitre 3 pour le développement de la microscopie P-THG rapide), nous avons mené un travail exploratoire de **caractérisation multi-échelle des contrastes THG et P-THG *ex vivo* sur des tissus myélinisés de souris et *in vivo* des tissus de la moelle épinière du poisson-zèbre**. Nous avons ensuite mené une **étude applicative** de cette technique sur des tranches vivantes de cervelet de souris pour renseigner **le processus de myélinisation des fibres des cellules de Purkinje dans les folia**. L'étude des tissus de souris s'inscrit dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Bruno Stankoff qui travaille sur les mécanismes fondamentaux et l'aspect clinique de la myélinisation et de la remyélinisation de la sclérose en plaques à l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM) à l'hôpital de la Pitié Salpêtrière à Paris. Nous avons collaboré étroitement avec Bruno Stankoff, Anne Desmazières et Marie-Stéphane Aigrot pour concevoir les expériences, discuter la compréhension des contrastes observés et préparer les tissus imagés.

Nous présentons dans une première partie les résultats d'une **caractérisation extensive du contraste THG** sur des tissus myélinisés du CNS de souris et du poisson-zèbre. A partir d'acquisitions réalisées sur des tissus fixés de CNS de souris, nous montrons la capacité de l'imagerie THG à fournir une **description multi-échelle de l'architecture de la myéline, depuis la fibre myélinisée individuelle jusqu'aux faisceaux de matière blanche sur l'ensemble du tissu**. Nous allons voir que le contraste THG renseigne la diversité architecturale de la myéline à ces différentes échelles grâce à sa sensibilité aux axones myélinisés ayant une orientation longitudinale aussi bien qu'à ceux ayant une orientation transverse au plan d'imagerie. Pour renseigner le **contraste *in vivo*** et caractériser des **états de myélinisation évolutifs**, nous avons ensuite imagé des axones myélinisés chez le **poisson-zèbre au cours des stades précoces du développement**. Nous rapportons une caractérisation de l'évolution du contraste THG polarimétrique sur des axones myélinisés du poisson-zèbre de différents calibres - de diamètre de plusieurs microns pour les axones Mauthner et de l'ordre du micron pour les axones dorsaux. Enfin, nous avons mené une étude combinant des aspects expérimentaux et numériques sur les **contrastes THG et P-THG émergents de structures cylindriques modèles** qui reproduisent la géométrie des axones myélinisées avec des propriétés optiques simplifiées pour mieux comprendre le mécanisme de contraste THG sur des fibres myélinisées. Dans une seconde partie, nous présentons une **application de l'imagerie THG** pour renseigner **l'évolution du processus de myélinisation dans des tissus vivants de cervelet de souris non marqués**. Nous rapportons la capacité du contraste THG à fournir une cartographie d'ensemble des axones myélinisés des cellules de Purkinje regroupés en faisceaux de matière blanche à l'échelle de la tranche de cervelet, et détaillée sur les axones myélinisés individuels dans la matière grise des folia. Nous avons également décrit la **progression du processus de myélinisation des fibres** grâce à l'apparition progressive du contraste THG avec le développement de l'arborescence des fibres myélinisées à l'échelle des folia. La capacité - rapportée dans ce chapitre - de **tracer l'arborescence des fibres myélinisées** en s'appuyant sur une acquisition THG volumétrique d'un folium offre de nouvelles perspectives pour l'extraction future de paramètres morphologiques quantitatifs permettant de caractériser le motif de progression de la myélinisation. Nous mettons également en évidence la capacité des contrastes THG et THG polarimétrique à **révéler les propriétés optiques de l'axone myélinisé individuel** et à **distinguer des tissus de cervelet normaux et pathologiques**.

## 4.1 Caractérisation des contrastes THG et P-THG dans le CNS de souris et du poisson-zèbre

Malgré les premières démonstrations de la sensibilité du contraste THG sur des tissus myélinisés rapportées dans la littérature (cf. [94], [95], [97], [122]) la caractérisation du contraste THG sur des fibres myélinisées reste incomplète et le contraste PTHG dans ce contexte n'a pas encore été décrit ni analysé. Nous présentons dans cette partie une première **caractérisation extensive des contrastes THG et PTHG** sur des tissus myélinisés du CNS de souris et du poisson-zèbre.



### 4.1.1 Caractérisation de la sensibilité du signal THG sur les tissus myélinisés du CNS de souris

Dans cette sous-partie, nous décrivons les résultats d'un travail exploratoire sur le contraste THG à travers le **CNS d'un système murin** pour renseigner la sensibilité du signal THG sur les fibres myélinisées d'un modèle vertébré. Pour confirmer que le fort signal THG émergent des tissus myélinisés trouve son origine dans la gaine de myéline comme il a été rapporté précédemment par [94], [95], [97] et [122], nous avons imagé des tissus fixés de cerveau et de moelle épinière prélevés sur une souris transgénique *PLP-EGFP* adulte préparés comme indiqué dans l'encart 4.1. Cette lignée exprime le marqueur GFP sous le promoteur de la protéine protéolipidique (*PLP*) responsable de l'adhésion des couches cytoplasmiques dans la membrane de la myéline [157].

**Encart 4.1 - Matériel et méthode : Préparation des tranches fixées de cerveau et de moelle épinière de souris**

Le cerveau et la moelle épinière d'une souris transgénique *PLP-EGFP* adulte âgée de 3 mois sacrifiée ont été extraits puis découpés en tranches de 200 - 300  $\mu\text{m}$  d'épaisseur avec un chopper mécanique. Ces tranches ont été réalisées dans le plan frontal du cerveau, dans le plan sagittal du cervelet et dans les plans transverses et parallèles à l'axe de la moelle épinière. Après découpe, elles ont été fixées par immersion dans une solution de PFA pendant 30 mn et conservées au réfrigérateur à l'ICM avant d'être imagées dans notre laboratoire.

Nous avons acquis séquentiellement le signal de fluorescence par excitation à deux photons (2PEF) généré de manière spécifique par la myéline marquée, puis le signal THG. Les acquisitions présentées dans ce chapitre ont été réalisées avec l'objectif *Olympus XL Plan 25*  $\times$  à immersion à eau d'ouverture numérique  $NA = 1.05$  et une puissance sous l'objectif entre 20 *mW* et 30 *mW* pour la fluorescence et entre 70 *mW* et 100 *mW* pour la THG.

Dans les paragraphes suivants, nous présentons une **synthèse des caractéristiques du contraste THG obtenus sur les domaines myélinisés du CNS** présentés sur les figures 4.2 - 4.4.

#### a) Colocalisation du signal THG avec les axones myélinisés et identification des domaines de substance blanche et grise

Pour caractériser le signal THG émergent des substances blanches et grises et sa colocalisation avec le signal 2PEF issu des gaines de myéline, nous avons fait une première série d'acquisitions sur des champs de vue couvrant le **corps calleux** (CC) et le **cortex** (CTX) (cf. figure 4.1). On rappelle ici que le **corps calleux** (CC) - est un large **faisceau de substance blanche** du cerveau qui relie les deux hémisphères du cerveau, tandis que le **cortex** (CTX) constitue la **matière grise périphérique** des hémisphères cérébraux et présente une densité d'axones myélinisés beaucoup plus faible.

Les acquisitions réalisées sur un champ de dimension  $500 \times 500 \mu\text{m}^2$  font apparaître un contraste THG sur des domaines myélinisés identifiés grâce au signal 2PEF spécifique de la myéline marquée (cf. figure 4.1.a). On observe une **colocalisation de ces deux contrastes** sur l'ensemble des fibres dans le champ de vue, aussi bien sur les domaines plus ou moins fortement myélinisés. Cette colocalisation indique que les fibres myélinisées sont ici la **source principale du contraste THG**.

Nous allons voir que le signal THG permet d'identifier sans ambiguïté le cortex et le corps calleux grâce à l'aspect très différent du contraste THG issu de ces deux structures. Similairement au contraste 2PEF (cf. figure 4.1.c), le contraste THG (cf. figure 4.1.b) émergeant du **corps calleux** a un aspect relativement uniforme sur les denses faisceaux de fibres, et les fibres myélinisées individuelles ne sont pas discernables à cause de leur forte densité. En revanche, sur les deux régions du **cortex** - appartenant aux hémisphères cérébraux droit et gauche séparés par le sillon médian (SM) - on peut remarquer une grande hétérogénéité du contraste THG avec la présence de domaines submicrométriques isolés fortement contrastés qui proviennent des fibres myélinisées individuelles hors-plan, comme nous allons le voir plus en détail dans la sous-partie b).

On peut également noter que le contraste THG présente une résolution spatiale apparente légèrement meilleure que le contraste 2PEF, apparente notamment sur les fibres myélinisées du corps calleux. Cette différence entre les deux contrastes peut s'expliquer par leurs mécanismes de génération distincts : la THG est un processus cohérent du troisième ordre avec une dépendance avec le cube de l'intensité d'excitation, tandis que le 2PEF est un processus du second ordre avec une dépendance quadratique avec l'intensité d'excitation. Cette différence entre les ordres non-linéaires de ces deux processus est à l'origine d'un volume d'excitation de plus petite dimension pour le processus THG (cf. chapitre 1).

De plus, les niveaux de signaux THG moyens sont très différents sur les deux régions comme on peut le voir sur les histogrammes d'intensité THG déduits de ces domaines 4.1.d (cf. histogramme 4.1.e pour la 2PEF). Le corps calleux produit de forts signaux THG avec environ 400 photons/pixel dans nos conditions d'imagerie (resp. environ 1800 photons/pixel pour le signal 2PEF), tandis que les régions du cortex génèrent des contrastes sensiblement plus faibles avec en moyenne 150 photons/pixel pour la THG (resp. environ 50 photons/pixel pour la 2PEF). Ces histogrammes font apparaître une différence de sensibilité entre les contrastes THG et 2PEF qui peut s'expliquer par la singularité des mécanismes de génération de ces deux contrastes. En effet, le signal 2PEF évolue proportionnellement à la densité de fluorophores, tandis que le signal THG présente une réponse plus complexe avec deux régimes selon la dimension  $\phi_{struct}$  des structures par rapport à la longueur de cohérence  $l_c$  : pour  $\phi_{struct} < l_c/2$  le contraste THG augmente quadratiquement avec le nombre d'émetteurs, et lorsque  $\phi_{struct} > l_c/2$ , le contraste croît avec la taille de la structure mais avec une dynamique plus faible (cf. chapitre I.4).

En résumé, nous avons montré que la sensibilité du contraste THG aux fibres myélinisées est à l'origine de la génération de signal THG aussi bien sur la substance blanche que sur la substance grise, avec des aspects et des niveaux de signal moyen très différents qui permettent clairement de les identifier.

## b) Sensibilité du contraste THG sur les fibres myélinisées horizontales et verticales dans les couches corticales

Pour mieux caractériser la sensibilité du contraste THG sur des fibres individuelles dans les plans parallèles et transverses au plan d'imagerie, nous nous sommes intéressés à la structure du **cortex** qui présente une large distribution angulaire d'axones incluant des fibres transverses sur une coupe coronale.

Les images présentées sur la figure 4.2 proviennent d'acquisitions 3D en contrastes 2PEF et THG réalisées sur une région corticale à proximité du sillon médian, avec un échantillonnage fin ( $0.23 \times 0.23 \times 1 \mu m^3$ ) sur une profondeur de  $100 \mu m$ . Ces images font apparaître un **gradient d'intensité THG** (et 2PEF) entre le bas et le haut du champ ( $500 \times 500 \mu m^2$ ) qui résulte des variations spatiales de la densité et de l'orientation des fibres myélinisées entre les différentes couches corticales (cf. figure 4.2.a).

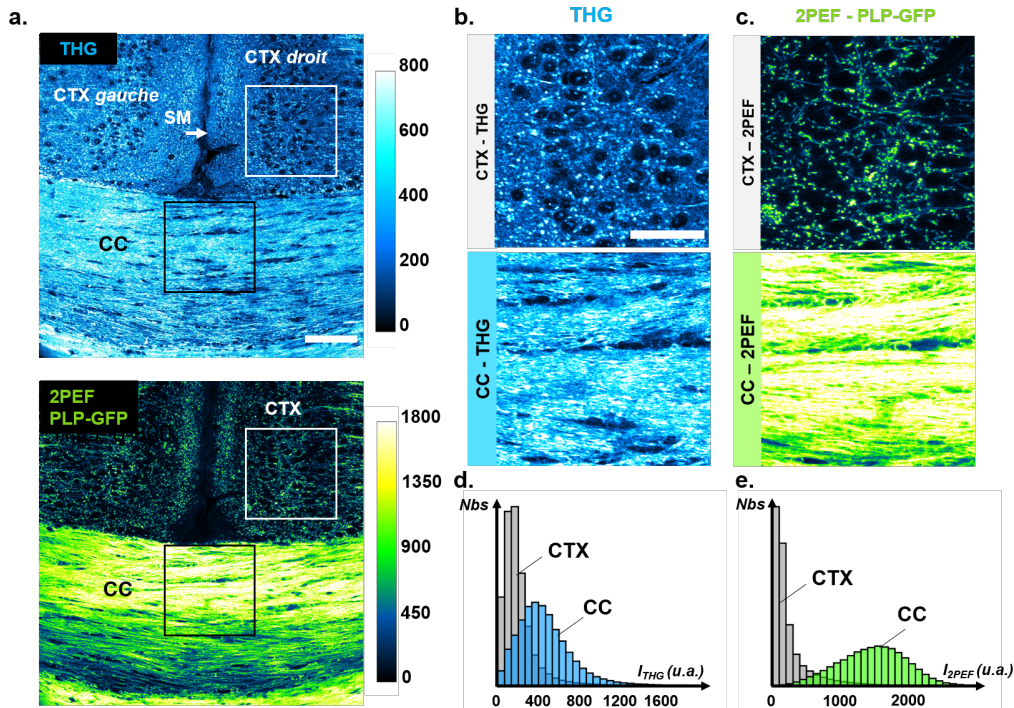


FIGURE 4.1 – a. Imagerie THG/2PEF sur un champ couvrant deux domaines du cortex (CTX) et une région du corps calleux (CC) de tissus fixés provenant d’une souris transgénique *PLP-EGFP*. Barre d’échelle :  $100\ \mu\text{m}$ . b. (c.) Agrandissements du contraste THG (resp. 2PEF) sur une région du corps calleux et du cortex, révélant le faisceau de fibres myélinisées dans le corps calleux et les axones individuels transverses sous l’aspect de domaines ponctuels fortement contrastés dans le cortex. Barre d’échelle du zoom :  $50\ \mu\text{m}$ . d. (e.) Histogrammes des intensités THG (resp. 2PEF) sur ces deux régions.

L’agrandissement du contraste THG (et 2PEF) sur un plan XY de la région 1 (cf. figure 4.2.b) fait apparaître des domaines de dimension submicrométrique d’intensité 2 à 5 fois supérieure à celle du fond. La reprojexion XZ moyennée sur une dizaine de pixels indique que le contraste THG provient d’**axones verticaux**. En revanche, la région 2 (cf. figure 4.2.c) présente une majorité de fibres parallèles au plan d’imagerie XY et une quasi-absence de fibres verticales sur la reprojexion XZ. L’orientation spécifique des fibres myélinisées sur ces deux domaines de la coupe coronale suggère que la région 1 se trouve dans la couche corticale I, tandis que la seconde région - avec des fibres parallèles dans le plan d’imagerie - est située dans les couches II ou III.

Par ailleurs, les profils THG et 2PEF superposés et normalisés (cf. figure 4.2.d et e) - tirés des domaines indiqués sur les figures 4.2.b et c, dans les plans XZ et XY respectivement - confirment la colocalisation de ces deux signaux à l’échelle submicrométrique. Le contraste THG trouve donc ici aussi son origine dans la présence de fibres myélinisées.

En résumé, l’apparition d’un fort contraste THG, colocalisé avec le contraste 2PEF, sur les fibres myélinisées du cortex démontre la **capacité du contraste THG à détecter des fibres myélinisées perpendiculaires au plan d’imagerie** (cf. figure 4.2). Le récent travail de Redlich et al. [96] de caractérisation du contraste THG sur le cortex de souris en configuration *in vivo* est venu confirmer ces observations sur le cortex et renseigne l’orientation des fibres selon les couches corticales.



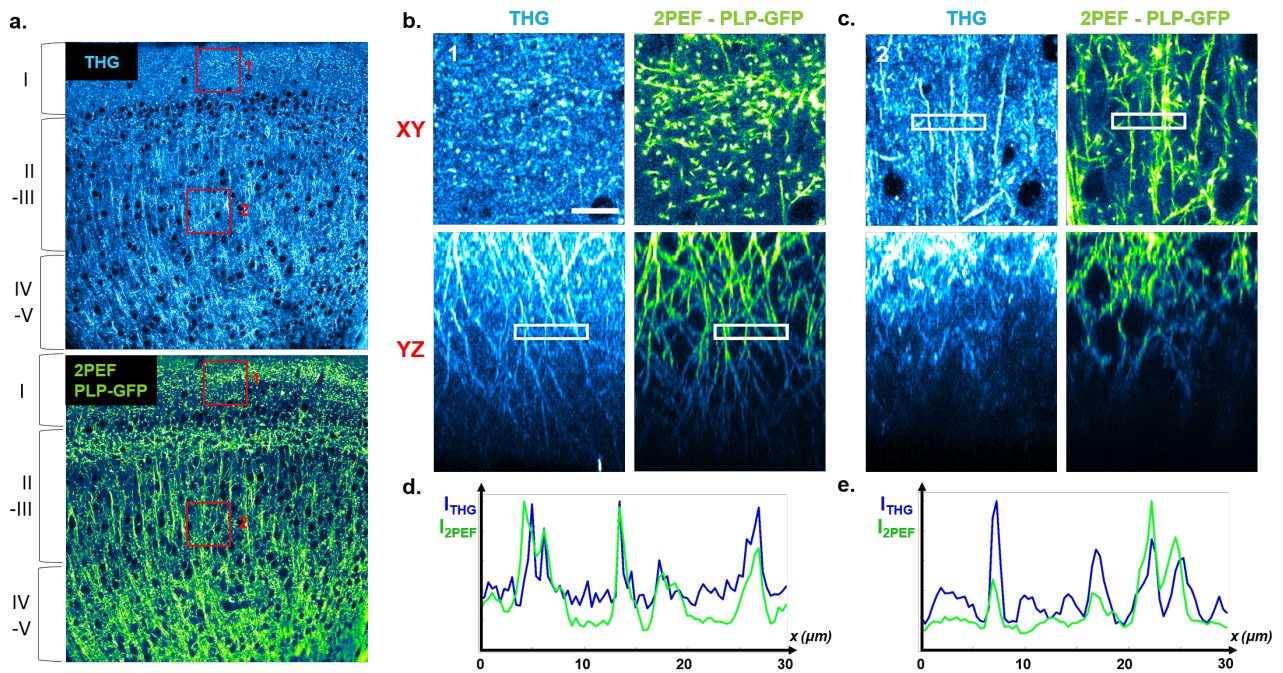


FIGURE 4.2 – a. Imagerie en contrastes THG et 2PEF à forte résolution d’une région du cortex à proximité du sillon médian. b. Zooms XY à  $15\ \mu\text{m}$  de profondeur et reprojction YZ sur la région 1 (couche corticale I). Visualisation des axones myélinisés sous l’aspect de domaines ponctuels micrométriques dans le plan XY et de domaines longilignes dans le plan XZ. Barre d’échelle du zoom :  $20\ \mu\text{m}$ . c. Zooms XY à  $15\ \mu\text{m}$  de profondeur et reprojction YZ sur la région 2 (couches corticales II & III). Visualisation des axones myélinisés sous l’aspect de domaines longilignes dans le plan XY et de domaines ponctuels micrométriques dans le plan XZ. d, (e.) Profils d’intensités THG et 2PEF superposés extraits des deux sous-domaines indiqués sur b. (c. respectivement).

### c) Diversité des contrastes THG dans la substance blanche et la matière grise du cerveau et de la moelle épinière

Nous avons ensuite cherché à renseigner le contraste THG dans d’autres domaines du CNS. Nous présentons sur la figure 4.3 des acquisitions réalisées dans le cerveau sur les régions du *caudoputamen* (CP) et du cervelet ainsi que dans la moelle épinière de souris.

Après avoir noté ici aussi la colocalisation des contrastes 2PEF et THG issus des fibres myélinisées sur chacune des régions imagées, on peut remarquer que la substance blanche est également à l’origine d’un fort signal THG (environ 500 photons/pixel) relativement homogène sur des domaines de plusieurs dizaines de microns. La matière grise fait apparaître un contraste fortement hétérogène et plus faible (environ 90 photons/pixel) que la substance blanche, caractérisé par un fort signal émergeant sur les fibres myélinisées individuelles éparses sur un fond très faiblement contrasté. Par exemple, dans le *caudoputamen*, les faisceaux de fibres myélinisées - qui relient les ventricules latéraux - apparaissent avec un fort contraste THG distinct de celui provenant de la matière grise.

On peut remarquer la présence additionnelle d'un signal THG non-spécifique de la myéline faiblement contrasté dans la matière grise, qui fournit une description intéressante de la **structure du tissu cellulaire**. Ce signal est généré par la présence de structures micrométriques comme les dendrites des cellules de Purkinje dans la couche moléculaire du cervelet (cf. figure 4.3) ou les nucléoles des noyaux des cellules gliales et diverses composantes cellulaires dans le cortex (cf. figure 4.1.b). Par ailleurs, on peut aussi noter l'absence de signal THG dans les noyaux des corps neuronaux étoilés et pyramidaux dans le cortex (cf. figure 4.1.b), ou les corps des cellules de Purkinje (cf. figure 4.3). Les noyaux ou corps cellulaires sont ainsi révélés en contraste négatif.

En bref, dans le cerveau et la moelle épinière, la **source principale de signaux THG provient des faisceaux d'axones et des fibres myélinisées individuelles**. Le contraste THG décrit avec précision la **diversité architecturale de la myéline** dans les substances blanche et grise, augmentée d'une description de la structure du tissu cellulaire associée à la composante non-spécifique de la myéline du contraste THG.

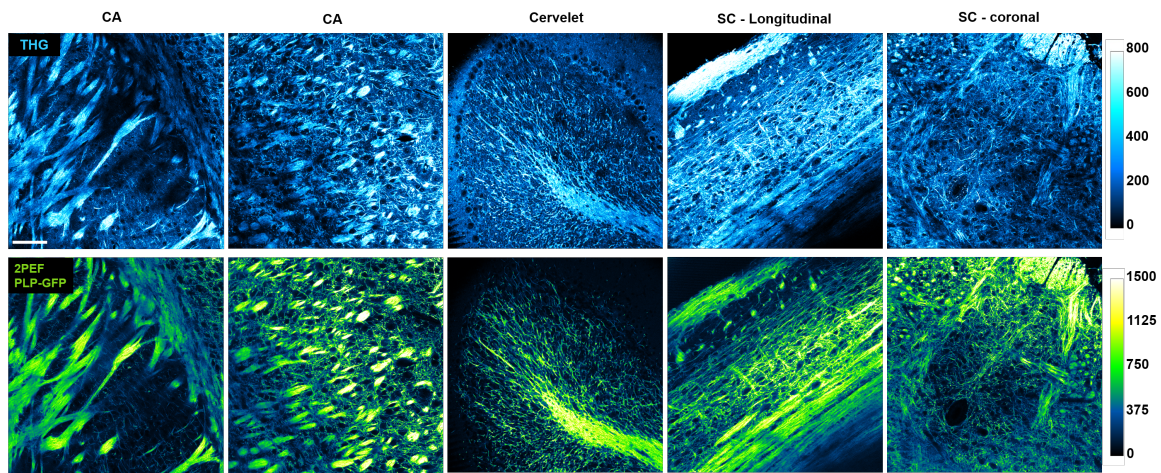


FIGURE 4.3 – Imagerie THG/2PEF sur différents tissus du CNS d'une souris transgénique *PLP-EGFP* (caudoputamen (CA), cervelet, moelle épinière en coupes longitudinale et coronale) révélant la diversité de l'architecture des fibres myélinisées dans la substance blanche et la matière grise.

#### d) Description structurelle multi-échelle de la moelle épinière de souris

Sur la base des observations précédentes, nous avons ensuite évalué la capacité de la microscopie THG à fournir une description multi-échelle d'un tissu myélinisé. Pour cela, nous avons considéré une section coronale de moelle épinière d'une souris normale sur laquelle nous avons réalisé des acquisitions THG à plusieurs échelles, depuis le tissu jusqu'à la fibre individuelle (cf. figure 4.4).

Nous avons commencé par décrire le contraste THG sur l'ensemble du tissu en réalisant une mosaïque ( $3 \times 3$  champs) à faible résolution moyennée sur plusieurs plans (cf. figure 4.4.c.). Sur ce large champ, on peut identifier les cordons ventraux, latéraux et dorsaux (décrits sur la figure 4.4.b) d'où émerge un fort contraste THG caractéristique de la **matière blanche** (MB). Les cornes ventrales et dorsales de la **matière grise** (MG) sont également visualisables grâce à un contraste THG plus faible et hétérogène, tandis que le canal central au centre de l'image apparaît avec un contraste négatif.



Nous avons ensuite imagé la région à proximité de la corne ventrale à haute résolution ( $0.23 \times 0.23 \times 1 \mu m^3$ ) pour visualiser les structures myélinisées à l'échelle micrométrique. Cette acquisition révèle les **fibres individuelles** avec un contraste THG remarquable : une multitude d'anneaux groupés de diamètres variables identifient les gaines de myéline individuelles dans les cordons spinaux transverses. En revanche, les axones myélinisés épars de la matière grise - sans orientation privilégiée - sont visibles soit sous l'aspect d'anneaux (indiqués par des triangles jaunes) lorsqu'ils ont une orientation transverse soit par deux traits rectilignes (indiqués par des flèches jaunes) lorsqu'ils sont contenus dans le plan d'imagerie. Ces anneaux ou traits rectilignes identifient les positions des gaines de myéline des fibres du tissu. En conclusion, le contraste THG présente une capacité formidable pour fournir une **description multi-échelle du tissu myélinisé**, depuis une échelle large - informative de la structure d'ensemble de la matière blanche et de la matière grise (qui suggère la possibilité de segmenter efficacement ces deux domaines) - jusqu'à la fibre myélinisée individuelle.

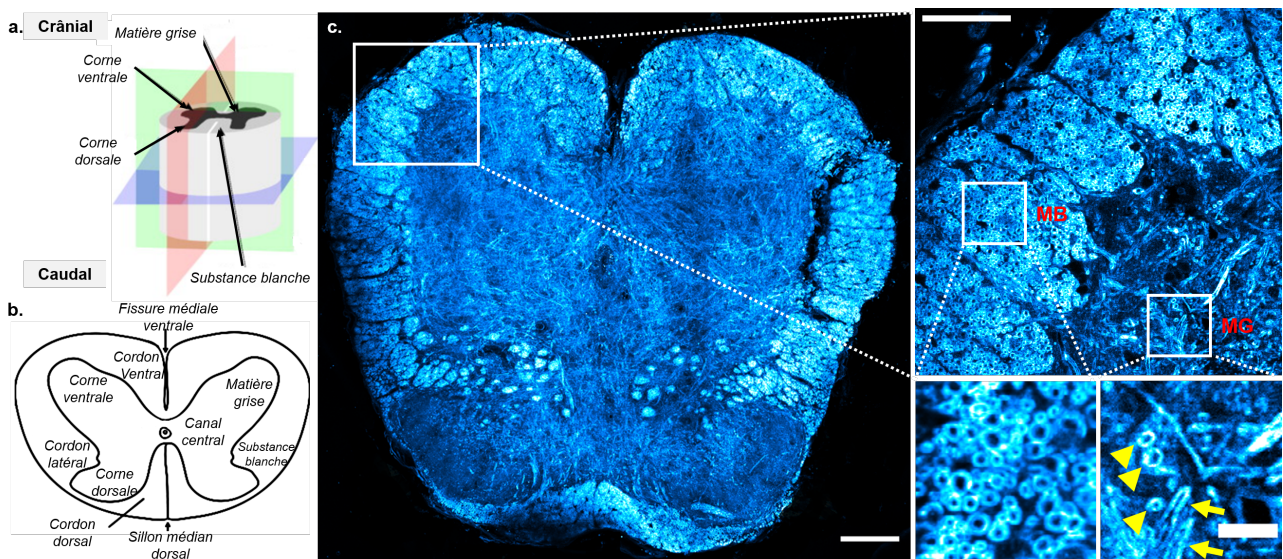


FIGURE 4.4 – (a) Schéma de la géométrie de la moelle épinière de souris. (b) Description de la structure de la moelle épinière dans le plan transverse (c) Imagerie THG d'un tissu fixé de moelle épinière de souris en coupe transverse. Echelle  $100 \mu m$ . Zoom sur la région de la corne ventrale. Echelle  $50 \mu m$ . Visualisation des gaines de myéline d'aspect annulaire dans la substance blanche et d'aspects annulaire et rectiligne dans la matière grise. Echelle  $10 \mu m$ .

## e) Conclusion

Les résultats présentés dans cette partie montrent qu'un contraste THG émerge de l'ensemble des tissus fixés du CNS de la souris en raison de sa **forte sensibilité aux fibres myélinisées** quelle que soit leur orientation par rapport au plan d'imagerie. Nous avons notamment observé que le contraste THG qui émerge de la substance blanche est relativement uniforme et présente intensité de 5 à 8 fois supérieure à celle qui apparaît sur la substance grise et qui présente également un contraste plus hétérogène. De plus, nous avons montré la capacité de l'imagerie THG à fournir une **description structurelle multi-échelle** depuis le tissu - en mettant en évidence sa capacité remarquable à renseigner la **diversité architecturale des fibres myélinisées** en distinguant la matière blanche de la matière grise - jusqu'à la **fibre individuelle myélinisée** en révélant les gaines de myéline.



### 4.1.2 Caractérisation du contraste THG polarimétrique dans la moelle épinière du poisson-zèbre à différents stades de la myélinisation

Bien que les échantillons fixés soient un bon support pour une caractérisation préliminaire des contrastes d'imagerie, ils ne présentent pas la complexité d'un environnement *in vivo* dynamique avec des états de myélinisation évolutifs. Pour cette raison, nous nous sommes ensuite intéressés au modèle du poisson-zèbre qui est un support adéquat pour l'imagerie des fibres myélinisées pendant le processus de myélinisation embryonnaire. Nous présentons ici une caractérisation *in vivo* de **l'évolution du contraste THG polarimétrique sur des fibres myélinisées de la moelle épinière du poisson-zèbre présentant plusieurs degrés de myélinisation**. Cette étude a pour objectif de renseigner la capacité de cette modalité à fournir des **informations quantitatives pertinentes et robustes sur l'évolution de la morphologie et de la structure moléculaire des gaines de myéline**.

Dans les paragraphes suivants, après avoir rappelé des aspects clés du processus de myélinisation chez le poisson-zèbre, nous décrivons l'évolution temporelle des contrastes THG et P-THG sur deux types d'axones reticulospinaux : les **axones dorsaux** - qui présentent un diamètre d'environ un micron - et les **axones Mauthner** - dont le diamètre est compris entre 3 à 6 microns aux stades considérés. Nous discutons enfin les avantages et limites de la PTHG pour l'imagerie du développement de la gaine de myéline selon le diamètre axonal des fibres.

#### a) Le poisson-zèbre : un modèle d'intérêt pour l'imagerie *in vivo* du processus de myélinisation

Le poisson-zèbre est un modèle largement utilisé pour explorer des processus dynamiques, et en particulier pour étudier la myélinisation. Il est important de rappeler que le processus de myélinisation présente de grandes similitudes avec le processus de remyélinisation dont la compréhension est fondamentale pour développer de nouvelles stratégies remyélinisantes dans la perspective de soigner des pathologies démyélinisantes. C'est la raison pour laquelle la myélinisation du poisson-zèbre est par exemple utilisée comme support d'étude pour identifier certains régulateurs chimiques et pour tester rapidement l'efficacité de thérapies remyélinisantes en utilisant des stratégies de criblage *in vivo* sur des molécules potentiellement remyélinisantes.

En nous appuyant sur les revues [158], [159], [160], nous présentons ici quelques éléments informatifs pour aborder la suite de notre étude sur la myélinisation du CNS du poisson-zèbre.

#### - Le poisson-zèbre, un modèle privilégié pour l'imagerie *in vivo*

Le poisson-zèbre (*Danio rerio*) - membre de la famille téléosté - est un organisme modèle alternatif au modèle rongeur - davantage chronophage et coûteux - pour l'investigation *in vivo* du processus de myélinisation. Il présente notamment les atouts suivants :

1) Une grande similitude entre l'ultrastructure et la composition de la myéline du poisson-zèbre (protéine basique de la myéline *Mbp*, protéine zéro de la myéline *Mpz* et protéine protéolipidique *Plp*) avec celles des mammifères - ainsi qu'une conservation des mécanismes moléculaires incluant des cascades de signalisation et des facteurs de transcription (*Nkx2.2*, *Sox10*, *Olig1*, *Olig2*) spécifiques des oligodendrocytes - qui font de cet organisme un modèle pour **l'étude de la myélinisation des vertébrés**.

2) Le développement très rapide et l'efficacité des manipulations génétiques sur les poissons-zèbres permettent de **générer rapidement et efficacement des nouvelles lignées**.

3) Son développement externe, sa transparence optique et sa petite taille rendent possible **l'imagerie *in vivo*** de l'intégralité du CNS du poisson-zèbre en microscopie optique de ma-

nière non invasive.

4) Son développement très rapide permet de suivre l'**intégralité du processus de myélinisation** sur une dizaine de jours.

5) La centaine d'oeufs par ponte et une maintenance peu contraignante en font également un **modèle peu coûteux**.

#### - Anatomie et physiologie de la moelle-épineuse du poisson-zèbre

La structure de la moelle épinière du poisson zèbre - représentée sur la figure 4.5.a - comprend deux domaines distincts : la **substance blanche** composée des axones réticulospinaux (Mauthner, ventraux et dorsaux) et la **matière grise**.

Les **axones Mauthner** sont deux larges fibres nerveuses qui partent des cellules de Mauthner - localisées dans le cerveau postérieur - et croisent la ligne médiane pour descendre dans la moelle épinière vers leurs cibles postsynaptiques, les neurones moteurs contralatéraux, qui innervent les muscles axiaux. En réponse à un stimulus auditif, vibratoire ou tactile, les cellules Mauthner déclenchent une réponse de fuite, appelée réponse de démarrage en C (*C-start response*). Le déclenchement de cette réponse est initié par la transmission d'un message issu des cellules Mauthner à destination des muscles axiaux par l'intermédiaire des axones Mauthner et des neurones moteurs contralatéraux. En réponse à ce message, les muscles du tronc et de la queue du poisson se contractent alternativement, ce qui lui donne un aspect courbé en forme de C. Ces contractions musculaires provoquent une propulsion rapide du poisson vers l'avant. Du fait du calibre et de l'importance primordiale des axones Mauthner dans la survie des poissons, ce sont les premiers axones du poisson-zèbre à être myélinisés, ce qui lui assure dès les premiers jours une fuite rapide grâce à une coordination musculaire rapide et performante.

Les axones réticulospinaux ventraux et dorsaux sont issus respectivement de cellules MiV1 (*middle rhombencephalon, ventral, level 1*) et MiM1 (*middle rhombencephalon, median, level 1*) et descendent ipsilatéralement. Les **axones ventraux** - adjacents aux axones Mauthner - forment des faisceaux descendants assurant la transmission des informations de commande tandis que les **axones dorsaux** ascendants transmettent l'information sensorielle. Ces deux faisceaux d'axones sont également fortement myélinisés.

Au centre de la substance blanche se trouve la **matière grise** de la moelle épinière - constituée des corps cellulaires des neurones - qui entoure le canal central contenant le liquide céphalorachidien.

La structure de la moelle épinière est entourée par deux membranes : la **pie-mère** et la **dure-mère**.

#### - Dynamique temporelle du mécanisme de myélinisation de la moelle épinière

La dynamique temporelle de la myélinisation de la moelle épinière du poisson-zèbre a été décrite précisément à travers plusieurs études (cf. [162], [163], [164], [165], [166]) dont nous récapitulons les étapes principales ci-dessous en faisant référence aux illustrations de la figure 4.5 :

(i) Environ 10 heures après l'apparition des cellules Mauthner (7-9 hpf) est initiée son extension axonale (axone Mauthner) dont le diamètre a été estimé entre  $0.6 \mu\text{m}$  et  $1.2 \mu\text{m}$ . La formation de cette extension procède par la migration du cône de croissance de la cellule Mauthner le long de la moelle épinière avec une vitesse continue et régulière d'environ  $100 \mu\text{m}/\text{h}$ . Le cône de croissance atteint la région rostrale de la moelle épinière autour de 20 hpf, et une heure plus tard (21 hpf) les embryons sont capables de répondre aux stimuli grâce à l'initiation des fonctions synaptiques. Les neurones MiM1 sont formés vers 10-12 hpf et la formation de leur extension

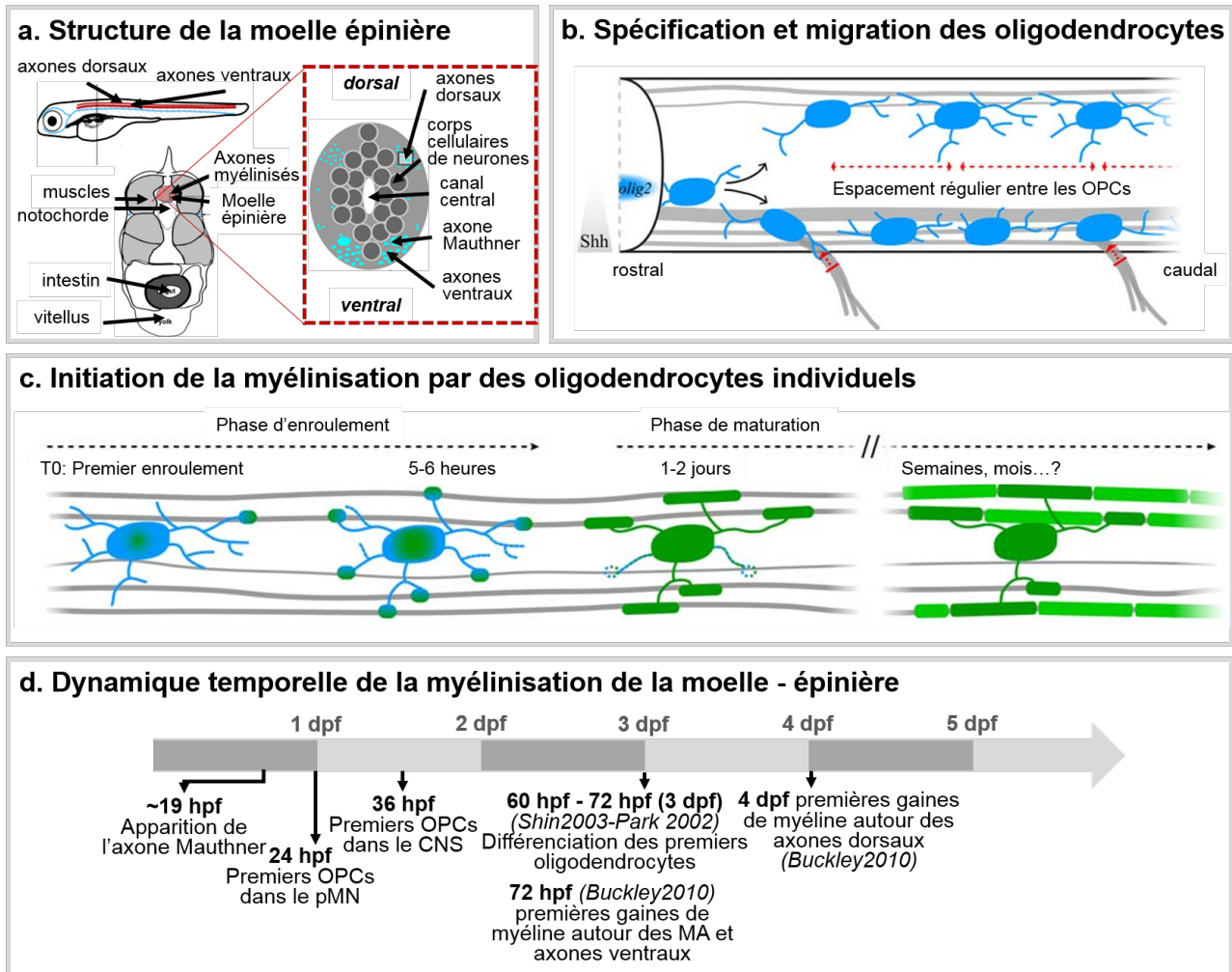


FIGURE 4.5 – Processus de myélinisation de la moelle-épineuse du poisson-zèbre. a. Schéma d'une section transverse de la moelle épinière. Adapté de [161]. b. Spécification et migration des oligodendrocytes c. Initiation de la myélinisation par des oligodendrocytes individuels. Adapté de [159]. d. Dynamique temporelle de la myélinisation des axones de la moelle-épineuse du poisson-zèbre.

axonale débute vers 20 hpf, tandis que les neurones MiV1 apparaissent plus tardivement vers 20-27 hpf et leurs axones vers 30 hpf [166].

(ii) Après la spécification des cellules progéniteurs du pMN (primary Motor Neural) autour de 16 - 18 hpf, les premières cellules précurseurs des oligodendrocytes (OPCs) de la moelle épinière apparaissent autour de 24 hpf dans le domaine pMN de la zone ventriculaire, puis elles prolifèrent et entament leur migration vers les régions axonales cibles pour occuper uniformément les tissus du CNS à partir de 36 hpf (cf. figure 4.5.b) [162].

(iii) A partir de 60 hpf / 72hpf [162], les premiers OPCs se différencient en oligodendrocytes matures qui présentent une forme asymétrique et expriment la protéine basique de la myéline (*mbp*) (cf. figure 4.5.c).

(iv) Cette étape de différenciation est suivie d'une phase exploratoire courte (environ 5 heures) très dynamique pendant laquelle les oligodendrocytes développent leurs extensions, contactent

les axones et forment des internodes pour identifier la totalité des axones qu'ils vont myéliniser [163] (cf. figure 4.5.c). Les premières gaines de myéline ont été rapportées vers 3 dpf autour des axones Mauthner et des axones ventraux adjacents et autour de 4 dpf autour des axones dorsaux [164].

(v) Au terme de cette période exploratoire, une minorité (28 %) des extensions se rétracte, tandis que la majorité (72 %) des extensions est conservée entre 2 et 7 dpf. Les premières gaines de myéline sont présentes à partir de 54 hpf/3-4 dpf autour des axones Mauthner [165]. Deux jours après l'initiation de la myélinisation, les oligodendrocytes ne forment plus aucune gaine de myéline [163].

(vi) Le processus de myélinisation se poursuit avec la compaction des gaines de myéline dont la dynamique temporelle n'est pas bien établie, certaines études rapportent la présence des premières gaines de myéline compactes vers 4 dpf tandis que d'autres la décrivent vers 7 dpf. La myélinisation de l'axone Mauthner s'étale sur une courte période de 3 dpf à 10 dpf tandis que celle des axones secondaires de la moelle épinière dure environ un mois. De plus, le processus de myélinisation présente un gradient spatial avec une progression depuis la région antérieure vers la région postérieure du poisson-zèbre.

Une fois formées, les gaines de myéline peuvent survivre durant toute l'existence du poisson. Par ailleurs, il existe chez le poisson-zèbre un processus de remyélinisation efficace pour régénérer la myéline sur des portions d'axones grâce à la présence permanente d'OPCs capables de se différencier en oligodendrocytes tout au long de sa vie.

#### - Evolution du diamètre axonal et de l'épaisseur de la gaine de myéline

Un aspect qui nous intéresse tout particulièrement pour notre étude sur l'évolution temporelle du contraste THG et PTHG sur les axones de la moelle épinière concerne l'**évolution des dimensions des axones et de leur gaine de myéline**. Buckley et al. [164] ont caractérisé précisément l'évolution du diamètre des axones réticulospinaux au cours du développement embryonnaire ainsi que le *g-ratio* (rapport entre le diamètre axonal - sans la myéline - et celui de l'axone myélinisé, cf. schéma sur la figure 4.6.c). A partir des valeurs du diamètre axonal  $\phi_{axone}$  et du *g-ratio*  $g$  rapportées entre 3 dpf et 15 dpf par [164], nous avons estimé l'ordre de grandeur de l'épaisseur de la myéline de ces axones ( $R = \frac{1-g}{2g} \phi_{axone}$ ) (cf. figures 4.6.b, d). Les informations qui nous seront directement utiles pour la compréhension ultérieure des contrastes sont résumées sur la figure 4.6, tandis que les données complètes sont réunies dans l'annexe E. Buckley et al. ont rapporté que le diamètre axonal des **axones Mauthner** augmente linéairement, passant de 3.5 à 7.1  $\mu m$  entre 3 et 10 dpf, tandis que le *g-ratio* - évalué à 0.91 - conserve une valeur constante au cours du développement grâce à une forte régulation de l'épaisseur de la myéline en fonction du diamètre axonal (cf. figure 4.6.a). L'épaisseur de la gaine de myéline déduite de ces données présente une augmentation linéaire en passant de 0.17  $\mu m$  (inférieure à la résolution latérale) à 3 dpf et à 0.35  $\mu m$  (bords de la myéline résolus latéralement) à 10 dpf (cf. figure 4.6.b).

A la différence de l'axone Mauthner, les **axones ventraux** et **dorsaux** conservent un diamètre constant à partir de 3 dpf, environ égal à 1.2  $\mu m$  et 1.0  $\mu m$  respectivement (cf. figure 4.6.d). Leur *g-ratio* - évalué à 0.86 et 0.89 - permet de remonter à des épaisseurs de la gaine de myéline de 0.09  $\mu m$  et 0.06  $\mu m$  qui sont trop petites pour que leur interfaces interne et externe puissent être résolues en microscopie THG.

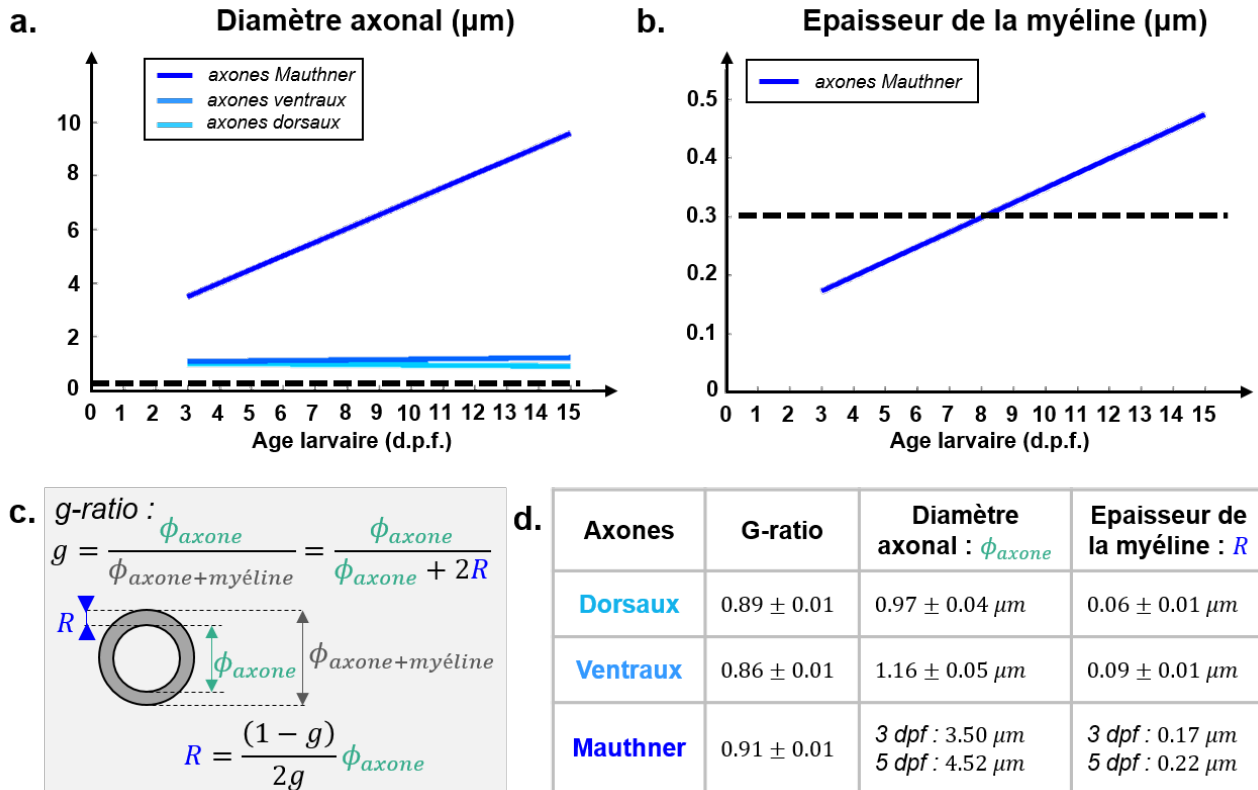


FIGURE 4.6 – Evolution des dimensions des axones myélinisés réticulospinaux au cours du développement. a. Courbes de tendance de l'évolution des diamètres des axones dorsaux, ventraux et Mauthner en fonction du stade de développement rapportés dans l'étude [164]. b. Courbe de tendance de l'évolution de l'épaisseur de la gaine de myéline de l'axone Mauthner en fonction de l'âge, calculée à partir du g-ratio et du diamètre axonal donnés par [164]. La ligne en pointillé indique la résolution latérale du volume d'excitation pour la THG. c. Schéma illustratif des grandeurs considérées. d. Tableau récapitulatif des valeurs de g-ratio et des diamètres axonaux rapportées et des épaisseurs de myéline estimées.

## b) Description multi-échelle de la structure de la moelle épinière du poisson-zèbre en contraste THG

Nous avons débuté notre étude sur l'embryon de poisson-zèbre en renseignant le contraste THG sur la moelle épinière. Pour identifier les axones myélinisés d'intérêt, nous avons réalisé des acquisitions multimodales séquentielles en contrastes THG et 2PEF sur des poissons issus de deux lignées transgéniques, la première lignée, *Tg(sox10:mRFP)*, possède un marquage spécifique des cellules de la lignée des oligodendrocytes (cellules précurseurs des oligodendrocytes ou OPCs, oligodendrocytes prémyélinisants et myélinisants), tandis que la seconde, *Tg(mbp:mCherry-CAAX)*, présente uniquement un marquage de la myéline dans les oligodendrocytes matures. Les caractéristiques de ces lignées sont présentées dans l'encart 4.2. Le protocole de montage des embryons pour l'imagerie et les conditions d'acquisitions sont détaillés dans l'encart 4.3.



**Encart 4.2 - Matériel et méthode : Lignées des poissons-zèbres**

La lignée  $Tg(sox10 :mRFP)$  - fournie par l'équipe de Bruce Appel - exprime la protéine fluorescente rouge  $mRFP$  sous le contrôle du promoteur  $sox10$  présent dans les cellules de la lignée des oligodendrocytes (précurseurs des oligodendrocytes, oligodendrocytes myélinisants) [167]. La seconde lignée  $Tg(mbp :mCherry-CAAX)$  - construite par le laboratoire de David Lyons - exprime la protéine  $mCherry-CAAX$  sous le promoteur de la protéine  $mbp$  spécifique des membranes cellulaires de la myéline [168]. Ces deux lignées sont mises en reproduction régulièrement et élevées dans l'animalerie du LOB.

**Encart 4.3 - Matériel et méthode : Procédure de préparation des embryons de poissons-zèbres et conditions d'imagerie multiphotonique**

Les embryons âgés de 48 hpf à 5 dpf issus de chacune de ces lignées ont été préparés de manière similaire aux embryons dédiés à l'imagerie des particules d'otolithe endogènes présentés dans le chapitre précédent. Après avoir éventuellement retiré mécaniquement les chorions résiduels, les embryons ont été anesthésiés par immersion dans une solution de tricaine diluée à 0.016 % à partir d'une solution de base (*MS-222 Sigma, St. Louis, MO, USA*) et de l'eau provenant de l'animalerie. Ils ont ensuite été incorporés dans de l'agarose à basse température de fusion (*Invitrogen, cat 15517014, Carlsbad, CA, USA*), puis montés sur une lamelle de verre scellée sur le fond d'une petite boîte de Petri en les orientant sur un flanc (sauf indication contraire) avant d'être immobilisés avec la solidification de l'agarose. Un petit volume de la solution de tricaine déjà mentionnée a été ajouté dans la boîte de Petri pour maintenir l'anesthésie pendant l'imagerie de l'échantillon avec l'objectif  $25 \times$  à immersion. La température de l'échantillon sous l'objectif coïncidait avec la température ambiante ( $20^{\circ}\text{C}$ ). Les deux signaux 2PEF/P-THG ont été acquis séquentiellement avec des conditions d'imagerie identiques (fréquence pixel =  $100 \text{ kHz}$ , échantillonnage latéral :  $2.3 \mu\text{m}$ , accumulations = 4 à  $\lambda_{\omega} = 1100 \text{ nm}$ ) mais des puissances différentes (signal 2PEF :  $P_{\omega} = 20 - 30 \text{ mW}$ , signal THG :  $P_{\omega} = 70 \text{ mW}$ ).

**- Description structurelle de la partie postérieure du poisson-zèbre avec le contraste THG**

Avant de nous intéresser spécifiquement aux axones myélinisés de la moelle épinière, nous proposons d'apporter un élément contextuel en situant la moelle épinière par rapport aux autres structures de la partie postérieure de l'embryon de poisson-zèbre. Sur la figure 4.7.a, nous présentons une reprojexion XZ d'une pile d'acquisitions XY en contraste THG superposée au contraste 2PEF qui ont été réalisées sur le tronc d'un embryon de la lignée  $Tg(sox10 :mRFP)$  âgé de 5 dpf (de l'anglais, *days post fertilization*) et orienté latéralement. La composante du contraste THG issue des structures micrométriques du tissu et non-spécifique de la myéline fournit une image morphologique détaillée de l'anatomie de la partie postérieure de l'embryon dans le plan transverse à la moelle épinière : on peut notamment identifier les **nageoires dorsale et ventrale** et la **notochorde** entourée des **muscles** dont on distingue principalement les interfaces externes. Grâce à la profusion des cellules gliales présentes à ce stade du développement dans la moelle épinière, le contraste 2PEF - spécifique des précurseurs des oligodendrocytes (OPCs) - permet de localiser précisément la **moelle épinière** située entre la nageoire dorsale



et la notochorde.

### - Identification des axones réticulospinaux dans le plan XY en contraste THG

Dans un second temps, pour identifier sans ambiguïté le contraste THG qui provient des axones myélinisés en s'appuyant sur le contraste de fluorescence, il paraît plus aisé d'imager des poissons issus de la lignée transgénique *Tg(mbp :mCherry-CAAX)* avec un marquage spécifique des oligodendrocytes myélinisants. C'est également sur cette seconde lignée qu'ont été réalisées l'ensemble des acquisitions présentées dans la suite de cette sous-partie.

Sur l'acquisition multimodale réalisée à forte résolution dans un plan parallèle à la moelle épinière d'un embryon âgé de 3.5 dpf orienté sur le flanc, la moelle épinière est facilement reconnaissable entre la notochorde et les muscles dorsaux (cf. figure 4.7.b). Le signal 2PEF se manifeste au niveau de l'axone Mauthner par deux lignes fortement contrastées renseignant la position des gaines de myéline dans le plan équatorial de l'axone, et sur les axones ventraux - entre l'axone Mauthner et la notochorde - et sur les axones dorsaux - à proximité des muscles dorsaux.

On observe que le signal THG apparaît sur l'ensemble de la structure de l'axone Mauthner et sur les axones dorsaux et ventraux avec un fort sursignal par rapport au signal provenant du tissu cellulaire environnant. Cette dernière observation confirme le fait que la myéline est une **forte source de contraste THG** dans le CNS du poisson-zèbre, similairement au CNS de souris.

### - Identification des axones réticulospinaux dans un plan XZ en contraste THG

Enfin, nous avons visualisé le contraste THG dans un plan transverse de la moelle-épineière à partir d'une reprojexion XZ d'une pile d'acquisitions XY réalisées à plusieurs profondeurs sur un poisson âgé de 5 dpf orienté sur le ventre (cf. figure 4.7.c).

A ce stade du développement, la structure des axones Mauthner (MA) fait apparaître le signal THG le plus contrasté, colocalisé avec le signal 2PEF et d'**aspect annulaire**. On peut ici souligner la grande similitude entre ce profil annulaire dans le plan XZ et celui observé les fibres de la moelle épinière de souris dans le plan XY (cf. figure 4.4.c), obtenus tous deux sur un plan transverse de moelle épinière. De plus, un signal THG important se manifeste aussi sur les axones ventraux (AV) - à proximité immédiate de l'axone Mauthner - et sur les axones dorsaux (AD) sous l'apparence de domaines de dimension submicrométrique distribués sur des régions localisées.

Un faible contraste THG non-spécifique de la myéline permet également d'identifier les membranes des corps cellulaires (CC) des neurones de la matière grise. Un contraste THG faible et diffus émerge également du tissu entre la matière grise et la pie-mère (PM) qui délimite la moelle épinière.

### - Conclusion

En tirant profit de la composante du signal THG non-spécifique de la myéline, nous avons cartographié l'anatomie de la partie postérieure de l'embryon de poisson-zèbre dans un plan transverse, ce qui nous a permis de localiser précisément la moelle épinière.

Nous avons ensuite mis en évidence que la myéline des axones Mauthner, ventraux et dorsaux induit un **fort contraste THG**, confirmé par sa colocalisation avec le signal 2PEF spécifique de la myéline. En particulier, le contraste THG qui émerge de l'axone Mauthner présente un **aspect annulaire** dans un plan transverse, dont nous chercherons à comprendre l'origine dans la sous-partie 4.3 avec le modèle des pipettes étirées. On peut déjà remarquer la différence de contraste THG qui émerge de l'ensemble de l'axone Mauthner (axone et myéline) à 3.5 dpf (cf.

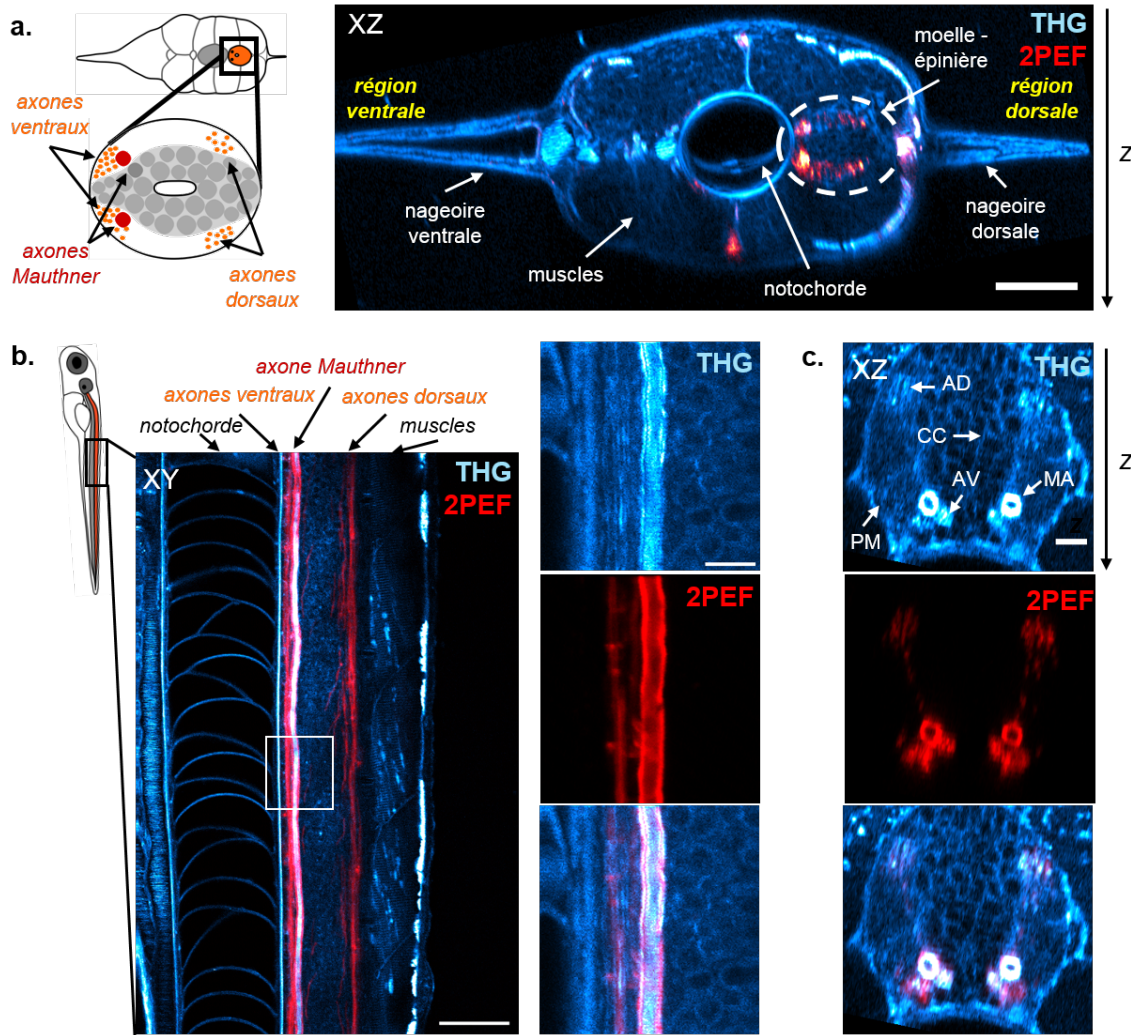


FIGURE 4.7 – Imagerie THG/2PEF combinée sur la moelle épinière du poisson-zèbre. a. Re-projection XZ des contrastes à partir d’une acquisition 3D sur un poisson-zèbre transgénique *Tg(sox10 :mRFP)* âgé de 5 dpf orienté sur le flanc. Echelle :  $50 \mu\text{m}$ . b. Imagerie XY sur un poisson transgénique *Tg(mbp :mCherry-CAAX)* âgé de 3.5 dpf . Echelle :  $50 \mu\text{m}$ . Zoom sur un petit domaine de l’axone Mauthner. Echelle :  $10 \mu\text{m}$  c. Re-projection XZ des contrastes sur la moelle épinière d’un poisson-zèbre de la même lignée âgé de 5 dpf orienté sur le ventre. Echelle :  $10 \mu\text{m}$

figure 4.7.b) et de celui d’aspect creux qui caractérise l’axone à 5 dpf (cf. figure 4.7.c), ce qui indique que le contraste THG issu des axones évolue au cours du développement de l’embryon. Dans la suite, nous allons chercher à caractériser la sensibilité du contraste THG polarimétrique sur des axones myélinisés de différents calibres en utilisant les outils développés au chapitre précédent. A partir d’une caractérisation de l’évolution temporelle des paramètres qui rendent compte de l’organisation moléculaire (modulation PTHG et angle  $\phi_0$ ) dans des structures organisées, nous allons chercher à décrire la formation des gaines de myéline qui entourent les **axones dorsaux** et les **axones Mauthner**.

### c) Evolution temporelle du contraste THG polarimétrique sur les axones dorsaux

Nous avons commencé l'étude du contraste THG polarimétrique (PTHG) sur des axones myélinisés en nous intéressant aux **axones dorsaux** qui sont des fibres de petits calibres. Nous présentons dans un premier temps une caractérisation du contraste PTHG généré sur ces structures à 3 *dpf* et 5 *dpf*, sur laquelle nous nous appuyerons pour renseigner dans un second temps l'évolution du contraste sur ces axones entre 3 *dpf* et 5 *dpf*.

#### - Caractéristiques du contraste THG polarimétrique sur les axones dorsaux

Nous avons observé l'apparition des contrastes THG et 2PEF provenant du marquage de la lignée transgénique *Tg(mbp :mCherry-CAAX)* détectables sur les axones dorsaux autour de 3 *dpf*, qui indique la présence de ces axones myélinisés dès 3 *dpf*, c'est-à-dire plus précocement que ce qui a été rapporté dans l'étude de Buckley et al. [164].

Nous présentons sur la figure 4.8 les différents supports utiles pour la caractérisation des signaux PTHG : l'image 2PEF ( $P_\omega = 20 \text{ mW}$  sous l'objectif) acquise séquentiellement avec les images PTHG ( $P_\omega = 80 \text{ mW}$ ), et les cartes des deux paramètres (la modulation PTHG et l'angle  $\phi$ ) extraits *a posteriori* de la pile d'images PTHG grâce à l'analyse de Fourier décrite dans le chapitre 3. Les **acquisitions en contraste PTHG** ont été obtenues pour un ensemble de polarisations d'excitation linéaires avec une composante au premier ordre parallèle au plan  $xy$  et orientée entre  $0^\circ$  et  $170^\circ$  par rapport à l'axe  $y$  avec un pas de  $10^\circ$  (cf. figure 4.8.a).

Les images en contraste THG font apparaître une **forte dépendance du sursignal THG émergent du faisceau d'axones** avec l'orientation de la polarisation d'excitation. Cette dépendance est caractérisée par un maximum du sursignal THG lorsque la polarisation d'excitation est à  $90^\circ$  de l'axe  $y$  (signal PTHG90) - i.e. orthogonale au faisceau (courbe bleue de la figure 4.8.a) - et un minimum pour une polarisation à  $0^\circ$  de l'axe  $y$  (signal PTHG0) - i.e. parallèle au faisceau (courbe verte de la figure 4.8.a).

Le signal 2PEF, qui provient spécifiquement des gaines de myéline des axones, fait apparaître distinctement les axones individuels (cf. figure 4.8.b). La collection quasi-simultanée du signal de fluorescence avec le signal THG garantit la similitude des domaines imagés sur les deux acquisitions, ce qui permet *in fine* de comparer les deux signaux à l'échelle micrométrique. A l'exception du contraste THG émergent du tissu cellulaire environnant - absent sur l'image 2PEF - le sursignal PTHG (et en particulier le signal PTHG90) apparaît largement colocalisé avec le signal 2PEF le long des fibres myélinisées.

La **carte de modulation PTHG** donne des valeurs importantes et relativement homogènes sur des pixels alignés le long du faisceau d'axones myélinisés, qui traduit la forte dépendance du signal THG avec l'orientation de la polarisation (cf. figure 4.8.c).

Enfin, la **carte angulaire** fait ressortir une majorité de pixels avec des valeurs angulaires proches de  $90^\circ$ , ce qui confirme que l'intensité PTHG90 domine les intensités PTHG associées aux autres orientations de la polarisation sur les axones myélinisés (cf. figure 4.8.d).

Pour obtenir des informations plus précises sur les positions relatives des signaux PTHG/2PEF, sur les valeurs de la modulation PTHG et du paramètre angulaire  $\phi_0$  sur les fibres individuelles myélinisées, nous avons extrait les **profils de ces 4 paramètres** en fonction de la position en  $x$  en tirant profit du parallélisme des fibres avec l'axe  $y$ . Les profils PTHG et 2PEF ont été calculés par moyennage des contrastes sur quelques lignes de l'image. Les profils de modulation et d'angle ont ensuite été extraits par le biais d'une analyse par transformée de Fourier sur les profils PTHG à une dimension spatiale.



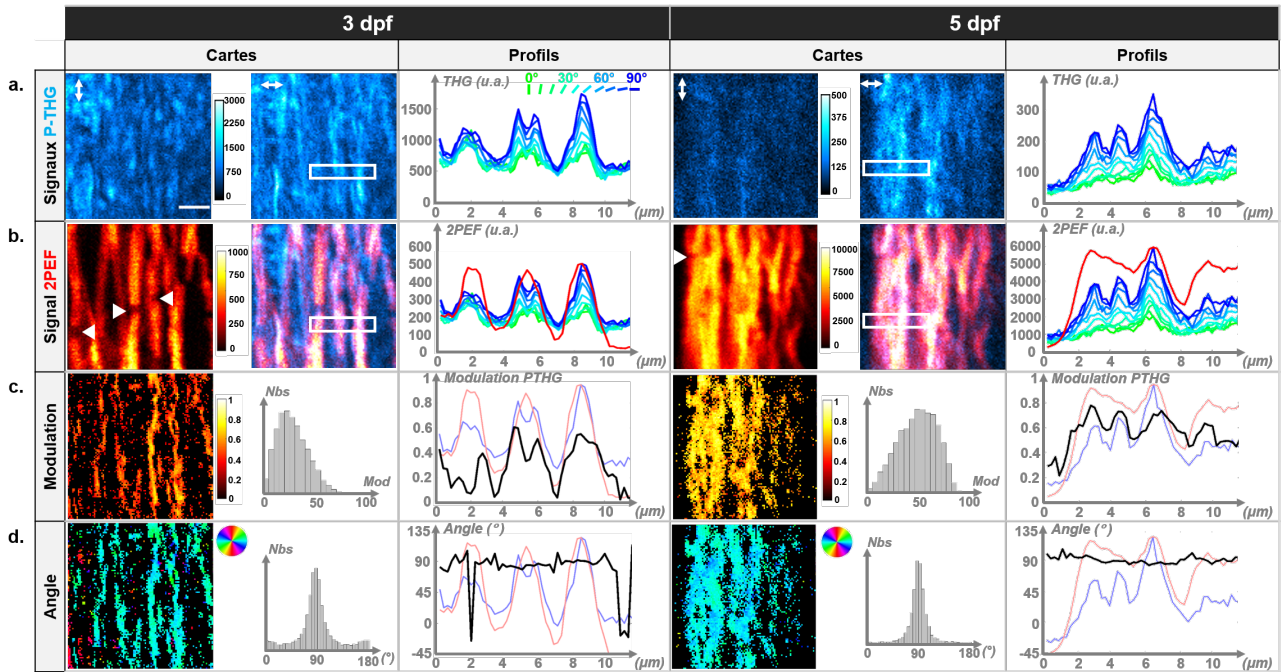


FIGURE 4.8 – Caractérisation du contraste THG polarimétrique sur les axones dorsaux myélinisés à 3 *dpf* et 5 *dpf*. a. Contrastes THG sur les axones dorsaux associés à une polarisation d’excitation orientée à 0° (PTHG0) et à 90° (PTHG90) de l’axe  $y$ . b. Contrastes 2PEF. c. Cartes de modulation. d. Cartes angulaires (paramètre  $\phi_0$ ).

Les **profils PTHG90 et 2PEF** superposés font apparaître une colocalisation du sursignal THG avec le signal 2PEF. Alors que le signal 2PEF présente des pics uniques avec une largeur à mi-hauteur proche de  $2 \mu\text{m}$  sur les fibres, le sursignal THG sous le pic 2PEF présente soit un pic avec une largeur à mi-hauteur d’environ  $1.5 \mu\text{m}$ , soit deux pics plus minces espacés d’environ de  $1 \mu\text{m}$ . Cette différence entre les profils THG et 2PEF peut être expliquée en première approximation par la meilleure résolution latérale et axiale du contraste THG par rapport au contraste 2PEF. Compte tenu de la gamme de valeurs estimées par Buckley et al. pour les diamètres des axones dorsaux ( $0.5 - 2 \mu\text{m}$ ), la dimension des axones par rapport à la résolution du contraste THG joue en effet un rôle important dans sa capacité à distinguer les bords des axones myélinisés. En réalité, le mécanisme de contraste THG est complexe, et ce point donnera lieu à une discussion dans la sous-partie 3 en s’appuyant sur des simulations numériques de THG par des structures cylindriques de petit diamètre.

Les **18 profils PTHG** superposés - associés à 18 orientations différentes de la polarisation d’excitation - mettent également en évidence la forte dépendance du signal THG avec l’orientation de la polarisation d’excitation (cf. figure 4.8.a). Le **profil de modulation** caractérise plus précisément ces variations en faisant ressortir des valeurs de modulation importantes (entre 0.4 et 0.6 au niveau des maxima) sur les domaines colocalisés avec ceux donnant un fort contraste 2PEF (cf. figure 4.8.b). Par conséquent, les signaux PTHG90 ou la modulation PTHG sont deux paramètres qui apparaissent efficaces pour identifier distinctement les axones dorsaux myélinisés.

Le **profil angulaire** confirme que le signal THG acquis sur les axones dorsaux avec une polarisation incidente orientée à 90° de l’axe  $x$  domine celui obtenu pour les autres orientations de la polarisation d’excitation (cf. figure 4.8.d).

On peut noter que les **nœuds de Ranvier** entre les internodes des gaines de myéline sont facilement identifiables par une interruption du contraste 2PEF (indiqué par des triangles blancs) le long des axones mais qu'il apparaît plus difficile de les distinguer avec le contraste THG sur des axones de cette taille.

#### - Evolution du contraste PTHG au cours du développement

Au cours du développement des embryons de poissons-zèbres entre 3 *dpf* et 5 *dpf*, le contraste THG fait apparaître une densification du faisceau des axones dorsaux (cf. figure 4.8). Pour caractériser les changements de l'épaisseur de la myéline et la contribution éventuelle de l'ordre lipidique, nous avons ensuite caractérisé l'évolution de la modulation PTHG sur des poissons-zèbres toutes les 12 heures entre 3 *dpf* et 5 *dpf* qui est représentée sur la figure 4.9. Les amplitudes de modulation ont été calculées en appliquant sur la carte de modulation un filtre sur la valeur du  $R^2 = 0.5$  au premier ordre et sur l'intensité THG pour éliminer les pixels avec un faible contraste.

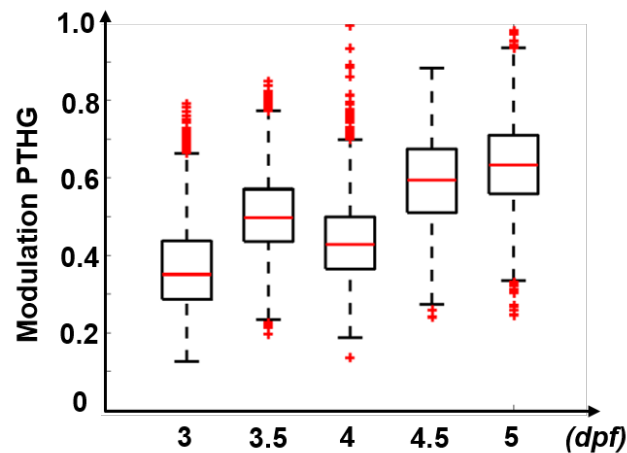


FIGURE 4.9 – Caractérisation de l'évolution de la modulation PTHG sur les axones dorsaux.

On peut observer que la valeur médiane de l'amplitude de modulation augmente de 0.35 à 0.63 - entre 3 *dpf* et 5 *dpf* (cf. figure 4.9.a). Cette augmentation significative de la modulation traduit *a priori* de manière conjointe l'augmentation de la densité des lipides et de leur organisation dans les gaines de myéline.

#### - Conclusion sur le contraste THG polarimétrique issu des axones dorsaux

Le contraste THG présente une **grande sensibilité sur les axones dorsaux myélinisés** dont la gaine de myéline est sous-résolue en microscopie THG. Le contraste THG polarimétrique se révèle comme un outil efficace pour identifier les axones individuels grâce au **sursignal généré sur les fibres pour une polarisation d'excitation orthogonale au faisceau** (cf. figure 4.8). Nous avons également vu que la dépendance du signal THG avec l'orientation de la polarisation - caractérisée par le paramètre de modulation - augmente de manière significative entre 3 et 5 *dpf* (cf. figure 4.9). Comme la dimension des axones ventraux est inchangée entre les stades 3 *dpf* et 5 *dpf* [164], cette augmentation de la modulation est directement attribuable à l'**augmentation du volume de la myéline et de l'ordre lipidique** autour des axones. Par ailleurs, en comparaison avec le contraste 2PEF, le contraste PTHG possède une meilleure capacité à résoudre les axones individuels grâce ses plus grandes résolutions axiale et latérale, et présente également l'avantage de ne pas présenter de photoblanchiment.

#### d) Evolution temporelle du contraste THG polarimétrique sur les axones Mauthner

Dans cette sous-partie, nous nous intéressons à la sensibilité du contraste THG polarimétrique sur les **axones Mauthner** dont le calibre est largement supérieur à celui des axones dorsaux. Nous décrivons dans un premier temps les **composantes d'amplitude et de phase du contraste PTHG** généré sur ces structures à partir des cartes et des profils extraits sur un segment de l'axone. Cette caractérisation servira dans un second temps à renseigner l'**évolution du contraste PTHG émergeant de ces axones** aux stades précoces de développement. Soulignons que la méthode d'analyse basée sur l'extraction des paramètres à partir des cartes s'est avérée convaincante pour caractériser l'évolution du contraste sur des faisceaux denses d'axones de petits calibres, cependant l'analyse des profils est ici la méthode la plus appropriée pour extraire des informations sur des axones myélinisés individuels de large diamètre, dont la myéline apparaît distincte de l'axone. Dans le but d'extraire des profils robustes - par le biais d'un moyennage de la réponse le long des axones - tout en conservant la précision submicrométrique des acquisitions, nous avons amélioré notre processus d'extraction de profils pour corriger la courbure de l'axone et son écart angulaire par rapport à l'axe  $y$ . Cette amélioration consiste dans le développement d'un **algorithme de recalage des lignes** de la pile d'images PTHG et de l'image 2PEF grâce à une opération de convolution. Avant de présenter les premiers résultats sur les axones Mauthner, nous détaillons dans le paragraphe suivant ce programme de recalage spécifiquement développé pour ce type d'axones de large calibre.

##### - Opération de recalage des lignes

Nous décrivons ci-dessous les étapes de l'**opération de recalage des lignes** - illustrées sur la figure 4.10 - qui ont été appliquées de manière systématique à l'image 2PEF et à la pile d'images P-THG :

- *Délimitation de la région d'intérêt :*

L'étape préliminaire du traitement des images consiste à délimiter une région d'intérêt de petites dimensions (ici  $L_x = 40$  px;  $L_y = 30$  px) pour sonder un domaine d'intérêt où le plan équatorial de l'axone est confondu avec le plan d'imagerie (cf. fig.4.10.a). Par ailleurs, la courbure de l'axone ne doit pas être trop importante pour que le recalage soit possible sans induire d'artefacts.

- *Calcul de la matrice de convolution  $\mathcal{M}_C$  :*

L'opération de recalage des lignes repose sur l'évaluation de la correspondance de chaque ligne par rapport à la première grâce à l'opérateur du produit de convolution. Le produit de la convolution de chaque ligne avec la première ligne - choisie comme référence du recalage - est estimé sur toutes les images de la pile PTHG pour optimiser la robustesse du résultat, et les coefficients issus des produits de convolution sont stockés dans une matrice 3D  $\mathcal{M}_C$  de dimensions  $L_x \times (2L_y - 1) \times N_P$  (cf. fig.4.10.b).

- *Calcul du plan de convolution  $\mathcal{P}_C$  :*

La matrice  $\mathcal{M}_C$  est ensuite sommée suivant la troisième dimension associée aux polarisations et le résultat est stocké dans une matrice 2D  $\mathcal{P}_C$  (cf. fig.4.10.c).

- *Identification de la position des maxima de convolution :*

Par définition, le maximum des coefficients de convolution donne la meilleure correspondance entre les lignes. Par conséquent, l'identification du coefficient maximum sur chaque ligne de la matrice  $\mathcal{P}_C$ , puis le calcul de la distance relative de sa position (en pixels) par rapport à l'axe longitudinal médian indique la correction à apporter à chaque ligne (cf. fig.4.10.d).

- *Recalage des lignes des piles d'images PTHG et 2PEF :*

Une fois la correction appliquée, la nouvelle pile d'images est enregistrée pour l'extraction des profils (cf. fig.4.10.e).



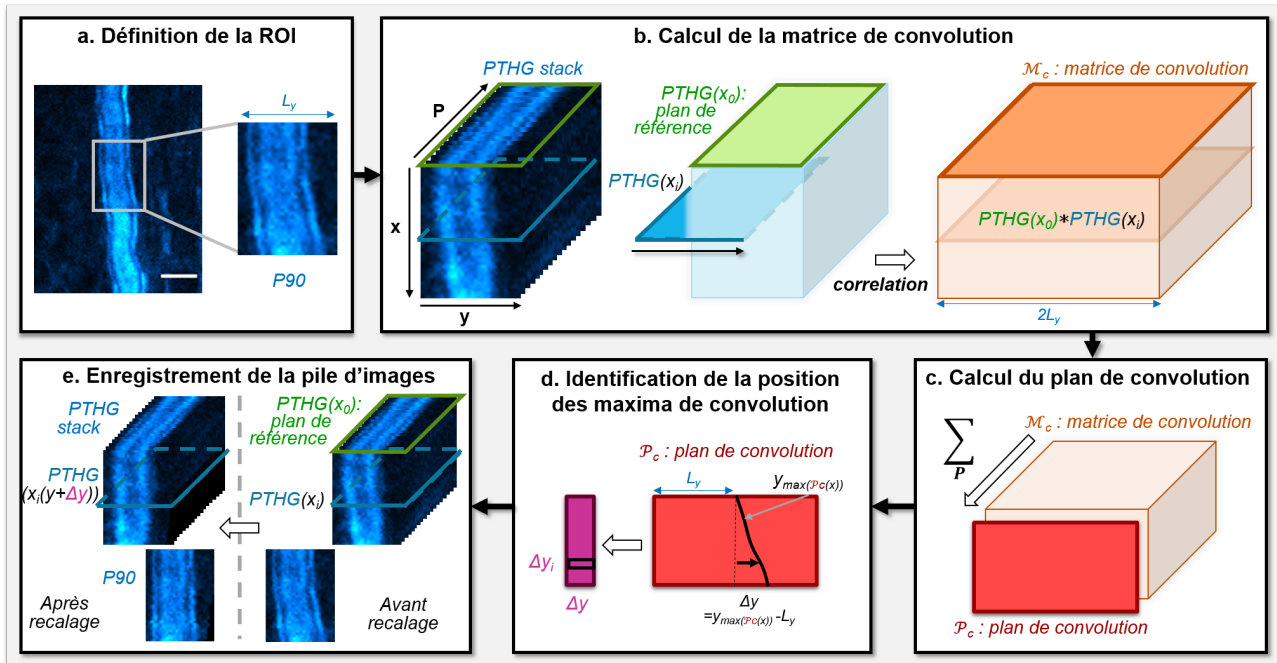


FIGURE 4.10 – Description de la méthode de traitement des images pour l'extraction des profils. a. Définition de la ROI. b. Calcul de la matrice de convolution. c. Calcul du plan de convolution. d. Identification de la position des maxima de convolution. e. Enregistrement de la pile d'images.

### - Analyse des profils évalués sur les axones Mauthner

Grâce à la correction appliquée, des profils robustes d'intensités PTHG et 2PEF peuvent être extraits de la pile d'acquisitions THG polarimétrique et de l'image 2PEF. Les profils d'angle et de modulation PTHG sont ensuite calculés par une analyse de Fourier unidimensionnelle à partir des profils P-THG. Nous allons décrire successivement les amplitudes et positions relatives des maxima des profils P-THG superposés (cf. figure 4.11.a), des profils 2PEF (cf. 4.11.b), de l'amplitude de modulation (cf. 4.11.c) et du paramètre angulaire (cf. 4.11.d) sur le segment d'un axone Mauthner myélinisé.

Le profil rouge sur la figure 4.11.b. qui décrit l'intensité du **signal 2PEF** issu du marquage *mbp-mCherry* de la myéline est le profil le plus facilement interprétable. Il révèle deux pics de forte intensité dont la position des maxima fournit avec une bonne approximation l'emplacement des centres des gaines de myéline dans le plan longitudinal. Quant à l'intensité du signal 2PEF, elle donne ici une information intéressante sur le degré de myélinisation de l'axone par sa dépendance linéaire avec le nombre de fluorophores *mcherry* liés à la protéine *mbp* dans la gaine de myéline.

Les **profils P-THG** superposés sur la figure 4.11.a. font apparaître 4 pics : les deux pics centraux présentent une faible variation d'intensité avec l'orientation de la polarisation d'excitation, tandis que l'intensité des deux pics les plus externes expriment une forte dépendance vis-à-vis de l'orientation de la polarisation d'excitation. Sur ces pics externes, la plus forte intensité THG est observée pour une polarisation d'excitation perpendiculaire à l'axone (profil PTHG<sub>90</sub>), tandis que la polarisation d'excitation parallèle à l'axone permet à peine de les distinguer sur le profil PTHG<sub>0</sub>.

La présence inattendue des pics centraux peut être attribuée à un phénomène de refocalisation du faisceau induit par la courbure de l'interface horizontale supérieure de l'axone myélinisé spécifique à des fibres de ce calibre. Comme ce signal ne contient pas d'informations sur la myé-

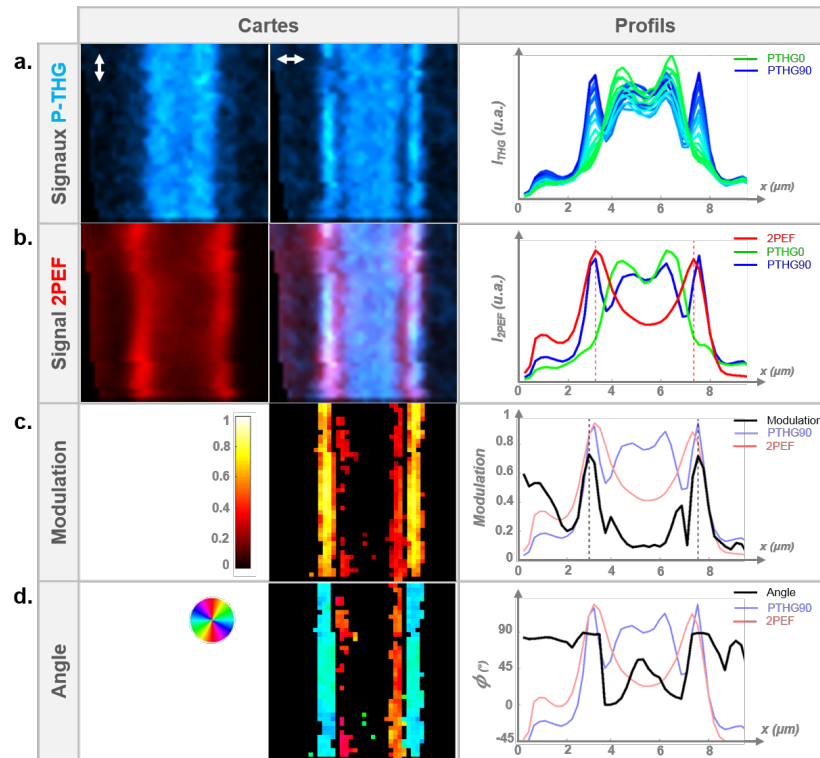


FIGURE 4.11 – Analyse des profils à partir des acquisitions 2PEF et PTHG sur une portion d’axone Mauthner d’un poisson-zèbre âgé de 4 *dpf*. a. Images recalées du contraste THG pour des polarisations d’excitation orientées à  $0^\circ$  (PTHG0) et  $90^\circ$  (PTHG90) de l’axe  $y$ . Profils d’intensité PTHG extraits de la pile d’images PTHG acquises pour des orientations de polarisation d’excitation entre  $0^\circ$  et  $170^\circ$  avec un pas angulaire de  $\Delta\theta = 10^\circ$ . b. Contraste 2PEF et superposition des contrastes 2PEF et PTHG90. Profils des intensités 2PEF, PTHG0 et PTHG90. c. Carte de modulation PTHG. Profil de modulation superposé aux profils 2PEF et PTHG90. d. Carte PTHG angulaire. Profil angulaire superposé aux profils 2PEF et PTHG90.

line, nous n’y ferons plus référence dans cette sous-partie, cependant nous y reviendrons dans la sous-partie suivante en discutant les résultats des simulations numériques sur le contraste THG issu des structures cylindriques.

La superposition des profils 2PEF, PTHG0 et PTHG90 (qui sont les profils THG correspondant aux extrema d’intensité THG sur les bords externes) sur la figure 4.11.b., fait apparaître la **colocalisation des pics externes sur les profils PTHG avec les pics du profil 2PEF**, ce qui indique que la forte modulation PTHG observée sur les bords de l’axone trouve son **origine dans la structure de la gaine de myéline**. Cette observation fournit également une méthode pour estimer le diamètre des fibres myélinisées à partir de la mesure de la distance entre les deux pics externes du profil PTHG90.

Le **profil de modulation**, tracé en noir sur la figure 4.11.c., présente une forte amplitude sur les bords de l’axone, où la modulation atteint 70 % sur cet exemple, tandis qu’elle demeure modérée (environ 10 %) au centre. La superposition du profil de modulation avec les profils PTHG90 et 2PEF confirme le fait que cette forte modulation du signal PTHG sur les bords externes trouve son origine dans la myéline. Par conséquent, la mesure de l’amplitude des deux pics de modulation sera un paramètre clé pour évaluer la progression de la myélinisation de l’axone Mauthner.

Enfin, l'étude du **profil angulaire** à partir de la figure 4.11.d montre que l'orientation de la polarisation d'excitation qui maximise le signal THG sur la fibre myélinisée est perpendiculaire à l'axone au niveau de la myéline et - de manière étonnante - parallèle à l'axone sur la région interne à proximité immédiate de la myéline. La compréhension de la dépendance angulaire du contraste THG sur la fibre myélinisée sera approfondie dans la partie 1.3 de ce chapitre en nous appuyant sur des expériences menées sur des pipettes de verre étirées conjointement à des simulations menées sur des structures cylindriques modèles qui reproduisent la géométrie des axones myélinisés avec des propriétés optiques simplifiées.

### - Capacité à détecter des états de myélinisation distincts sur un même axone

En nous appuyant sur la caractérisation des signaux rapportée précédemment, nous avons ensuite testé la capacité du contraste PTHG à détecter des **états de myélinisation distincts sur des domaines d'un même axone Mauthner** à un stade de développement donné. On rappelle ici que le processus de myélinisation des axones Mauthner procède séquentiellement avec la formation simultanée par les oligodendrocytes de plusieurs internodes très courts autour des axones, puis leur épaissement parallèlement avec leur allongement pour former les nœuds de Ranvier.

Pour évaluer la capacité du contraste PTHG à différencier des états de myélinisation distincts sur deux domaines proches d'un même axone, nous avons imagé successivement en contrastes 2PEF et PTHG des régions présentant deux segments avec des degrés différents de myélinisation en nous appuyant sur le contraste 2PEF autour de 60 *hpf*. La figure 4.12.a présente un exemple d'imagerie combinée 2PEF/PTHG sur un embryon âgé de 60 *hpf*. Le contraste 2PEF permet distinctement d'identifier la présence de la gaine de myéline autour d'un segment d'axone formée par un oligodendrocyte en haut de l'image (1), et un état de myélinisation moins avancé sur le segment en bas de l'image (2). L'extraction des cartes de modulation sur des petits segments de ces deux domaines, puis des profils associés (cf. figure 4.12.b) a mis en évidence dans ce cas une différence significative de la valeur de la modulation PTHG sur ces deux segments : 70.6 % sur le segment 1, contre : 53.4 % sur le segment 2.

Nous avons ensuite réalisé une étude statistique pour évaluer s'il existe de manière reproductible une corrélation entre l'intensité THG, la valeur de la modulation PTHG et l'intensité 2PEF mesurée sur les bords de l'axone (cf. figure 4.13).

Les mesures d'intensité THG et de modulation PTHG réalisées sur des segments d'axones avec une intensité 2PEF moyenne de 125 et 236 photons/pixel (cf. figure 4.13.b) présentent une différence d'amplitude de la modulation PTHG légère mais significative avec une valeur moyenne de 0.58 et 0.64 respectivement (cf. figure 4.13.a), et une différence non-significative de l'intensité THG avec une valeur moyenne de 150 et 163 photons/pixel (cf. figure 4.13.c).

La différence de modulation PTHG associée à la différence d'intensité 2PEF mesurée suggère que l'amplitude de modulation est ici un **paramètre sensible de la progression de l'enroulement des bicouches de myéline** autour de l'axone. Identiquement au résultat sur l'augmentation de la modulation PTHG sur les axones dorsaux observée entre 3 *dpf* et 5 *dpf*, cette augmentation de la modulation peut être expliquée par la présence de déformations plus importantes du volume focal lorsque l'épaisseur de la myéline augmente conjointement avec l'ordre lipidique.

### - Evolution temporelle du signal PTHG sur les axones Mauthner

Nous avons ensuite étudié l'évolution des contrastes PTHG et 2PEF sur la myéline des axones Mauthner au cours du développement des embryons entre 2 *dpf* et 5 *dpf* dont les résultats sont présentés sur les figures 4.14 et 4.15.

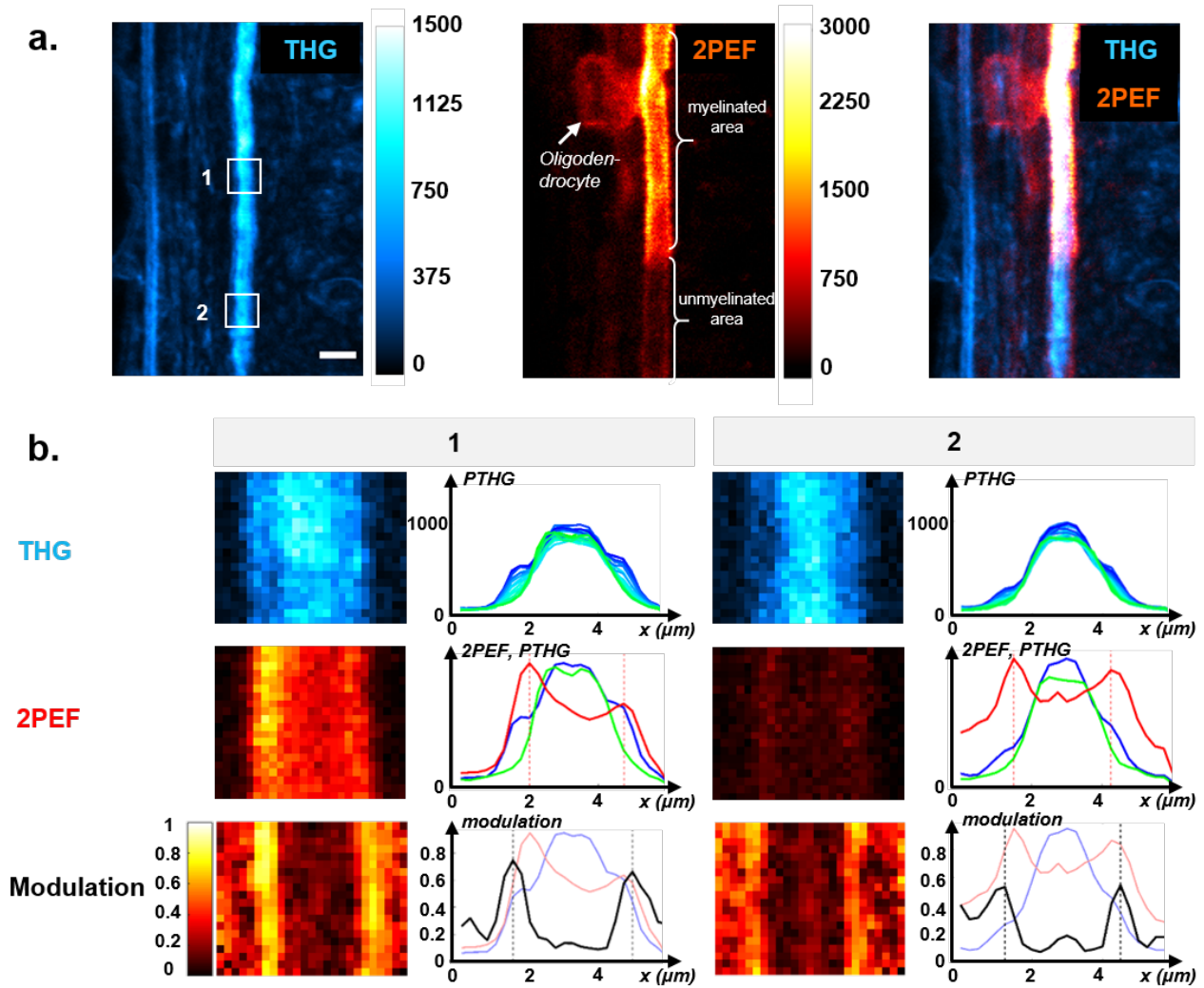


FIGURE 4.12 – Caractérisation des contrastes 2PEF, PTHG et de la modulation PTHG au voisinage des internodes sur un embryon de poisson-zèbre âgé de 60 *hpf*. a. Imagerie des contrastes THG et 2PEF sur un domaine de l'axone Mauthner présentant des degrés distincts de myélinisation. Barre d'échelle : 5  $\mu\text{m}$ . b. Etude THG polarimétrique sur deux segments de cet axone.

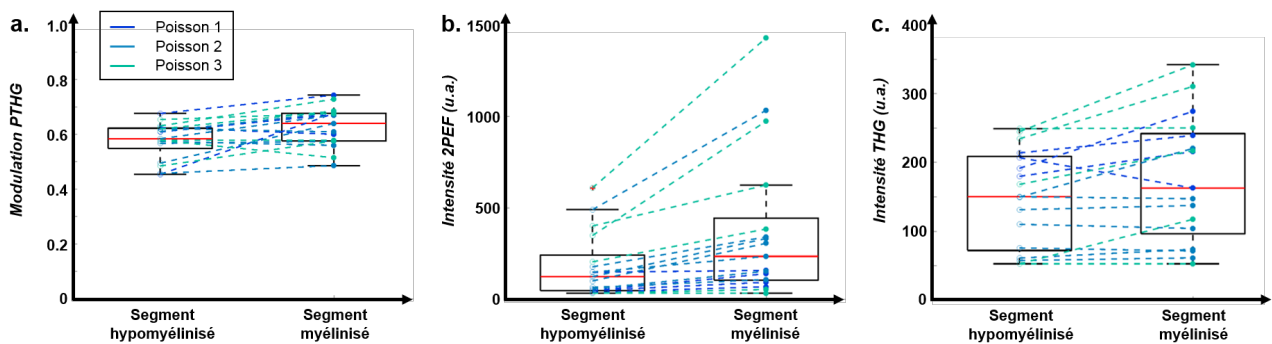


FIGURE 4.13 – Etude statistique sur les valeurs de modulation en fonction de a. modulation PTHG et de b. l'intensité 2PEF. c. intensité THG

Avant la myélinisation : à 48 *hpf*



**Encart 4.4 - Matériel et méthode :**

A partir de nos premières observations et des données présentes dans la littérature rapportant la présence du contraste 2PEF sur les axones Mauthner de la moelle épinière de poisson-zèbre à 60 *hpf*, nous avons choisi 48 *hpf* comme premier repère temporel de notre étude. Nous avons réalisé des acquisitions sur des domaines de l'axone Mauthner à partir du début de l'extension du *vitellus* toutes les 4 heures entre 48 *hpf* et 72 *hpf* puis toutes les 12 heures entre 3 *dpf* et 5 *dpf*. Les profils ont été extraits par moyennage des réponses sur des segments recalés de 40 – 50  $\mu\text{m}$  de longueur.

Dès 48 *hpf*, c'est-à-dire antérieurement au processus de myélinisation, les axones Mauthner sont déjà visibles en contraste THG (cf. figure 4.14.a). Leur visibilité signifie que la différence entre les indices de réfraction  $\Delta n = n_{\text{axone}} - n_{\text{milieu ext}} = 1.38 - 1.34 = 0.04$  [169] et les susceptibilités du troisième ordre  $\Delta\chi^{(3)} = \chi_{\text{axone}}^{(3)} - \chi_{\text{milieu ext}}^{(3)}$  entre la structure cylindrique de l'axone et le milieu environnant sont suffisantes pour faire émerger un faible signal THG sur des structures de ce calibre. L'amplitude de modulation du signal PTHG s'élève à 0.47 (cf. figure 4.15.a) qui se situe entre les valeurs de modulation mesurées expérimentalement sur des interfaces verticales quartz/milieu d'indice ( $\simeq 0.20$ ) et des gouttelettes d'huile/milieu d'indice ( $\simeq 0.54$ ) associées au même écart d'indices et présentées dans le chapitre 2. A ce stade, un signal de fond 2PEF apparaît de manière diffuse dans la région le domaine pMN localisé entre le notochorde et l'axone Mauthner où sont localisés les progéniteurs pMN qui produisent ensuite les OPCs (cf. figure 4.14.a).

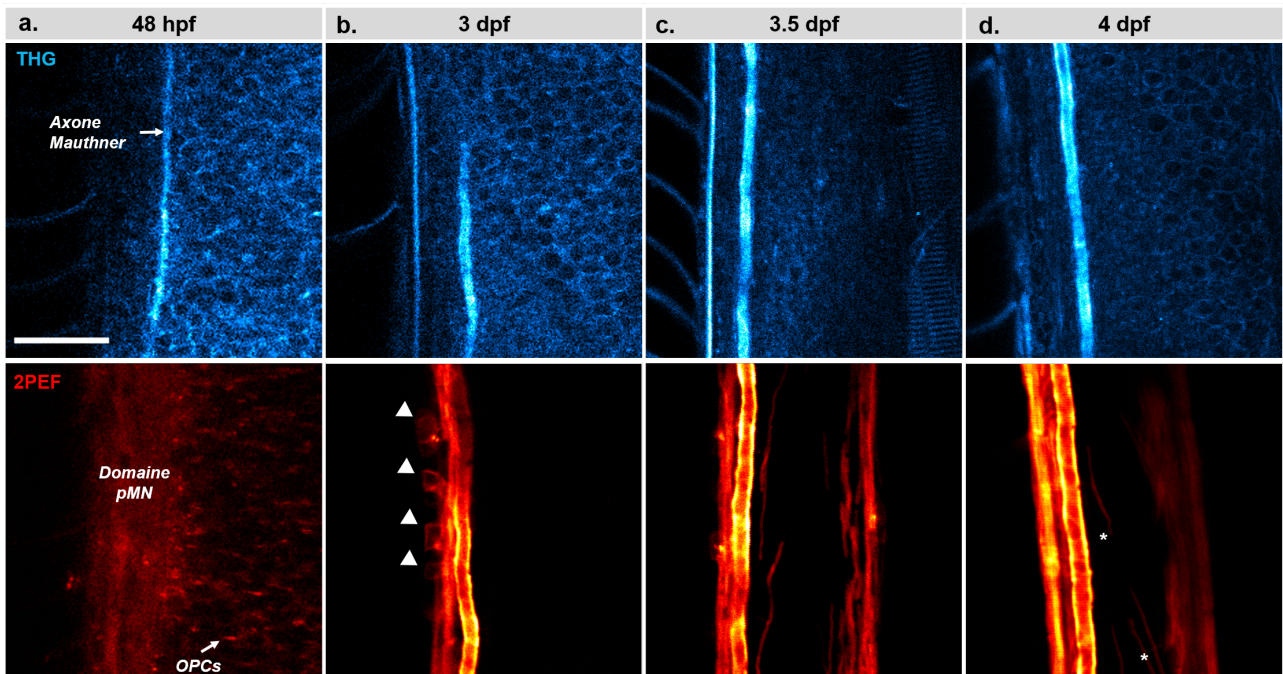


FIGURE 4.14 – Evolution temporelle des contrastes 2PEF et THG sur l'axone Mauthner au cours du processus de myélinisation à (a) 48 *hpf*, (b) 3 *dpf*, (c) 3.5 *dpf* et (d) 4 *dpf*.

*Début de la myélinisation : entre 52 hpf et 60 hpf*

A partir de 52 *hpf*, il apparaît un faible signal 2PEF diffus à proximité de l'axone Mauthner qui traduit la migration des OPCs depuis le domaine pMN jusqu'à l'axone Mauthner. Un signal 2PEF plus intense émerge ensuite rapidement au niveau des bords de l'axone sur des portions discontinues qui révèle de manière non-ambiguë l'initiation des premiers internodes autour de l'axone Mauthner. Les membranes cellulaires des oligodendrocytes myélinisants sont parfois visibles avec un faible contraste 2PEF. Entre 48 *hpf* et 60 *hpf*, nous avons mesuré une augmentation exponentielle du signal de fluorescence à deux-photons (cf. figure 4.15.c), en accord avec un enroulement continu. Au cours de cette même période, la modulation PTHG augmente linéairement de 0.47 à 0.62 (cf. figure 4.15.a). En supposant que le rayon de courbure de l'axone n'interfère pas significativement dans la modulation PTHG mesurée, ce paramètre se révèle donc sensible à l'apparition des premières gaines de myéline.

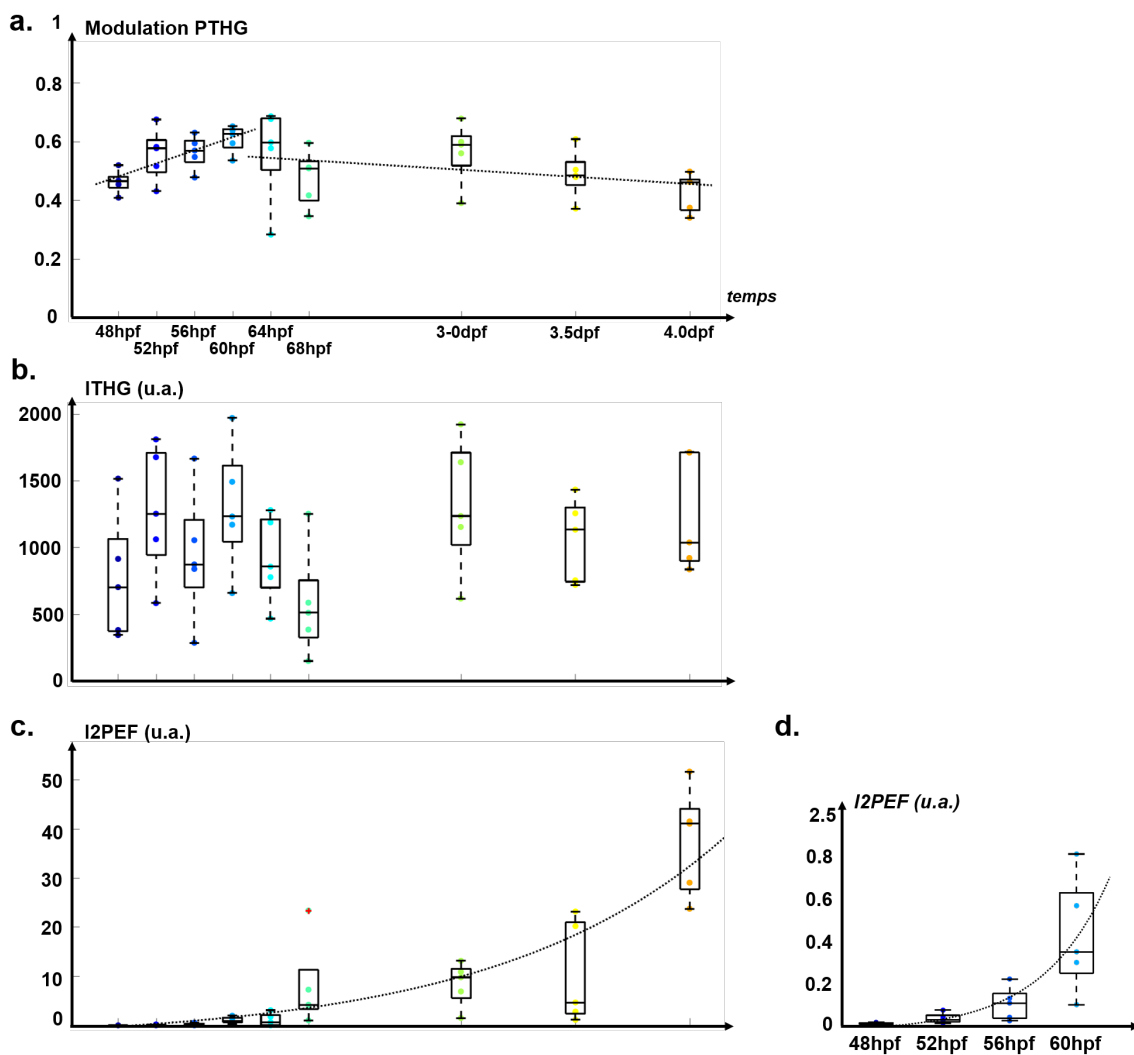


FIGURE 4.15 – Evolution temporelle de (a.) la modulation PTHG, de (b.) l'intensité THG et de (c.) l'intensité 2PEF sur l'axone Mauthner entre 48 *hpf* et 5 *dpf* (N=5).

*Suite de la myélinisation : après 64 hpf*

Autour de 3 *dpf*, le signal 2PEF apparaît sur les deux bords latéraux de segments de l'axone Mauthner et sur des segments d'axones réticulospinaux ventraux (cf. figure 4.14.b). A partir de 3.5 *dpf*, le signal 2PEF apparaît sur les axones dorsaux (cf. figure 4.14.c).



Au-delà de 60 *hpf*, le signal de fluorescence continue d'évoluer exponentiellement (cf. figure 4.15.c). En revanche, la modulation P-THG diminue de 0.60 à 0.46 entre 64 *hpf* et 5 *dpf* (cf. figure 4.15.a) et le contraste THG ne présente pas de tendance spécifique (cf. figure 4.15.b).

On peut supposer que cette diminution de la modulation THG trouve son origine dans des effets géométriques spécifiques lorsque le faisceau d'excitation se propage sur des gaines de myéline dont la dimension avoisine la résolution latérale de l'excitation. De plus, nous avons observé un dédoublement de l'interface de la myéline à partir de 4 *dpf* qui renforce cette hypothèse. Ces mécanismes de contraste seront étudiés dans la section suivante.

### - Caractérisation spatiale et temporelle du diamètre de l'axone Mauthner

Enfin, nous présentons une caractérisation des **variations spatiales et temporelles du diamètre de l'axone Mauthner** (cf. figure 4.16).

#### **Encart 4.5 - Matériel et méthode : Conditions d'imagerie**

Les variations spatiales et temporelles du calibre de l'axone Mauthner ont été renseignées à partir des profils THG issus de plusieurs régions de la moelle épinière de 5 poisson-zèbres à 3 étapes du développement (3 *dpf*, 4 *dpf* et 5 *dpf*). Ces régions ont été choisies sur 6 fenêtres espacées de 200  $\mu\text{m}$  en progressant depuis une région située au niveau du début de l'extension du *vitellus* (référence spatiale) vers la région postérieure de la moelle épinière. (cf. figure 4.16.a)

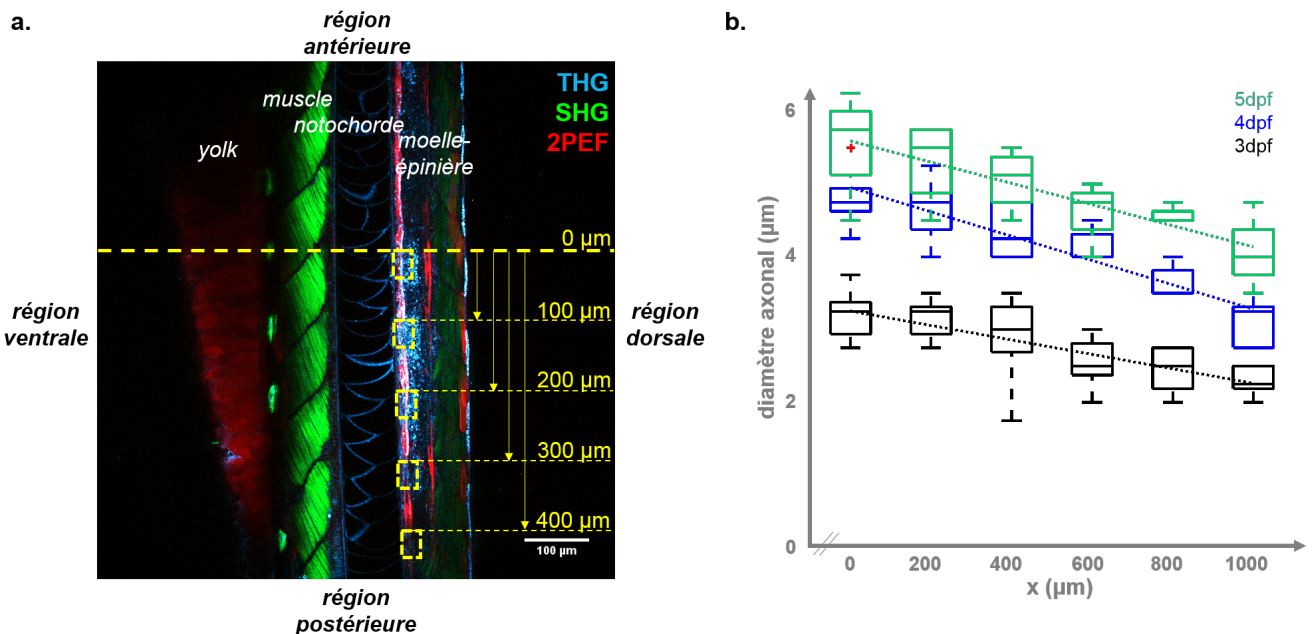


FIGURE 4.16 – Caractérisation des variations spatiales et temporelles du diamètre de l'axone Mauthner. a. Image multimodale (THG, SHG et 2PEF) de la moelle épinière de poisson-zèbre présentant la position des premières fenêtres imagées à partir du début de l'extension du vitellus. b. Mesures du diamètre de l'axone Mauthner réalisées à 200  $\mu\text{m}$  d'intervalle sur une longueur de 1 *mm* chez 5 individus à 3, 4 et 5 *dpf*.

Nos mesures font apparaître la présence d'un **gradient spatial du diamètre de l'axone Mauthner le long de la moelle épinière** pour chacun des trois stades du développement étudiés (cf. figure 4.16.b). Ce gradient est caractérisé par une diminution linéaire du diamètre de l'axone depuis le début de l'extension du *vitellus* jusque dans la région postérieure du poisson ( $-1.0 \mu m$ ,  $-1.7 \mu m$  et  $-1.5 \mu m$  sur une longueur de  $1 mm$  respectivement à  $3 dpf$ ,  $4 dpf$  et  $5 dpf$ ). Par ailleurs, ces résultats mettent en évidence l'existence d'un gradient dans l'évolution temporelle du diamètre de l'axone Mauthner, passant de  $3.2 \mu m$  à  $3 dpf$  à  $4.8 \mu m$  à  $4 dpf$  et  $5.6 \mu m$  à  $5 dpf$  au niveau du début de l'extension du *vitellus*.

#### - Conclusion sur le contraste THG polarimétrique issu des axones Mauthner

Dans cette sous-partie, nous avons montré que le contraste THG issu du plan équatorial des **axones Mauthner** présente une **forte dépendance avec l'orientation de la polarisation**. Contrairement à notre hypothèse de départ, le paramètre de modulation ne permet pas de caractériser de manière directe la myélinisation sur les axones Mauthner qui ont un large calibre à tous les stades du processus de myélinisation. En effet, l'amplitude de modulation croît bien pour des états de myélinisation précoces (entre  $48 hpf$  et  $60 hpf$ ) mais décroît pour des états de myélinisation plus tardifs (entre  $64 hpf$  et  $5 dpf$ ). On peut faire l'hypothèse que lorsque l'épaisseur de la myéline est latéralement sous-résolue, l'imagerie PTHG est effectivement **efficace pour détecter des changements de myélinisation** (augmentation de la densité des lipides et de l'ordre lipidique). Cependant, pour des épaisseurs de myéline proches ou supérieures à la résolution latérale du faisceau, l'interprétation du paramètre de modulation est plus complexe.

#### e) Conclusion

Ce travail de caractérisation de la réponse THG polarimétrique sur des axones myélinisés du poisson-zèbre a été inspiré par des travaux récents qui proposent que le contraste CARS polarimétrique permet de caractériser l'ordre lipidique et éventuellement la présence de perturbations des couches lipidiques à l'échelle submicrométrique autour d'axones de la moelle épinière de souris [131] et des axones Mauthner du poisson-zèbre [106].

Bien que nous ayons mis en évidence la **forte sensibilité du contraste THG sur les axones myélinisés de la moelle-épineière du poisson-zèbre** (axones Mauthner et dorsaux) induite par la présence de la gaine de myéline autour des axones, l'analyse du contraste THG polarimétrique a révélé des résultats inattendus. En effet, nous avons observé une **augmentation de l'amplitude de modulation sur des axones dorsaux de calibre micrométrique avec une gaine de myéline sous-résolue** passant de  $0.35$  à  $0.63$  entre les stades embryonnaires  $3 dpf$  et  $5 dpf$ , cependant l'évolution de la modulation est ambiguë pour des axones Mauthner avec un plus large calibre (environ  $5 \mu m$ ). A des stades précoces de la myélinisation de l'**axone Mauthner**, l'amplitude de modulation **augmente** sensiblement en passant de  $0.47$  à  $0.63$  entre  $48 hpf$  et  $60 hpf$ , puis elle **diminue légèrement** de  $0.60$  à  $0.46$  entre  $64 hpf$  et  $5 dpf$  stades tardifs de myélinisation de l'axone Mauthner.

On peut faire l'hypothèse qu'il existe deux régimes de variations de l'amplitude de la modulation PTHG en fonction de l'épaisseur de la gaine de myéline (cf. table 4.6) :

- lorsque l'épaisseur de la gaine de myéline augmente tout en étant inférieure à la résolution latérale de l'excitation, l'amplitude de modulation augmente
- lorsque l'épaisseur de la gaine de myéline est de l'ordre de grandeur de la résolution latérale de l'excitation, l'amplitude de modulation diminue.

Nous verrons que le diamètre de l'axone a également une influence sur le contraste THG polarimétrique, à travers les aberrations optiques que l'axone peut induire.

### 4.1.3 Caractérisation du contraste THG polarimétrique sur des systèmes cylindriques isotropes modèles

Pour comprendre l'origine physique du contraste (P-)THG sur les axones myélinisés, nous avons cherché à **caractériser expérimentalement et numériquement la réponse (P-)THG sur des structures cylindriques isotropes** qui reproduisent la géométrie des axones myélinisées avec des **propriétés optiques** (indice de réfraction  $n$  et susceptibilité du troisième ordre  $\chi^{(3)}$ ) et des **dimensions** qui varient.

#### a) Caractérisation expérimentale du contraste sur des pipettes en verre étirées

Nous avons commencé par étudier expérimentalement l'**influence des désaccords d'indice et de la géométrie cylindrique des axones myélinisés** sur le contraste (P-)THG en imageant des capillaires de verre étirés remplis et immergés dans des solutions dont les indices de réfraction sont contrôlés avec précision (cf. figure 4.17.a). Ce modèle expérimental isotrope simple présente les avantages suivants :

- (i) Sa forme cylindrique et ses dimensions modélisent fidèlement la géométrie de **larges axones myélinisés**.
- (ii) L'indice de réfraction élevé des capillaires ( $n=1.47-1.49$ ) reproduit celui de la myéline dans une approximation raisonnable.
- (iii) Comme les capillaires de verre étirés sont classiquement utilisés pour l'injection de cellules dans les poissons-zèbres, nous avons pu les remplir avec des liquides d'indices de réfraction contrôlés.

#### **Encart 4.6 - Matériel et méthode : Préparation des pipettes**

Les capillaires de borosilicate (*Phymep, modèle GC100-10*,  $\phi_{ext} = 1.0 \text{ mm}$ ,  $\phi_{int} = 0.58 \text{ mm}$ ) ont été étirés avec une étireuse à pipette verticale (*Kopf, modèle 720*) équipée d'une bobine de chauffage en platine en conjuguant un chauffage à forte température avec une faible force pour obtenir des extrémités de pipettes fines et allongées. L'extrémité pleine des pipettes a ensuite été cassée pour les remplir avec des solutions d'indice (LI) à l'aide d'un système d'injection utilisé classiquement en biologie. Afin d'empêcher les solutions de s'évaporer pendant la préparation puis de se mélanger avec le milieu environnant pendant l'imagerie, les extrémités des pipettes étirées remplies ont été scellées en faisant fondre le verre au contact d'une résistance. Enfin, nous avons monté ces pipettes étirées et remplies dans des solutions d'indice (LE) (cf. fig. 4.17.a). Les solutions d'indice ont été préparées par dilutions successives de solvants d'indices (eau distillée, glycérol pour l'indice à 1.40, TDE pour l'indice à 1.47) avec de l'eau distillée pour obtenir les indices de réfraction (respectivement 1.33, 1.40 et 1.47) mesurés précisément au réfractomètre à 589.3 nm. Nous avons introduit un colorant (rhodamine) dans les solutions de remplissage (LI) comme contrôle de l'étanchéité des pipettes. Au total, 9 échantillons - correspondant aux 3x3 combinaisons des milieux d'indices extérieurs et intérieurs - ont été préparés.

**Encart 4.7 - Matériel et méthode : Conditions d'imagerie et traitement des images sur les pipettes**

Deux types d'acquisitions ont été réalisées : 1) une première acquisition 3D combinant les contrastes THG et 2PEF, et 2) des acquisitions polarimétriques PTHG/2PEF dans le plan équatorial des pipettes. Ces deux imageries ont été réalisées au niveau de l'extrémité des pipettes sur trois régions présentant des diamètres différents - un diamètre fin ( $\phi = 15 - 20 \mu m$ ), intermédiaire ( $\phi = 20 - 30 \mu m$ ) et large ( $\phi = 30 - 40 \mu m$ ). Les acquisitions 3D ont ensuite été reprojettées orthogonalement puis moyennées sur 10 images pour en extraire des profils XZ. Les acquisitions polarimétriques ont permis l'extraction des profils P-THG par moyennage sur des segments de  $10 \mu m$  de longueur à partir desquels nous avons évalué les extréma d'intensité et les paramètres de modulation et d'angle par une analyse de Fourier unidimensionnelle.

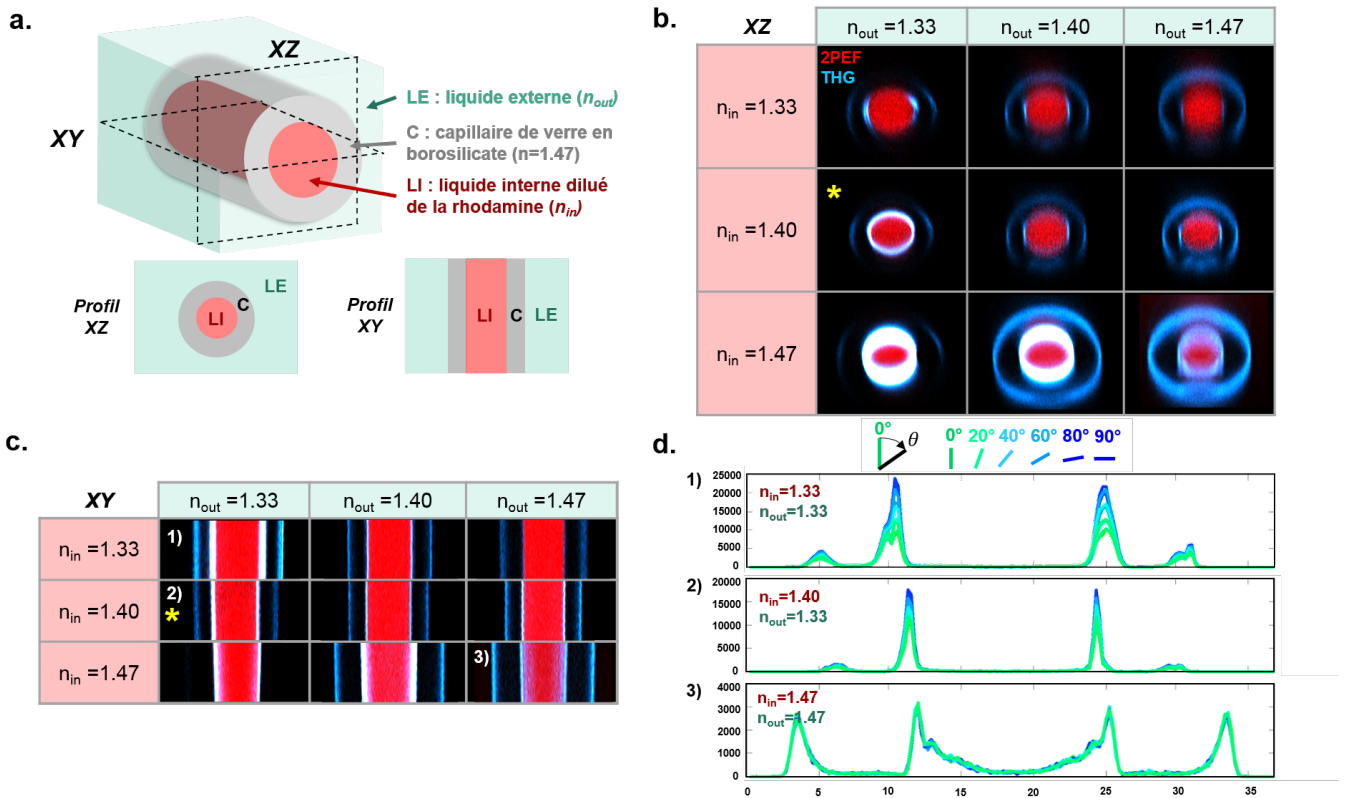


FIGURE 4.17 – Caractérisation des contrastes sur les pipettes de borosilicate étirées. a. Schéma du modèle expérimental. b. Reprojection des contrastes THG/2PEF sur les pipettes remplies et immergées dans des milieux d'indices de réfraction différents. c. Imagerie THG/2PEF dans le plan équatorial des pipettes et extraction des profils PTHG dans ce plan. d. Visualisation des profils PTHG associés aux numéros de la figure c.

*i) Analyse des reprojctions XZ*

Nous avons réalisé des acquisitions 3D séquentielles des contrastes THG et 2PEF sur les pipettes étirées dont nous présentons des reprojctions XZ sur la figure 4.17.b. pour des régions correspondant à un diamètre de  $15 - 20 \mu m$ . On notera que le contraste 2PEF - induit par la présence de la rhodamine dans le liquide à l'intérieur des pipettes - est confiné à l'intérieur des

pipettes, ce qui indique la bonne étanchéité des pipettes et valide le modèle utilisé. De manière surprenante, les profils THG transverses enregistrés sur les différents échantillons présentent une grande diversité en fonction des liquides d'indices utilisés. On observe en particulier que les contrastes relatifs entre les interfaces verticales et horizontales sont très différents. Les interfaces verticales apparaissent d'autant plus contrastées par rapport aux interfaces horizontales que l'indice du milieu intérieur ou extérieur est faible devant celui du borosilicate ( $n = 1.47$ ). En revanche, le contraste THG présente un **profil annulaire** sur les interfaces intérieures et extérieures lorsque l'indice des solutions avoisine celui du verre. Comme nous l'avons décrit dans le chapitre I, les axones myélinisés présentent des propriétés optiques ( $n = 1.34$  dans le milieu environnant,  $n = 1.44$  dans la myéline et  $n = 1.38$  dans l'axone [169]) qui se rapprochent de la configuration expérimentale avec un indice du milieu extérieur à  $n = 1.33$  et un milieu intérieur à  $n = 1.40$  dont le profil THG XZ est marqué par une astérisque jaune sur la figure 4.17.b. Le profil THG transverse associé présente un contraste sur les interfaces extérieures verticales et un contraste annulaire sur l'interface intérieure.

### *ii) Analyse polarimétrique*

Nous avons ensuite renseigné le **contraste THG polarimétrique dans le plan équatorial des pipettes** (cf. figures 4.17.c, d. et 4.18).

On peut noter que les profils extraits sur les interfaces verticales entre des milieux d'indices très différents présentent des **pics dédoublés d'allure gaussienne**, tandis que les pics perdent leur allure gaussienne pour prendre un **aspect asymétrique élargi vers l'intérieur de la pipette** sur des interfaces entre des milieux de mêmes indices.

On observe que la **modulation PTHG mesurée au niveau des maxima d'intensité des profils PTHG est d'autant plus grande que le désaccord d'indice entre les liquides et le borosilicate est important** (cf. figures 4.18.c et d.). Plus précisément, sur l'interface extérieure (resp. intérieure) la modulation atteint 0.48 (resp. 0.61) pour un désaccord d'indice entre l'eau et le borosilicate de  $\Delta n = 0.14$ , 0.42 (resp. 0.40) pour un désaccord d'indice entre le glycerol et le borosilicate de 0.07, et 0.06 (resp. 0.03) pour un désaccord d'indice entre le TDE et le borosilicate quasi-nul. On peut également noter que la modulation sur le bord intérieur apparaît amplifiée par un fort désaccord d'indices sur le bord extérieur, mais que cet effet est marginal lorsque le désaccord est moins important.

Conformément aux expériences réalisées sur des interfaces verticales présentées dans le chapitre 2, l'analyse de Fourier révèle que le signal THG est maximal pour une **orientation de la polarisation d'excitation perpendiculaire à l'axe de la pipette** sur les interfaces intérieures et extérieures lorsque le désaccord d'indice est grand (cf. figure 4.18.e). Au contraire, cette analyse fait ressortir des angles qui n'ont pas de signification particulière lorsque les milieux ont un indice semblable à cause de la faible modulation du signal PTHG, sans toutefois mettre en évidence de basculement de  $90^\circ$ .

En résumé, ces expériences d'imagerie THG sur des pipettes étirées dans différentes conditions d'immersion et de remplissage montrent que l'**aspect annulaire du profil THG transverse** issu des axones myélinisés est induit par un désaccord d'indice faible entre l'axone et la myéline. De plus, les **fortes modulations du contraste PTHG** observées sur le plan équatorial des axones myélinisés sont induites au premier ordre par des désaccords d'indices importants entre la myéline et l'axone, et entre la myéline et le milieu environnant. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, les interfaces entre des milieux d'indices de réfraction différents induisent de fortes distorsions sur le volume focal du faisceau d'excitation, qui sont à l'origine d'une modulation importante du signal PTHG.



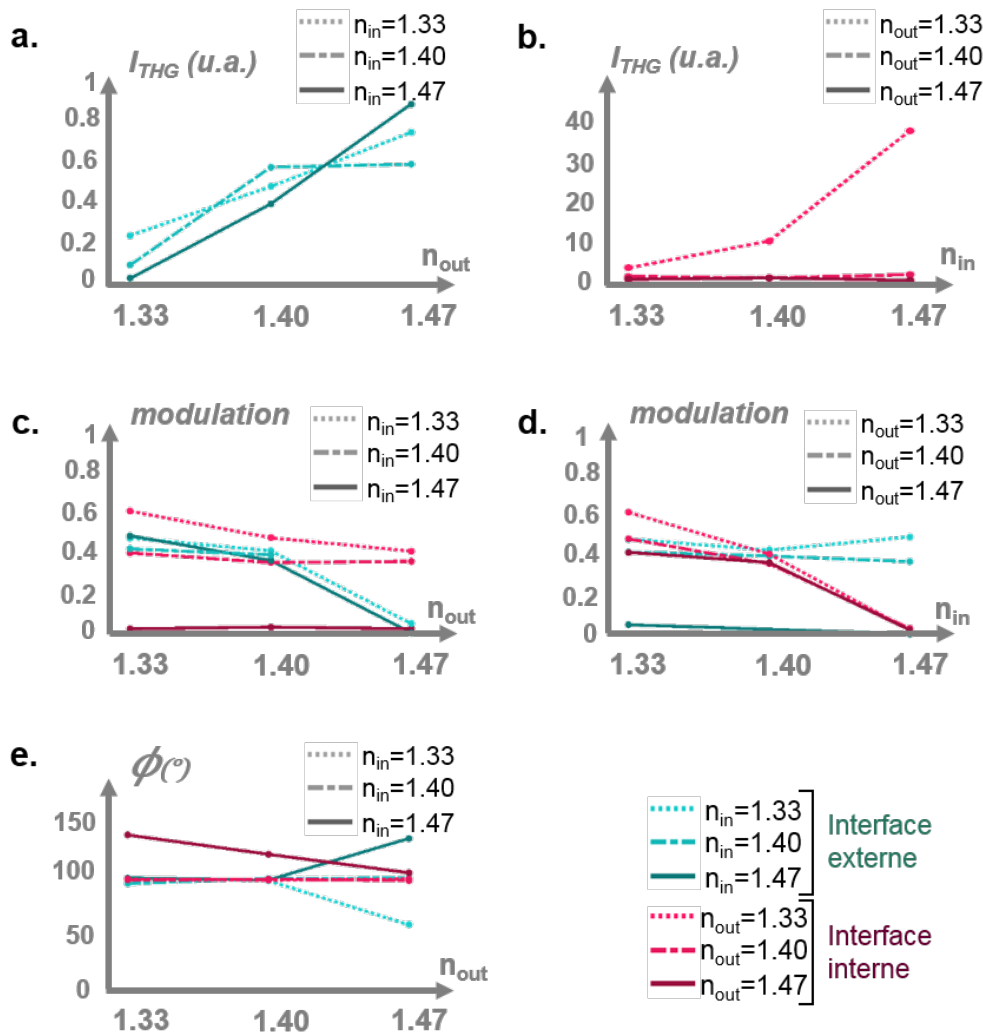


FIGURE 4.18 – d. Variations (a, b) des intensités PTHG90, (c, d) de la modulation PTHG et (e) des valeurs angulaires évaluées sur les interfaces externes et internes des pipettes imagées dans les différentes conditions expérimentales.

## b) Modélisation numérique du contraste PTHG sur des modèles cylindriques isotropes

Conjointement à la caractérisation expérimentale du contraste PTHG sur des pipettes étirées, nous avons réalisé des simulations numériques sur des structures cylindriques en utilisant le modèle FDTD - dont le principe a été détaillé dans le chapitre 2. Le but de ce travail mené en collaboration avec Nicolas Olivier est ici d'évaluer numériquement l'**impact des distortions** subies par le faisceau d'excitation sur la modulation PTHG calculée sur les interfaces d'une structure cylindrique creuse isotrope en fonction des propriétés optiques des milieux d'immersion et de remplissage de la structure.

Dans un premier temps, nous avons vérifié la validité du modèle FDTD en simulant les réponses PTHG sur des géométries imitant des **pipettes étirées** remplies et immergées dans des milieux d'indices différents et en comparant ces résultats avec les résultats expérimentaux sur les pipettes. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la réponse PTHG sur des structures dont les propriétés optiques et géométriques sont similaires à des **axones myélinisés** de différents calibres.



Les structures cylindriques considérées ont été décrites en superposant deux cylindres :

- un premier cylindre de large diamètre modélise soit le quartz (pour les pipettes), soit la myéline (pour les fibres myélinisées).
- un second cylindre de plus petit calibre - centré sur le premier cylindre - modélise la structure interne constituée d'un liquide d'indice (pour les pipettes) ou l'axone (pour les fibres myélinisées).

puis ces structures ont été insérées dans un milieu environnant comme décrit sur la figure 4.19.

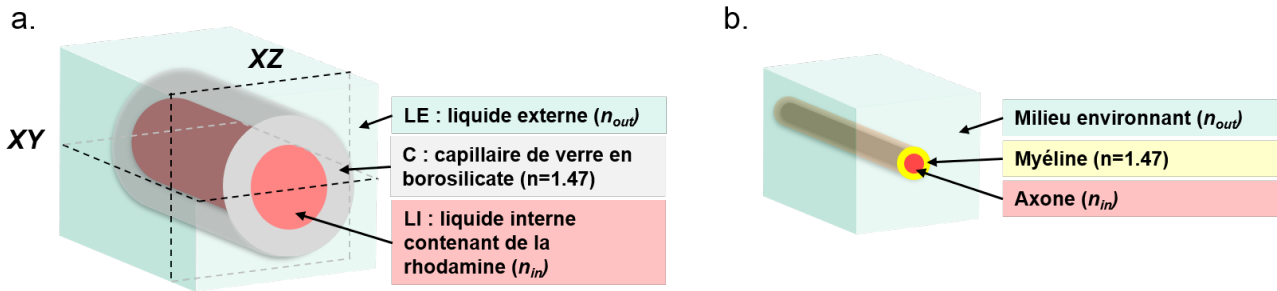


FIGURE 4.19 – Géométries cylindriques modélisées. a. Pipettes étirées. b. Axones myélinisés.

### - Résultats des simulations menées sur des modèles de pipettes étirées

Nous présentons ici les résultats des simulations réalisées sur des géométries semblables aux **pipettes étirées** dont une description est donnée dans l'encart 4.8. Le principe de simulation FDTD sur une géométrie donnée est décrit sur la figure 4.20.a.

#### **Encart 4.8 - Description des structures modélisées**

Les propriétés géométriques et optiques des structures considérées sont décrites ci-dessous :

- Le cylindre extérieur a un diamètre constant  $\phi_{ext} = 16 \mu m$  et possède les propriétés optiques du **borosilicate** données dans le tableau 4.8.
- Le cylindre intérieur a ici un diamètre constant  $\phi_{int} = 6 \mu m$ . Ce cylindre intérieur et le milieu environnant modélisent successivement trois milieux différents : soit de l'**eau**, soit une solution de **glycérol diluée** avec de l'eau, soit un liquide de **TDE dilué** avec de l'eau, dont les propriétés optiques ont été mesurées (la description des mesures de la méthode utilisée pour déterminer les valeurs de  $\chi^{(3)}$  est donnée dans l'annexe F) et sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Milieu	Indice $n$	$\chi^{(3)}$ ( $10^{-22} m^2 V^{-2}$ )
Milieu 1 : eau	1.33	1.68
Milieu 2 : glycérol dilué avec de l'eau	1.41	2.20
Milieu 3 : TDE dilué avec de l'eau	1.47	3.50
Borosilicate	1.47	1.87

Sur la figure 4.20.c, nous présentons les profils d'**intensité PTHG** mesurés dans le plan équatorial des cylindres pour des polarisations d'excitation parallèle (signal PTHG0 tracé en vert) et orthogonale (PTHG90 tracé en bleu) à l'axe du cylindre. Les quatre cas ici présentés correspondent aux 4 configurations où la structure interne et le milieu environnant sont soit de l'eau, soit du **TDE dilué**. La figure 4.20.d présente les graphes de **modulation PTHG** qui sont déduits de ces deux profils d'intensité. En faisant référence à ces graphes d'intensité et de modulation PTHG, nous allons détailler point par point différentes observations.

Dans ces 4 cas, les **profils d'intensité PTHG0 et PTHG90** présentent 4 pics - symétriques par rapport à l'axe de la pipette et quasi-localisés sur les 4 interfaces. On peut noter que l'amplitude de ces pics THG varie fortement en fonction des conditions d'indice  $n$  et de  $\chi^{(3)}$  : on trouve par exemple la plus forte intensité THG sur les interfaces entre le quartz et le liquide de TDE dilué. En effet, en règle générale, le signal THG calculé est d'autant plus grand que les milieux possèdent des indices proches et que la différence entre les valeurs de leur  $\chi^{(3)}$  est grande. Par ailleurs, on peut noter le dédoublement du pic de signal THG sur l'interface extérieure entre le quartz et l'eau, induit par une grande différence entre les indices linéaires  $n$  de ces deux milieux, en accord avec les effets de dédoublements d'interfaces décrits dans la partie IV du chapitre 2. On peut également remarquer la présence d'un signal THG entre les pics centraux lorsque l'indice de réfraction de la structure interne est égal à celui du quartz. Cet effet est vraisemblablement induit par une refocalisation du signal d'excitation dans la structure intérieure lorsque son indice de réfraction est élevé par rapport à celui du milieu environnant.

Après avoir donné quelques éléments sur l'allure générale des profils, on s'intéresse ici à décrire les **intensités PTHG relatives** pour deux polarisations orthogonales. Sur les interfaces entre un milieu et le quartz où  $n_{milieu} < n_{quartz}$ , le signal THG maximal est obtenu pour une polarisation d'excitation orthogonale à l'axe de la structure. Dans le cas inverse où  $n_{milieu} = n_{quartz}$ , c'est le signal THG induit par une polarisation d'excitation parallèle à la structure qui domine. A noter, changer le milieu intérieur ou extérieur a peu d'influence sur l'intensité THG calculée sur les pics issus des interfaces entre des milieux gardés identiques.

Quant à la **modulation PTHG** calculée sur les pics THG, elle est calculée comme  $(IPTHG90 - IPTHG0) / \max(IPTHG0; IPTHG90)$ , puis mesurée au niveau des pics d'intensité PTHG. On observe qu'elle diminue lorsque le désaccord d'indice diminue. Plus précisément, la modulation PTHG sur le pic interne passe de  $[0.76; 0.75]$  à  $[-0.25; -0.19]$  lorsque l'indice du milieu intérieur passe de 1.33 à 1.47, c'est-à-dire que son amplitude diminue et que la polarisation d'excitation qui maximise le signal THG généré bascule de  $90^\circ$  à  $0^\circ$ . De manière identique, la modulation sur le pic externe passe de 0.57 à  $-0.24$  lorsque l'indice du milieu extérieur passe de 1.33 à 1.47.

Pour se rapprocher d'une configuration proche des axones myélinisés, nous avons également calculés les profils d'intensité et de modulation PTHG où le milieu intérieur correspond à du glycérol dilué et le milieu extérieur est de l'eau (cf. figure 4.20.b). De manière intéressante, on observe ici une quasi-absence de signal THG sur la première interface horizontale (eau-quartz) et un signal plus fort sur la seconde interface horizontale (quartz-glycérol). Ce résultat donne une idée de l'aspect annulaire que l'on pourrait trouver en traçant le profil THG transverse annulaire sur l'interface interne des pipettes, et qui est en accord avec le profil obtenu expérimentalement sur les pipettes.

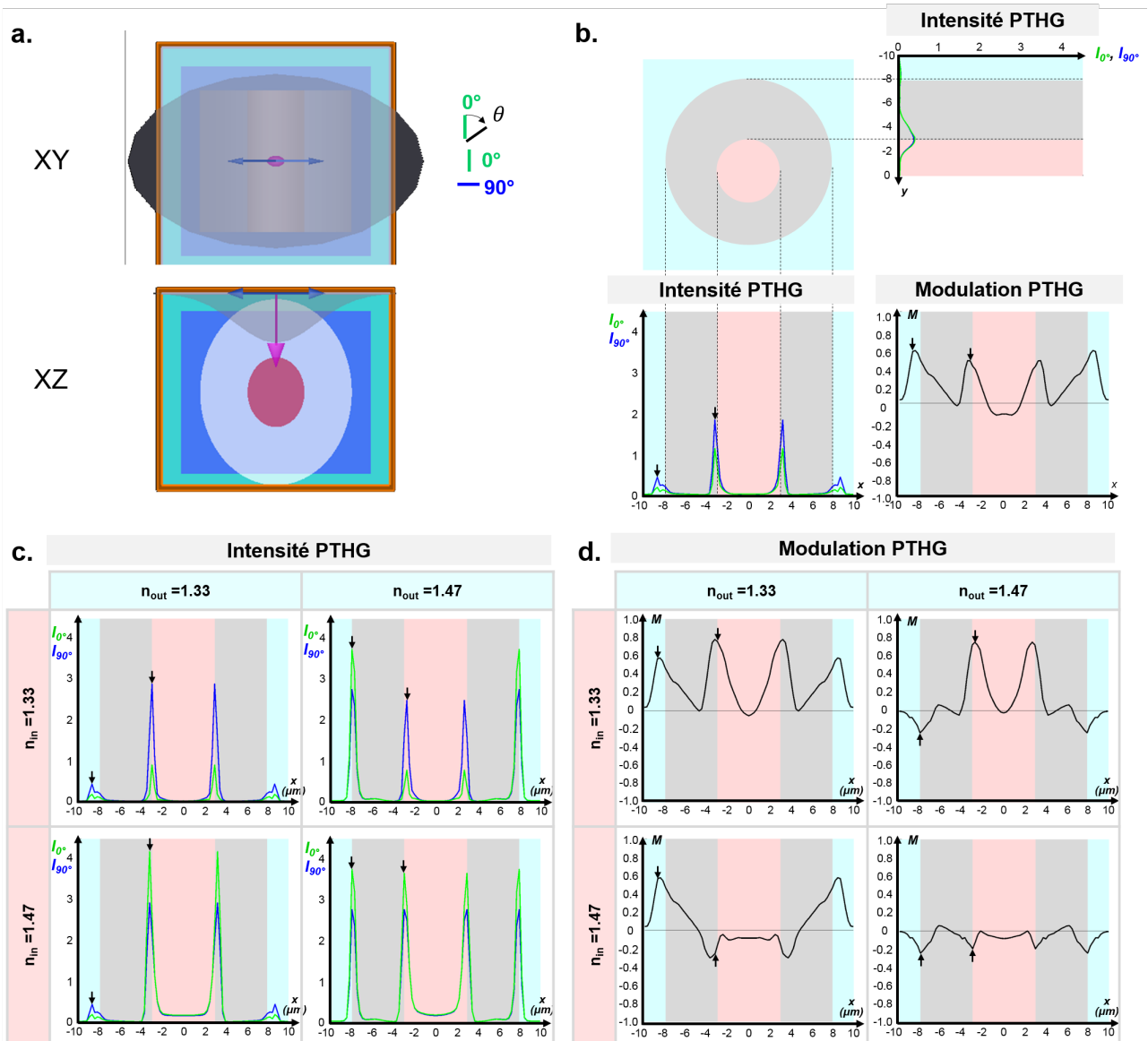


FIGURE 4.20 – a. Vues XY et XZ de la propagation du faisceau d’excitation sur les structures utilisées dans la modélisation numérique. b. Profils PTHG et modulation dans les cas où le milieu intérieur est de glycérol dilué et le milieu environnant est de l’eau. c. Profils d’intensité PTHG lorsque les milieux intérieurs et extérieurs sont soit de l’eau soit du TDE dilué. d. Profils de modulation PTHG associés. Les flèches noires indiquent les positions où la modulation PTHG a été évaluée.

Pipette	Milieu intérieur	Milieu extérieur	Modulation intérieure	Modulation extérieure
Cas 1	Eau ( $n = 1.33$ )	Eau ( $n = 1.33$ )	0.76	0.57
Cas 2	Eau ( $n = 1.33$ )	TDE ( $n = 1.47$ )	0.75	-0.24
Cas 3	TDE ( $n = 1.47$ )	Eau ( $n = 1.33$ )	-0.25	0.57
Cas 4	TDE ( $n = 1.47$ )	TDE ( $n = 1.47$ )	-0.19	-0.24
Cas 5	Glycerol ( $n = 1.41$ )	Eau ( $n = 1.33$ )	0.46	0.57

- Résultats des simulations réalisées pour des géométries d’axones myélinisés

Après avoir validé le modèle numérique FDTD sur des géométries avec les mêmes propriétés optiques que les pipettes, nous avons réalisé des simulations sur des géométries dont les dimensions et les propriétés optiques sont proches de celles des axones myélinisés imagés dans le poisson-zèbre. Les structures modélisées sont décrites dans l'encart 4.9.

**Encart 4.9 - Description des structures simulées**

Les axones myélinisés ont été décrits par deux cylindres superposés, un premier de large diamètre avec les propriétés du TDE dilué, un second plus mince et centré sur le premier avec les propriétés du glycérol dilué et un milieu environnant correspondant à de l'eau. Nous avons ici évalué deux effets sur l'intensité PTHG mesurée :

- l'augmentation de la dimension des structures :

Axone	$\phi_{int}$ ( $\mu m$ )	$\phi_{ext}$ ( $\mu m$ )	$\Delta\phi_{myéline}$ ( $\mu m$ )	g-ratio	Modulation
Mauthner	3.50	3.84	0.17	0.91	0.76
Ventral	1.16	1.34	0.09	0.87	0.35
Dorsal	0.96	1.08	0.06	0.89	0.25

- l'augmentation de la dimension de la gaine de myéline :

Axone	$\phi_{int}$ ( $\mu m$ )	$\phi_{ext}$ ( $\mu m$ )	$\Delta\phi_{myéline}$ ( $\mu m$ )	g-ratio	Modulation
Axone 1	3.50	3.68	0.09	0.95	0.77
Axone 2	3.50	3.84	0.17	0.91	0.76
Axone 3	3.50	5.84	1.17	0.60	0.65

Nous présentons sur la figure 4.21.a les résultats obtenus sur des géométries avec les mêmes dimensions que les axones Mauthner (à 5 *dpf*), des axones ventraux et dorsaux données dans le tableau 4.9.

Un premier aspect intéressant des résultats obtenus correspond à l'**augmentation de l'intensité THG** induite par une polarisation d'excitation orthogonale à l'axone sur le domaine correspondant à la myéline lorsque la dimension de la structure intérieure augmente. En effet, d'une part, lorsque le rayon de courbure de la structure interne augmente, la région sondée par le volume focal ressemble davantage à une lamelle verticale, ce qui implique que les effets de distorsion du faisceau sont plus importants et génèrent un fort signal THG. D'autre part, l'augmentation de l'épaisseur de la myéline contribue également à l'augmentation du signal THG calculé. Par ailleurs, on observe ici aussi la **présence d'un signal à l'intérieur de la structure interne**, induit par des effets de refocalisation du faisceau d'excitation sur la structure intérieure.

Un second aspect d'intérêt provient de la différence entre l'allure des signaux THG induits par les deux polarisations d'excitation. En effet, alors que les signaux PTHG sur la géométrie des pipettes présentaient uniquement des différences d'amplitude, on observe ici la présence d'un **dédoublé du pic THG0** induit par un champ d'excitation avec une polarisation parallèle à la géométrie donnée par l'axone Mauthner.

Enfin, on observe que l'amplitude de la modulation PTHG augmente de 0.025 à 0.76 lorsque l'épaisseur de la gaine de myéline passe de  $0.06 \mu m$  à  $0.17 \mu m$ .

Nous avons ensuite cherché à déterminer l'**influence de l'épaisseur de la gaine de myéline** sur les signaux PTHG observés. En considérant une structure interne de diamètre constant (similaire au diamètre de l'axone Mauthner à 5 *dpf*), nous avons fait varier la dimension de la structure externe pour décrire des épaisseurs de myéline égales à  $0.09 \mu m$ ,  $0.17 \mu m$  et  $1.17 \mu m$  (ou des valeurs de *g-ratio* de 0.6, 0.91 et 0.95) qui correspondent à des cas dans des structures biologiques différentes (cf. tableau 4.9).

D'une part, on peut observer que l'**amplitude du signal THG augmente lorsque l'épaisseur de la myéline augmente** (cf. figure 4.21.b). Cependant, les profils PTHG évoluent fortement lorsque l'épaisseur de la gaine de myéline augmente puisqu'on passe d'une première structure où elle est mince ( $0.09 \mu m$ ) et non-résolue à une troisième structure dont la gaine est plus épaisse ( $1.17 \mu m$ ) et donc résolue. Par conséquent, le signal PTHG90 présente un seul pic dans le premier cas, et deux pics dans le troisième cas, similairement aux cas de pipettes étirées.

D'autre part, on peut voir que la modulation PTHG est **constante** autour de  $0.77 - 0.76$  lorsque l'épaisseur de la gaine de myéline passe de  $0.09 \mu m$  à  $0.17 \mu m$ , mais qu'elle **diminue** de  $0.76$  à  $0.65$  lorsque l'épaisseur de la myéline augmente de  $0.17 \mu m$  à  $1.17 \mu m$ .

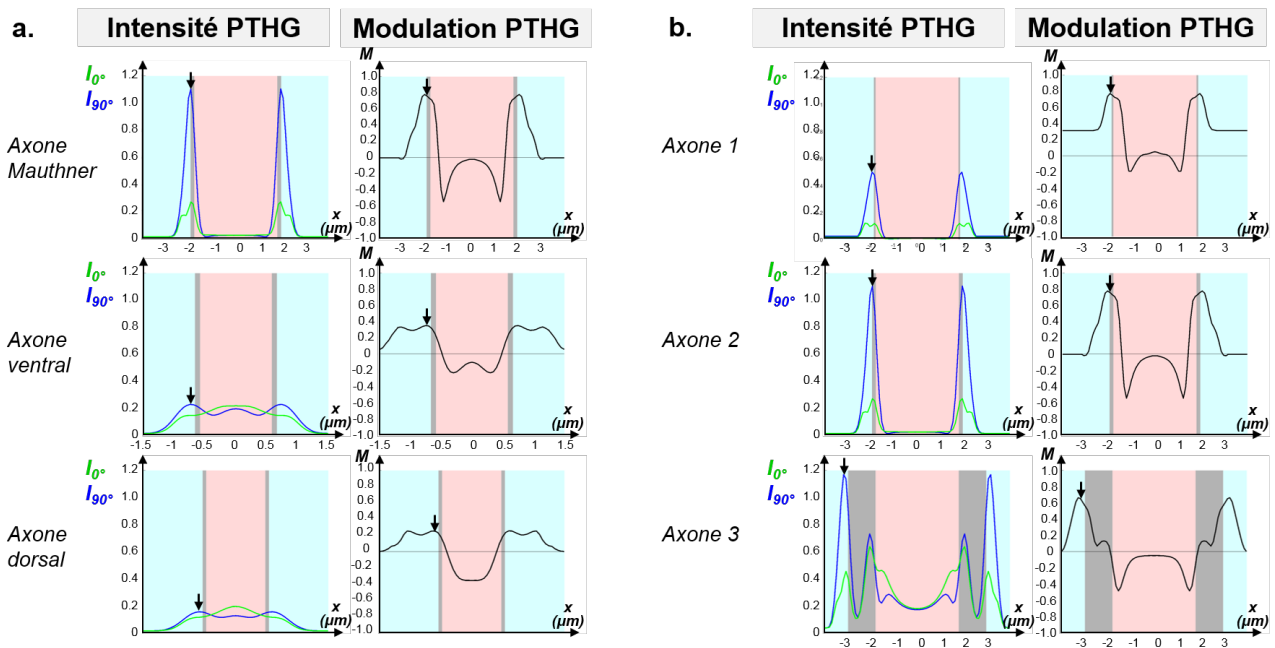


FIGURE 4.21 – a. Intensité et modulation PTHG calculées sur des géométries similaires aux axones Mauthner, aux axones ventraux et aux axones dorsaux. b. Intensité et modulation PTHG sur des axones myélinisés de diamètre intérieur constant en faisant varier l'épaisseur de la myéline. La zone grisée correspond à la myéline.

En résumé, les simulations numériques réalisées **reproduisent semi-quantitativement les modulations PTHG obtenues expérimentalement sur les pipettes** (cf. figure 4.20 et tableau 4.8). Il est probable que les amplitudes de modulation PTHG plus élevées obtenues avec les simulations numériques proviennent de la définition des paramètres de convergence utilisés dans le programme de simulations qui pourront être ajustés ultérieurement en vue d'obtenir des résultats numériques quantitatifs.

Les simulations conduites sur des géométries ressemblant aux axones myélinisés ont permis de retrouver les formes typiques des signaux mesurés expérimentalement (cf. figure 4.21). Nous avons vu qu'il existe deux régimes de variations de l'amplitude de modulation : un premier régime correspond à une gaine de myéline sous-résolue où la **modulation PTHG augmente lorsque l'épaisseur de la gaine de myéline augmente**. Un second régime est associé à une gaine de myéline qui est dans la plage où elle commence à être résolue, lorsque la gaine devient plus épaisse que la résolution, la modulation diminue légèrement.

### c) Conclusion

Les études expérimentales et numériques du contraste THG issu des pipettes étirées ont montré que l'**aspect annulaire du contraste THG observé sur des axones parallèles au plan d'imagerie** trouve son origine dans les **propriétés optiques linéaires de la gaine de myéline et de l'axone**.

L'évaluation numérique de la modulation PTHG sur des structures avec les mêmes propriétés optiques que les axones myélinisés est cohérente avec les résultats expérimentaux sur les axones Mauthner myélinisés : on observe une **augmentation de la modulation PTHG avec l'apparition de la gaine de myéline**, puis une **diminution de la modulation lorsque l'épaisseur de la gaine de myéline croît**. Ces simulations montrent qu'il existe un couplage de la modulation PTHG avec l'épaisseur de la gaine de myéline et le rayon de courbure de l'axone (ou avec le diamètre axonal). En revanche, les simulations donnent des valeurs de modulation sur les axones dorsaux beaucoup plus faibles que celles obtenues expérimentalement. Le point central mis en évidence par les simulations est que **l'épaisseur de la myéline et le diamètre axonal contribuent de manière conjointe sur la valeur de la modulation calculée**. La contribution de l'ordre lipidique  $\chi^{(3)}$  sur la modulation n'a pas été estimée mais on peut remarquer que les effets d'indices linéaires  $n$  sont à l'origine de fortes modulations (entre 0.6 et 0.7 sur des axones de large calibre). Par conséquent, la paramètre de modulation ne peut pas être utilisé directement pour accéder à l'ordre lipidique. En revanche, il peut être exploité pour accéder à l'épaisseur de la gaine de myéline.

Pour caractériser expérimentalement les propriétés des axones myélinisés, on pourra utiliser les contrastes THG et PTHG et les comparer à des simulations théoriques du signal THG qui évaluent les contributions conjointes du diamètre de la structure, de l'épaisseur de la gaine de myéline et de l'ordre lipidique dans la réponse pTHG mesurée sur les axones myélinisés. Pour décrire l'ordre lipidique des structures, il faudrait tenir compte de la forte anisotropie de la gaine de myéline avec un  $\chi^{(3)}$  tensoriel qui comporte des termes diagonaux et de celle de l'axone qui présente également une réponse optique anisotrope. On peut noter que les mesures du diamètre des axones Mauthner (gradient spatial et temporel) réalisées sont utiles pour extraire l'épaisseur de myéline. Pour les petits axones, il paraît plus compliqué de démêler les effets de courbure et d'épaisseur de myéline puisqu'on peut plus difficilement déterminer leur diamètre (2 pics THG peuvent correspondre à deux axones ou aux bords d'un seul axone). Une perspective est d'utiliser le signal de fluorescence pour déterminer leur diamètre et remonter à l'épaisseur de leur myéline. La modulation est davantage sensible à l'ordre moléculaire que sur les gros axones (on a moins l'effet de slab vertical), cependant la modulation varie très fortement avec le diamètre intérieur sur cette plage. De plus, on a peut-être des effets de faisceaux (en collant des axones myélinisés) sur la modulation.



#### 4.1.4 Discussion sur les contrastes THG et P-THG issus des tissus myélinisés

##### Conclusion

Dans cette première partie, nous avons présenté les résultats d'une **caractérisation extensive du contraste THG** sur des tissus myélinisés fixés du CNS de souris et du poisson-zèbre.

Dans un premier temps, nous avons montré que le signal THG généré sur les tissus du CNS de souris est **colocalisé avec les gaines de myéline**. En nous appuyant sur cette propriété, nous avons mis en évidence la capacité de l'imagerie THG à fournir une **description structurelle multi-échelle du CNS de souris, depuis la fibre individuelle myélinisée jusqu'au tissu**. Le contraste THG révèle également avec une forte sensibilité les domaines de matière grise dont le contraste est distinct de celui issu de la substance blanche.

Dans un second temps, pour renseigner le **contraste THG *in vivo*** et caractériser des **états de myélinisation évolutifs**, nous avons imagé des axones myélinisés chez le **poisson-zèbre au cours des stades précoces du développement**. On peut noter que la THG est sensible à des axones individuels avec un diamètre d'un micron. Nous avons rapporté une caractérisation de l'évolution du contraste THG polarimétrique sur des axones myélinisés du poisson-zèbre de différents calibres - de diamètre de plusieurs microns pour les axones Mauthner et de l'ordre du micron pour les axones dorsaux.

Pour finir, nous avons mené une étude combinant des aspects expérimentaux et numériques sur les **contrastés THG et P-THG produits par des structures cylindriques modèles** qui reproduisent la géométrie des axones myélinisées avec des propriétés optiques simplifiées pour mieux comprendre le mécanisme de contraste THG sur des fibres myélinisées. Notamment, nous avons montré l'influence des indices de réfraction dans l'aspect annulaire du contraste THG observé sur une section transverse d'axones parallèles au plan d'imagerie.

La compréhension de la physique des signaux THG polarimétriques par le biais des expériences sur des systèmes modèles et des simulations numériques FDTD est apparue comme un élément essentiel pour interpréter les contrastes observés sur des tissus myélinisés. Il est possible qu'avec une mesure PTHG et une calibration réalisée à partir des simulations FDTD, l'épaisseur de la gaine de myéline puisse être estimée, de sorte à évaluer le *g-ratio*.

##### Positionnement de l'imagerie THG par rapport aux autres modalités de contraste

Comme il a été rappelé dans le chapitre I, les microscopies SCoRe, OCT et CARS - qui ne requièrent pas la présence de fluorophores et reposent exclusivement sur des propriétés optiques intrinsèques des tissus - présentent également une forte sensibilité aux axones myélinisés. Nous discutons ici comment ces techniques se positionnent par rapport au contraste THG pour l'imagerie des tissus myélinisés.

Tout d'abord, le contraste de l'**OCT plein champ** possède une pénétration intéressante dans les tissus ( $> 300 \mu m$  sur des rongeurs vivants [57]) et nécessite une illumination modérée. Cependant, l'OCT se combine difficilement avec la microscopie confocale ou multiphotons pour visualiser des marquages fluorescents.

La **microscopie confocale de réflectance (SCoRe)** est caractérisée par sa sensibilité aux fibres parallèles au plan d'imagerie et par sa capacité à estimer les diamètres extérieurs des fibres myélinisées à partir du contraste qui émerge des interfaces horizontales extérieures [56]. Si ces mesures sont valides sur des axones myélinisés de larges diamètres comme les nerfs sciatiques, elles auront tendance à surestimer le diamètre des petits axones à cause de la faible

résolution axiale du faisceau. Un avantage de la microscopie THG par rapport à l'imagerie SCoRe est d'estimer plus précisément le diamètre des fibres myélinisées en tirant profit de l'aspect annulaire du profil THG transverse des fibres. En effet, le signal qui provient des interfaces verticales est mieux résolu que celui provenant des interfaces horizontales utilisé en microscopie SCoRe. De plus, le contraste THG est sensible aux fibres hors-plan, comme nous l'avons vu pour l'imagerie des fibres du cortex de souris qui présentent des orientations diverses. Enfin, la **microscopie CARS** permet en principe une imagerie chimiquement sélective, basée sur la réponse vibrationnelle des nombreuses liaisons CH présentes dans les régions lipidiques. Par ailleurs, des études récentes en microscopie CARS polarisée ont montré sa capacité à sonder l'ordre moléculaire des lipides dans les gaines épaisses de myéline ainsi qu'à leurs défauts structurels ([131], [106]). En pratique cependant, l'imagerie CARS est gênée par la présence d'un bruit de fond non spécifique qui en limite la sensibilité sur les petites structures. Les études récentes effectuées notamment par l'équipe de Daniel Côté indiquent que la myéline de l'axone Mauthner du poisson-zèbre n'est détectable en CARS qu'après trois jours, soit plus tard que ce que montrent nos résultats avec la THG. Par ailleurs, un aspect non discuté dans la littérature jusqu'ici est que le signal CARS, résultant de la superposition cohérente de deux faisceaux focalisés, est nécessairement altéré par les aberrations liées aux distorsions du volume focal au voisinage d'une interface. On s'attend à ce que cet effet ait tendance à réduire le signal CARS au voisinage d'une structure aberrante. Sur ce point, on peut noter que le contraste THG peut au contraire être augmenté par la présence d'aberrations, comme au niveau d'une petite fibre verticale.

## 4.2 Imagerie THG du cervelet de souris sur un modèle de sclérose en plaques

A la suite de la caractérisation expérimentale et numérique de la réponse THG sur des axones myélinisés individuels de calibres variés qui a fait l'objet de la partie précédente, cette seconde partie présente une **application de l'imagerie THG sur des tissus vivants et myélinisants de cervelet de souris**. Ce travail a été mené en collaboration avec l'équipe de Bruno Stankoff à l'ICM qui possède une connaissance théorique pointue sur la pathologie et sur les modèles expérimentaux de la sclérose en plaques ainsi qu'une grande expertise technique pour la préparation d'échantillons de tissus du CNS de souris.

Nous commençons cette partie avec la présentation d'éléments contextuels sur la structure du cervelet qui est un siège important de changements pathologiques dans la sclérose en plaques. Nous présentons ensuite un premier résultat de notre travail sur la capacité du contraste THG à fournir une **description multi-échelle de la structure des fibres myélinisées** sur des tranches organotypiques non marquées de cervelet de souris. Nous montrons ensuite le potentiel de la microscopie THG pour caractériser le **l'arborescence des fibres** dans des folia pendant le processus de myélinisation. Puis nous explorons la **réponse THG polarimétrique sur les axones myélinisés individuels**. Enfin nous rapportons la capacité des contrastes THG/PTHG à **détecter des changements pathologiques** sur deux modèles présentant des altérations de la myéline, le premier a subi un traitement avec un agent inflammatoire (agent *LysoPhosphatidylCholine* (LPC)), et le second est un modèle mutant avec un déficit de myéline (modèle *shiverer*).

### 4.2.1 Le cervelet : une structure étudiée dans la recherche sur la sclérose en plaques

Le cervelet (<*cerebellum*> : petit cerveau) est une partie du système nerveux central située chez l'homme au-dessous de l'encéphale et en arrière du tronc cérébral (fig. 4.22.a). Il joue un rôle central dans le contrôle moteur et dans certaines fonctions cognitives. En effet, même si le cervelet occupe seulement 10 % du cerveau, il contient la moitié de l'ensemble des neurones, soit une centaine de milliards ! [170] Par le biais de ce réseau complexe de neurones, le cervelet communique avec différentes parties du cerveau et de la moelle épinière et fournit un important traitement d'informations (cf. figure 4.22.b). Cette structure est fréquemment atteinte dans des stades avancés et parfois dans les stades précoces de la sclérose en plaques. Les lésions cérébelleuses sont à l'origine de symptômes cliniques variés tels l'ataxie, une perte d'équilibre, des troubles de l'articulation et des tremblements ainsi qu'un déficit de l'attention ou la difficulté à former ses pensées. Il a été rapporté que les atteintes précoces au cervelet ont une valeur prédictive sur l'évolution de la maladie, cependant elles restent difficiles à dépister.

Nous présentons dans cette première partie la structure anatomique du cervelet, les changements pathologiques et les signes cliniques résultant d'une atteinte du cervelet par la sclérose en plaques, les motivations de l'utilisation du cervelet comme support d'étude de cette pathologie et enfin les modèles expérimentaux d'inflammation et de démyélinisation qui ont été développés pour mieux comprendre les mécanismes de la sclérose en plaques.

### a) La structure anatomique du cervelet

Le cervelet est constitué de trois structures distinctes : la **matière grise**, la **matière blanche** et **trois paires de noyaux** situés dans la partie profonde du cervelet.

#### - La matière grise :

Comme on peut le voir sur la figure 4.22.c, la matière grise est répartie à la surface du cervelet pour former le cortex cérébelleux et en profondeur pour former les noyaux cérébelleux. Le cortex cérébelleux possède une structure laminaire caractéristique avec trois couches distinctes : la couche moléculaire - la plus externe - la couche des cellules de Purkinje et la couche granulaire - la plus interne. Il est creusé par de nombreux sillons dont les plus profonds séparent des lobules cérébelleux. Dans chaque lobule, des sillons moins profonds séparent les folia cérébelleux. Les termes en couleur dans les paragraphes suivants font référence à la figure 4.22.d.

#### *La couche des cellules de Purkinje :*

Les **cellules de Purkinje** sont les cellules principales du cortex cérébelleux et portent leur nom de l'anatomiste qui en fit leur description en 1837. Elles appartiennent à la catégorie des neurones GABAergiques, c'est-à-dire qu'elles exercent une action inhibitrice sur les cellules cibles. Leurs **corps cellulaires** ont un aspect caractéristique en forme de poire - d'environ 20  $\mu m$  de largeur chez l'homme - et sont alignées dans la couche moyenne du cortex cérébelleux située entre la couche moléculaire et la couche granulaire.

Les **axones** des cellules de Purkinje comptent parmi les plus longs neurones du cerveau. Ils partent de la base du corps cellulaire, traversent la couche granulaire et projettent dans la substance blanche cérébelleuse sur les noyaux cérébelleux profonds, de la moelle, du bulbe, du cortex et du tronc cérébral. Ces axones sont myélinisés et leur segment axonal initial (AIS) a une longueur qui varie entre 20  $\mu m$  et 30  $\mu m$ .

Les **arbres dendritiques** des cellules de Purkinje se déploient dans la couche moléculaire du cervelet et présentent des ramifications très développées, un aspect aplati et sont orientés perpendiculairement aux fibres parallèles.

#### *La couche moléculaire :*

La couche moléculaire contient deux types d'interneurones inhibiteurs, les **cellules étoilées** localisées dans la partie superficielle de la couche moléculaire et les **cellules en corbeille** qui se trouvent plus en profondeur. Leurs axones assurent un rétrocontrôle sur les cellules de Purkinje.

#### *La couche granulaire :*

Dans la couche granulaire sont présentes les **cellules granulaires** - auxquelles elle doit son nom - et les **cellules de Golgi**. Les **cellules granulaires** sont des petits neurones glutamatergiques - décrits comme les plus petites cellules du cerveau entier - qui exercent une action excitatrice sur les cellules cibles. Ils reçoivent l'information sensorimotrice du cortex cérébral et de la moelle par les **fibres grimpantes** et les **fibres moussues**. Les axones des cellules granulaires ne sont pas myélinisés et remontent vers la couche moléculaire superficielle - pauvre en cellules - du cortex cérébelleux pour former les **fibres parallèles** qui bifurquent perpendiculairement aux arbres dendritiques des cellules de Purkinje qu'elles relient en un contact unique ainsi qu'aux interneurones de la couche moléculaire (les **cellules étoilées** et les **cellules en corbeille**). Les **cellules de Golgi** - localisées au voisinage des somas de cellules de Purkinje - sont activées par les fibres moussues et régulent les décharges des cellules granulaires à travers des connections inhibitrices.

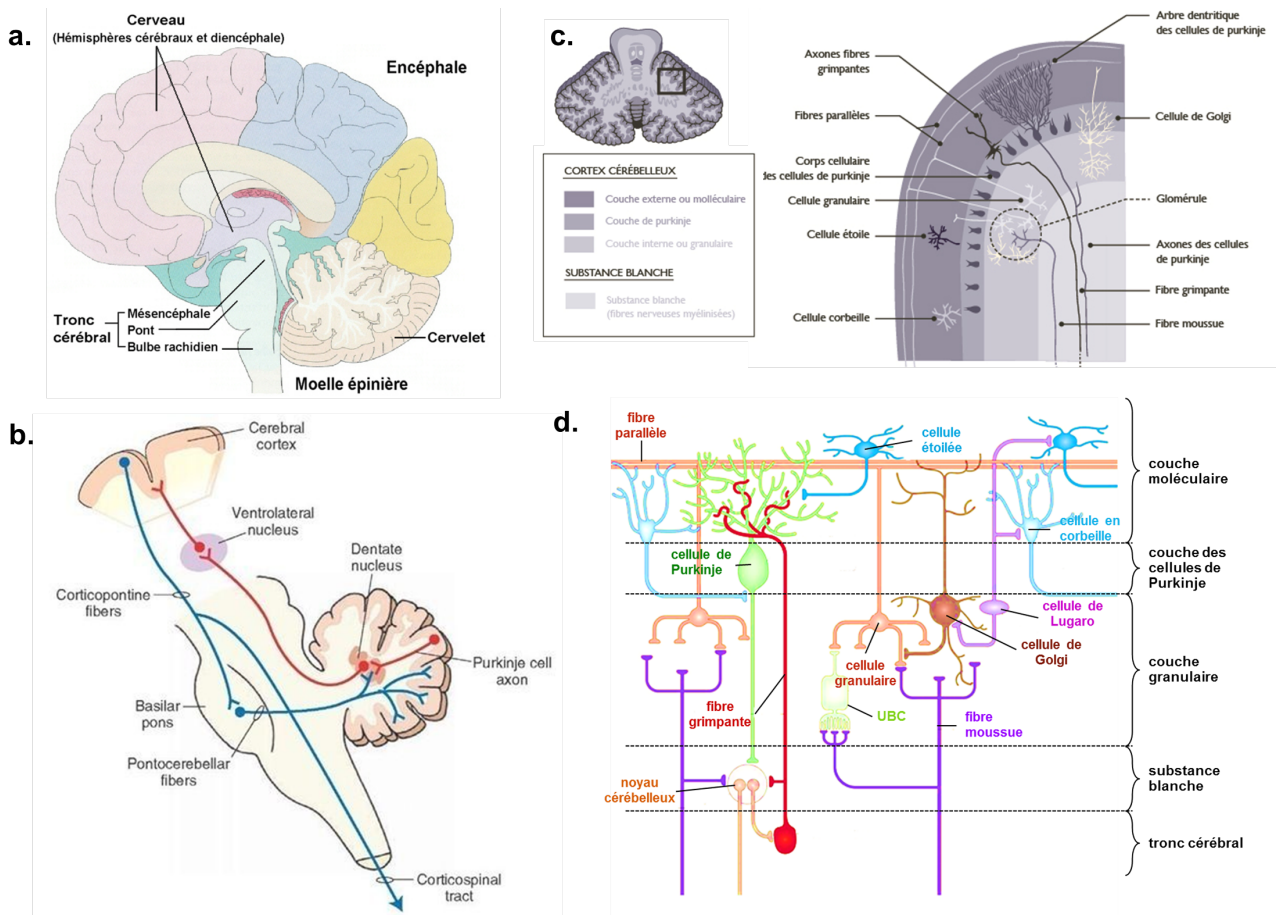


FIGURE 4.22 – Structure du cervelet. a. Structure du cerveau. b. Schéma des connexions entre le cervelet et le cerebrum. c. Coupe transversale du cervelet montrant les principaux types de cellules. d. Structure du cervelet cérébelleux.

Le cortex reçoit 3 types d'afférents (axones excitatoires) extra-cérébelleux : les **fibres moussues** et les **fibres grimpantes**. Les **fibres moussues** reçoivent l'information du cortex cérébral et établissent des connexions dans la couche profonde du cervelet avec les cellules granulaires. Les **fibres grimpantes** amènent l'information en provenance de la moelle épinière jusqu'aux cellules de Purkinje autour desquelles elles s'enroulent.

#### - La matière blanche :

La matière blanche s'étend sous ces trois couches et forme le centre médullaire du cervelet. Elle comporte les fibres myélinisées afférentes (**moussues** et **grimpantes**) provenant notamment de la moelle épinière, du tronc cérébral ou du cerveau, et les fibres éférentes (**axones des cellules de Purkinje**).

#### b) Le cervelet : un siège important de changements pathologiques dans la sclérose en plaques

##### - Signes cliniques et symptômes

Le cervelet et les voies nerveuses en relation avec le cervelet sont parfois affectés dans la phase rémittente de la sclérose en plaques et très fréquemment dans les phases progressives. La présence de lésions dans le cervelet est à l'origine de symptômes ponctuels ou chroniques variés désignés sous le terme de **syndrome cérébelleux**. Ce syndrome se manifeste par des han-



dicaps importants comme des tremblements dans un membre, une perte de coordination des mouvements (ataxie) associée à une marche instable, une perte d'équilibre, des mouvements oculaires saccadés (nystagmus) et/ou des troubles d'élocution (dysarthrie). Il a été montré que les atteintes au cervelet font l'objet d'une faible récupération dans la phase rémittente [171], et que, par conséquent, l'implication du cervelet dans la phase précoce signe une évolution rapide de la maladie [172].

### - Pathologie

L'imagerie par IRM a confirmé l'apparition de changements pathologiques dans le cervelet au cours de la phase rémittente et des phases progressives. Des lésions dans la substance blanche du cervelet sont en effet fréquemment visualisées sur des images par IRM, notamment au niveau des pédoncules [173]. De plus, des études histopathologiques ont montré que le cortex cérébelleux est également un siège de démyélinisation important avec en moyenne 38.7 % de son volume qui est affecté par la démyélinisation chez des patients atteints de phases progressives [32]. Par ailleurs, une inflammation diffuse dans le cervelet est à l'origine d'une atrophie générale du cervelet [174].

Les caractéristiques de la pathologie à l'échelle neuronale sont moins bien connues. Il a été rapporté une diminution de la densité des cellules de Purkinje dans des lésions de la matière grise et la présence de sphéroïdes axonaux (lésions des axones des cellules de Purkinje) mais pas de la densité des synapses [32]. En outre, l'inflammation serait également à l'origine de dommages axonaux diffus dans les régions myélinisées et d'altérations fonctionnelles des canaux ioniques qui modifient les propriétés de déclenchement des signaux [175].

### c) Le cervelet : une structure d'intérêt pour étudier les mécanismes de la sclérose en plaques

La faible capacité du cervelet à se remyéliniser - à l'origine d'un mauvais pronostic lorsque des lésions y apparaissent dans la phase précoce - et la sévérité des signes cliniques qui lui sont associés dans la pathologie de la sclérose en plaques ont récemment suscité un surcroît d'intérêt pour l'étude de la structure du cervelet. Les études récentes visent en particulier à corrélérer les modifications pathologiques aux signes cliniques et à développer des traitements pour la phase progressive.

Un second aspect à l'origine de l'intérêt pour le cervelet réside dans l'architecture spécifique du cortex cérébelleux - constitué de trois couches repliées les unes sur les autres de manière compacte - qui assure une bonne survie des tranches en culture et qui permet d'imager efficacement les neurones et les dendrites dans un plan unique, notamment pour des approches électrophysiologiques.

### d) Modèles expérimentaux de sclérose en plaques

L'accès limité à du matériel humain *postmortem* atteint de sclérose en plaques et les restrictions importantes des conditions dans lesquelles sont menés les **tests cliniques** ont motivé l'utilisation de **modèles de sclérose en plaques sur des souris** pour étudier les mécanismes immunitaire et pathologique impliqués dans l'évolution de la maladie et les tests de nouveaux agents thérapeutiques [176].

Parmi eux, l'**encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE)** ([177]) est le modèle animal de sclérose en plaques le plus largement utilisé. Il mime le **processus inflammatoire** du CNS caractéristique de la sclérose en plaques après une injection systémique d'un adjuvant et de peptides synthétiques dérivés de protéines de myéline causant des dommages sur les



oligodendrocytes à l'origine de lésions focales. Un inconvénient majeur de ce modèle découle de la simultanéité des processus de démyélinisation et de remyélinisation qui empêche d'étudier indépendamment ces deux mécanismes.

A la différence de l'EAE, le **lysophosphatidylcholine** (LPC) ([178]) et le **cuprizone** ([179]) - deux **modèles de démyélinisation** induits par une toxine - sont utilisés pour étudier les mécanismes successifs de démyélinisation puis de remyélinisation. L'injection du LPC dans le cerveau ou la moelle épinière d'une souris vivante conduit à la formation d'une lésion focale démyélinisante via l'activation des microglies. Le traitement *cuprizone* - administré par voie orale sur des animaux vivants - cause la disparition des oligodendrocytes et l'activation des microglies à l'origine de la formation de lésions démyélinisantes dispersées dans le CNS des animaux.

### 4.2.2 Le modèle des tranches organotypiques de cervelet pour l'étude du contraste THG

Dans le cadre de l'étude du contraste THG sur le cervelet de souris, nous avons choisi d'utiliser comme support des tranches de cervelet maintenues vivantes en **culture organotypique** - qui présente les avantages décrits dans l'encart 4.10. Le choix de ce modèle a également été motivé par l'expertise de l'ICM pour la préparation et la connaissance de ce support. Nous présentons ici quelques éléments informatifs sur la dynamique temporelle du processus de myélinisation des tranches organotypiques du cervelet de souris.

#### ***Encart 4.10 - Avantages des tranches organotypiques (à partir de la revue [180]) :***

- La meilleure alternative aux expériences *in vivo*, sur des tranches fines de cerveau ou cultures primaires de neurones qui sont très fragiles.
- Préservation de la cytoarchitecture (réseaux neuronaux, interaction neurones-cellules gliales) des tissus pour réaliser des expériences pharmacologiques (stratégies thérapeutiques), génétiques ou d'imagerie sur une longue période (approches électrophysiologiques).
- Le modèle le plus utilisé et le plus approprié pour étudier en 3D des mécanismes moléculaires et cellulaires de la myélinisation, démyélinisation et remyélinisation des axones des cellules de Purkinje.

#### **- Conservation de la dynamique temporelle du processus de myélinisation sur des tranches organotypiques de cervelet de souris**

Il a été rapporté que la dynamique temporelle de myélinisation des cellules de Purkinje sur des cultures organotypiques de souris est conservée par comparaison au développement *in vivo* [181], depuis le début de la myélinisation des axones de cellules de Purkinje qui a lieu après la première semaine de développement postnatal [182] jusqu'à la fin du processus qui s'achève deux semaines après la naissance. Lorsque les tranches de cervelet sont préparées (entre *P8* et *P10*), une majorité des axones des cellules de Purkinje ne sont pas encore myélinisés par les oligodendrocytes. Un second point important est que les axones des cellules de Purkinje sont les seuls axones myélinisés préservés sur les tranches organotypiques de cervelet car les autres axones mélinisés afférents (fibres moussues, fibres grimpantes et les axones des neurones de projection localisés dans les noyaux cérébelleux profonds) présents *in vivo* dégèrent au bout de quelques jours de culture *in vitro* à cause de leur dissociation avec leurs corps cellulaires.

### - Chronologie des mécanismes de myélinisation, démyélinisation et remyélinisation

La figure 4.23.c présente la chronologie précise des mécanismes de myélinisation, démyélinisation et remyélinisation sur les tranches de cervelet de souris mises en culture organotypique :

- **DIV3** : A partir de ce stade, les tranches deviennent fortement adhérentes aux membranes semi-perméables, ce qui a l'avantage de les maintenir à plat pendant l'imagerie 2D. Par ailleurs, la myélinisation des folia est déjà initiée et la distribution des fibres myélinisées présente un gradient spatial avec une densité moyenne de fibres à proximité de la substance blanche et quelques rares fibres plus loin dans le cortex cérébelleux.
- **DIV 3 - DIV 5** : Durant cet intervalle de temps se déroule l'épisode de myélinisation le plus dynamique autour des fibres des folia.
- **DIV 7** : Ce stade marque l'achèvement de la myélinisation des folia, et correspond au moment choisi pour appliquer le traitement démyélinisant (LPC) sur certaines tranches.
- **DIV 9** (48 heures après le traitement) : La démyélinisation est complète et la préservation des corps des cellules de Purkinje malgré la démyélinisation témoigne de la bonne santé des tissus.
- **DIV 11 - DIV 13** : Cette période correspond à la phase de remyélinisation intensive des axones démyélinisés sur les tranches ayant subies un traitement LPC.

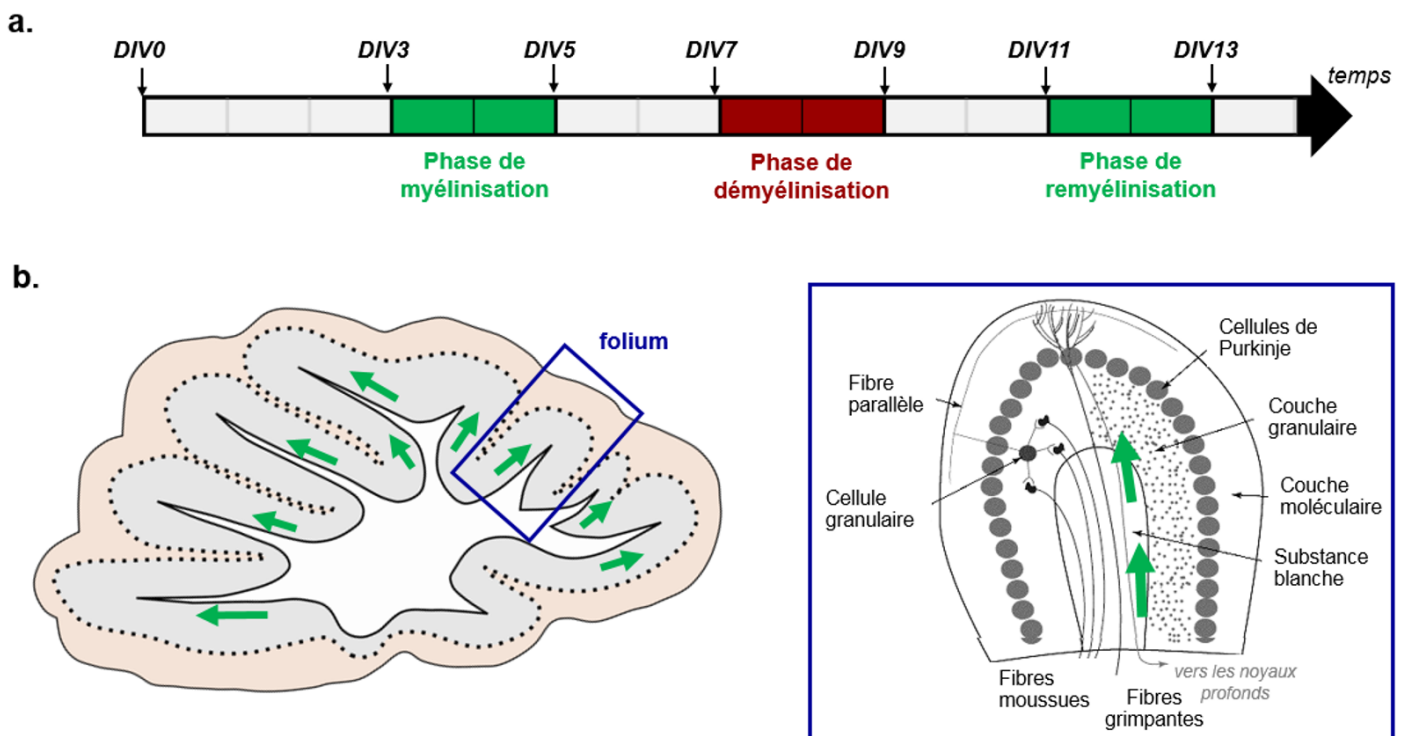


FIGURE 4.23 – a. Temporalité du processus de myélinisation. b. Dynamique de la myélinisation des folia sur des cultures de tranches de cervelet. Folium adapté de [180].

### 4.2.3 Description multi-échelle de la structure du cervelet de souris en contraste THG

Nous présentons dans les paragraphes suivants les résultats de l'imagerie 2D en contraste THG sur des tranches organotypiques de cervelet de souris. Nous commençons par décrire succinctement le travail d'optimisation des conditions d'imagerie qui a été nécessaire pour mieux conserver les tranches pendant les acquisitions, puis nous présentons les résultats de la caractérisation de la sensibilité du contraste THG sur des fibres myélinisées à plusieurs échelles : sur les faisceaux de la matière blanche dans l'ensemble du tissu, puis dans les folia, et enfin au niveau des fibres individuelles de la matière grise.

Les protocoles utilisés pour la préparation et la culture des échantillons sont réunis dans l'annexe G.

#### - Premiers résultats et travail d'optimisation des conditions d'imagerie

Les premiers tests d'imagerie en contraste THG sur une tranche organotypique de cervelet de souris ont été réalisés dans une chambre d'imagerie *OKOLab* à 37°C (température effective) régulée en oxygène et en  $CO_2$ .

##### *Contraste THG sur la matière blanche de l'ensemble du tissu*

Sur la mosaïque 2D ( $15 \times 8$  champs) présentée sur la figure 4.24.a, le contraste THG fait apparaître l'architecture de la substance blanche dans son ensemble, caractérisée par de larges faisceaux formés par les axones myélinisés des cellules de Purkinje qui s'étendent des folia jusqu'au centre de la tranche. Le tissu cellulaire sur la partie externe des folia de la tranche est également à l'origine d'un faible signal THG lié à la composante non-spécifique de la myéline du signal THG. Le calcul du rapport  $I_{THG, fibres} / I_{THG, tissu}$  à partir du contraste THG issu d'un domaine sur le faisceau et d'un autre sur le tissu externe a permis d'estimer une valeur supérieure à 2, ce qui valide la très forte sensibilité du contraste sur des fibres du cervelet.

Par ailleurs, on peut noter que l'amincissement non uniforme du tissu - plus prononcé dans la substance grise que dans la substance blanche - permet difficilement de visualiser l'ensemble des domaines de la tranche dans un plan d'imagerie unique. L'acquisition de larges mosaïques en contraste THG sur les tranches organotypiques tirerait largement profit de l'imagerie de l'échantillon en configuration inversée ou bien de la mise en place ultérieure d'un ajustement de la puissance incidente sous l'objectif en fonction du contraste THG généré sur la région imagée.

##### *Contraste THG sur les folia*

Des acquisitions mieux résolues sur des folia individuels montrent que les fibres myélinisées individuelles sont localement dégénérées avec la présence de sphéroïdes axonaux (*swellings*) dont les contours sont visibles en contraste THG. Ces premiers tests d'imagerie THG sur des tranches organotypiques soulignent la nécessité d'une régulation adéquate des paramètres de température, d'oxygène et de  $CO_2$  à l'intérieur de la chambre d'imagerie pour maintenir les tranches en bonne santé.

#### - Caractérisation multi-échelle du contraste THG sur des tranches organotypiques de cervelet

Comme décrit dans la littérature, la température de la chambre d'imagerie est un facteur critique pour conserver les tranches dans un état proche de leur état en culture au cours de l'imagerie. Une diminution sensible de la température (35.5°C) a permis d'acquérir des images

THG sur lesquelles l'arborescence des fibres paraît beaucoup mieux préservée, ce qui nous a donné la possibilité d'étudier plus précisément le contraste issu des fibres individuelles.

#### *Contraste THG sur la matière blanche dans les folia*

Au centre de chaque folium imagé, un dense faisceau formé par la convergence des axones myélinisés issus des cellules de Purkinje est visualisable avec un fort signal THG (cf. figure 4.24.b). Le rapport  $I_{THG,fibres}/I_{THG,tissu}$  mesuré entre un domaine du faisceau et la couche cellulaire externe donne une valeur proche de 5, ce qui confirme également ici la très bonne sensibilité du contraste THG sur cette structure. Compte tenu de la forte densité des fibres au sein de ce faisceau, les fibres individuelles sont difficilement identifiables sur les images en contraste THG.

#### *Contraste THG sur les fibres individuelles dans la matière grise des folia*

A la différence du faisceau central, la couche granulaire révèle des axones myélinisés individuels épars avec une distribution en arborescence. Ces axones - localement contenus dans le plan d'imagerie - sont identifiables distinctement sous l'aspect de segments (indiqués par des flèches jaunes sur la figure 4.24.c).

Pour aller plus loin dans la caractérisation du signal sur une fibre individuelle, nous avons extrait le profil transverse sur un axone au niveau du trait en pointillé tracé sur la figure 4.24.c. Ce profil fait apparaître deux pics minces - issus des gaines de myéline sur les deux bords latéraux de l'axone - distants de  $2 \mu m$ , qui est en bonne adéquation avec les diamètres rapportés dans la littérature sur les axones des cellules de Purkinje.

#### *Absence de contraste THG sur les autres fibres*

On peut souligner que ni les dendrites - du fait de leur absence de myéline - ni les autres fibres afférentes et efférentes myélinisées du cervelet - qui ne sont pas préservées après quelques jours de culture comme mentionné plus haut - ne sont visibles sur les acquisitions en contraste THG sur les folia.

#### *Contraste THG sur les autres structures*

Ces acquisitions font également apparaître la structure en couches caractéristique du cortex cérébelleux :

- (i) Les **noyaux des cellules de Purkinje** (indiqués sur la figure par des triangles jaunes) - identifiables en contraste THG négatif - sont alignés en forme de couronne sur le bord du folium, et les nucléoles à l'intérieur des noyaux cellulaires sont apparentes en contraste positif.
- (ii) Les **couches cérébelleuses moléculaire et granulaire** situées de part et d'autre de la couche des cellules de Purkinje présentent un contraste THG relativement faible. A fort grandissement, ces deux couches révèlent des propriétés optiques distinctes relatives à des compositions cellulaires différentes. La couche moléculaire (CM) - située dans la partie la plus externe du cortex cérébelleux - présente un contraste tacheté qui rappelle un effet de *speckle*. On peut supposer que la superposition des fibres non-myélinisées des arbres dendritiques est à l'origine d'interférences localement constructives ou destructives du signal THG. A l'intérieur de la couronne de cellules de Purkinje, la couche granulaire (CG) qui compte un grand nombre de corps neuronaux fait apparaître des petits domaines en contraste négatif.

#### **- Conclusion sur l'imagerie THG multi-échelle de la structure du cervelet**

Dans cette sous-partie, nous avons montré la **grande sensibilité du contraste THG sur les fibres myélinisées de tissus de cervelet de souris**. En nous appuyant sur cette propriété,



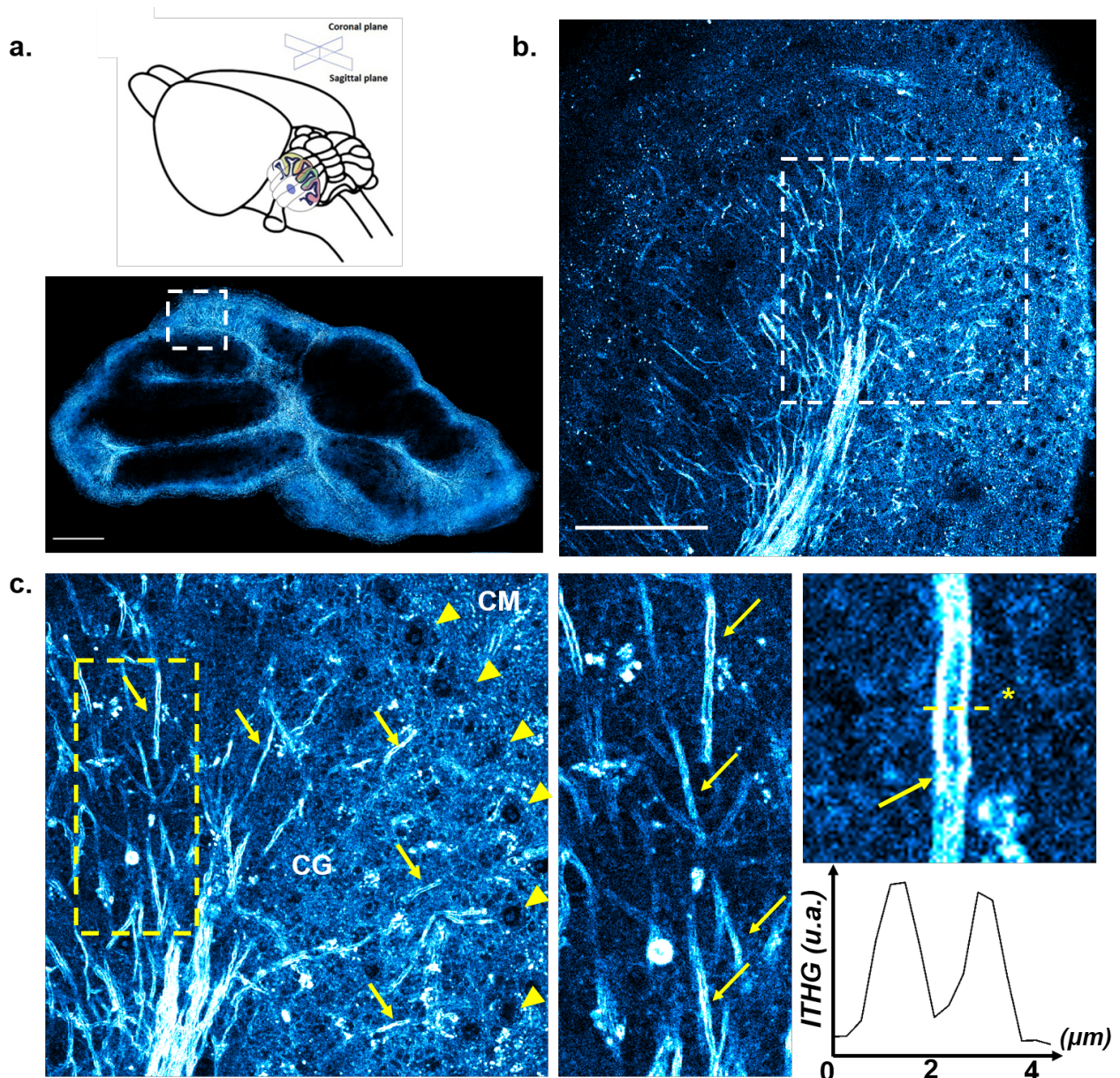


FIGURE 4.24 – Imagerie THG sur des tranches organotypiques de cervelet de souris. a. Mosaïque acquise sur un tissu conservé jusqu'à *DIV9* en culture et imagé dans un environnement à  $37^{\circ}\text{C}$ . Echelle :  $500\ \mu\text{m}$ . b. Imagerie THG sur un folium à *DIV6* avec une température dans chambre d'imagerie de  $35.5^{\circ}\text{C}$ . Echelle :  $100\ \mu\text{m}$ . c. Imagerie THG à forte résolution sur une région d'un folium. Identification des fibres myélinisées et aperçu du profil transverse associé.

nous avons ensuite montré la capacité du contraste THG à décrire la **structure du tissu de cervelet** à basse résolution avec la présence d'un **fort signal émergeant des faisceaux de matière blanche** puis à plus forte résolution dans les folia et sur les **fibres individuelles de la matière grise**. Nous avons également été en mesure de visualiser les couches du cortex cérébelleux grâce au caractère non-spécifique du contraste THG.

#### 4.2.4 Evolution du contraste THG au cours du processus de myélinisation du cervelet

La visibilité des axones myélinisés dans les folia nous a ensuite encouragés à étudier en 2D et 3D l'évolution du contraste THG sur les fibres des cellules de Purkinje pendant le processus de myélinisation. Nous avons de nouveau utilisé des tranches organotypiques - qui sont un modèle classique et performant pour suivre l'avancement de la myélinisation (cf. encadré 4.10) - comme support pour imager des folia à des stades successifs du développement entre *DIV3* et *DIV8*. Du fait de la forte sensibilité de la structure et du métabolisme des tissus soumis à des fluctuations des conditions de conservation, notamment pendant l'imagerie, de nouvelles tranches ont été imagées aux différentes étapes.

##### a) Visualisation en contraste THG de la progression de la myélinisation sur l'arborescence des axones des cellules de Purkinje

Sur la figure 4.25.a, on peut visualiser le contraste THG sur trois folia conservés en culture jusqu'aux stades *DIV4*, *DIV6* et *DIV8*. Il apparaît une nette progression de la myélinisation des fibres depuis (i) le stade *DIV4* où le contraste THG révèle un mince faisceau de matière blanche au centre du folium et quelques rares fibres myélinisées éparses dans la couche granulaire, jusqu'au (ii) stade *DIV8* où le faisceau central d'axones myélinisés présente un aspect plus épais et où de nombreuses fibres sont visibles dans la matière grise.

##### b) Cartographie 3D de l'arborescence des fibres myélinisées

Pour s'affranchir des disparités qui peuvent exister entre les différentes profondeurs du folium, une stratégie est de réaliser une imagerie 3D du contraste THG sur toute l'épaisseur des folia. De plus, comme le nombre et la densité des fibres dépendent potentiellement de la dimension des folia, il semble important de comparer deux à deux des folia identiques situés sur le haut de deux tranches prélevées sur le même animal puis mises en culture, et imagées, l'une à un stade précoce, et l'autre à un stade plus avancé.

Dans ce but, nous avons réalisé des acquisitions THG 3D sur deux tissus provenant du même folium à *DIV4* et *DIV6* - dont plusieurs plans sont présentés sur les figures 4.25.b et c. Ces images nous permettent qualitativement de confirmer la densification de l'arborescence entre *DIV4* et *DIV6*.

Pour aller plus loin dans la caractérisation de l'état de myélinisation des folia, la capacité remarquable à identifier les fibres myélinisées individuelles en 3D à partir du contraste THG nous a incité à tracer l'arborescence des fibres myélinisées. Un résultat de traçage réalisé manuellement avec le logiciel *Imaris* est présenté sur la 4.25.c.

Un prolongement de ce travail consistera à utiliser le traçage de ces arborescences pour extraire une quantification de la progression de la myélinisation basées sur des mesures morphologiques (densité, nombre, longueur, largeur, directionnalité des fibres myélinisées...).

##### - Conclusion sur la visualisation de l'évolution de la myélinisation de l'arborescence des fibres myélinisées en contraste THG

Dans cette sous-partie, nous avons montré que le contraste THG sur des acquisitions 2D permet de suivre **la progression de la myélinisation de l'arborescence des fibres myélinisées** caractérisée par la densification du faisceau central et l'apparition du contraste sur les fibres dans la matière grise. La capacité nouvelle de **tracer les fibres myélinisées dans les folia**



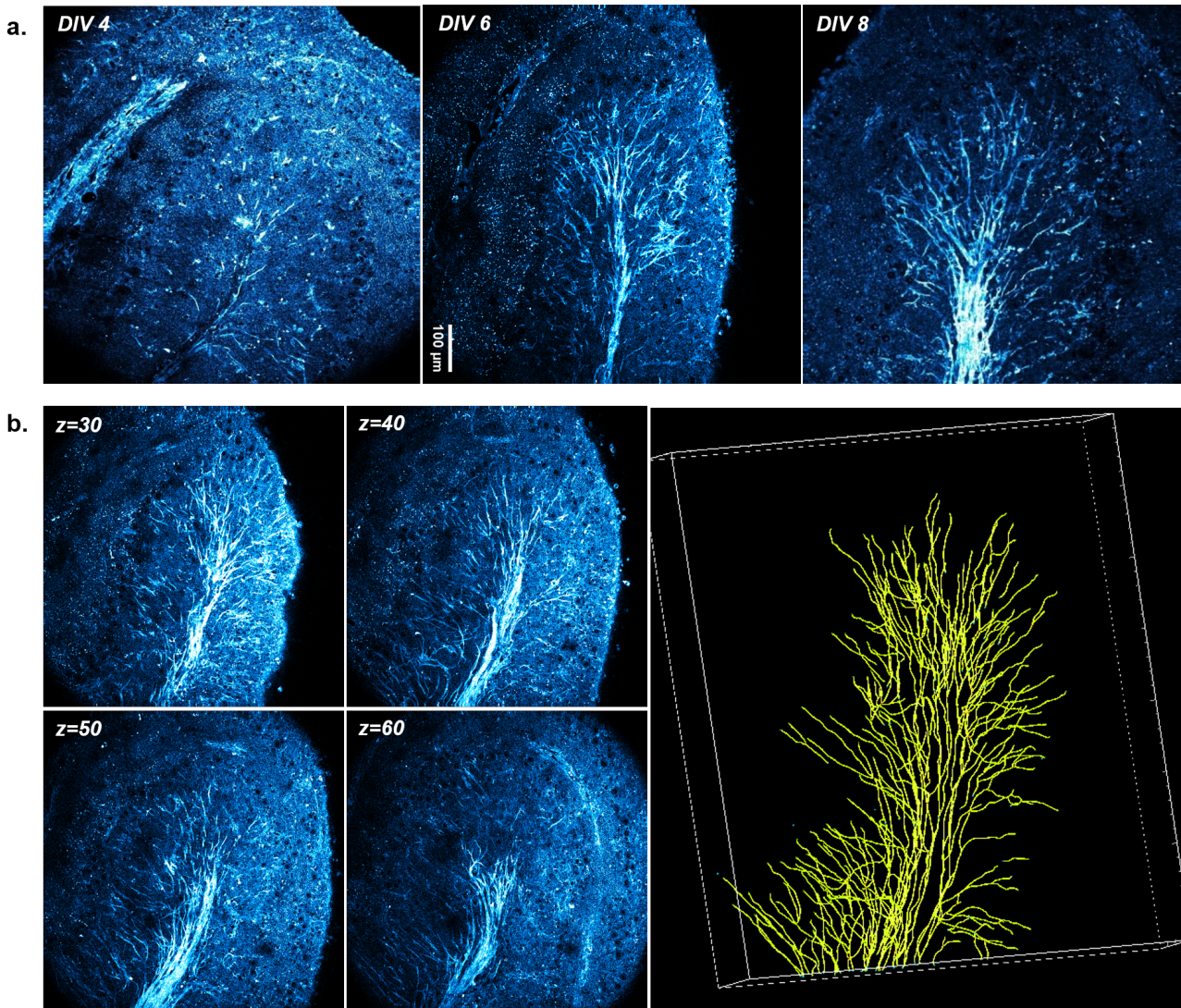


FIGURE 4.25 – Evolution du contraste THG sur les folia pendant le processus de myélinisation. a. Visualisation du contraste THG provenant d'un plan d'imagerie sur des folia conservés en culture jusqu'à  $DIV_4$ ,  $DIV_6$  et  $DIV_7$ . b. Projection des contrastes THG provenant d'acquisitions 3D sur deux folia développés jusqu'aux stades  $DIV_4$  et  $DIV_6$ . c. Visualisation du traçage de l'arborescence des axones myélinisés des cellules de Purkinje sur le folium imagé à  $DIV_6$ .

à partir d'acquisition THG 3D, permettra ultérieurement de raffiner la caractérisation de la progression de la myélinisation.

#### 4.2.5 Contraste THG polarimétrique sur des axones myélinisés du cervelet de souris

Nous avons réalisé une caractérisation du contraste THG polarimétrique sur quelques fibres individuelles de la matière grise du cervelet et comparé leur réponse avec les axones de la moelle épinière du poisson-zèbre.

a) Mise en évidence de la dépendance du contraste THG avec la polarisation sur les images PTHG et la carte de modulation

Similairement aux axones Mauthner, le contraste THG qui émerge des segments de axones myélinisés des cellules de Purkinje exprime une **forte dépendance avec l'orientation de la polarisation incidente**, caractérisée par un trait unique sur le bord de l'axone lorsque la polarisation est parallèle à l'axone et par un double trait pour une polarisation orthogonale à l'axone (montré sur la figure 4.26.a). La carte de modulation fait ressortir une forte modulation sous l'aspect d'un trait sur le bord de l'axone et la carte angulaire fait apparaître un angle parallèle à l'axe axonal sur le bord de l'axone.

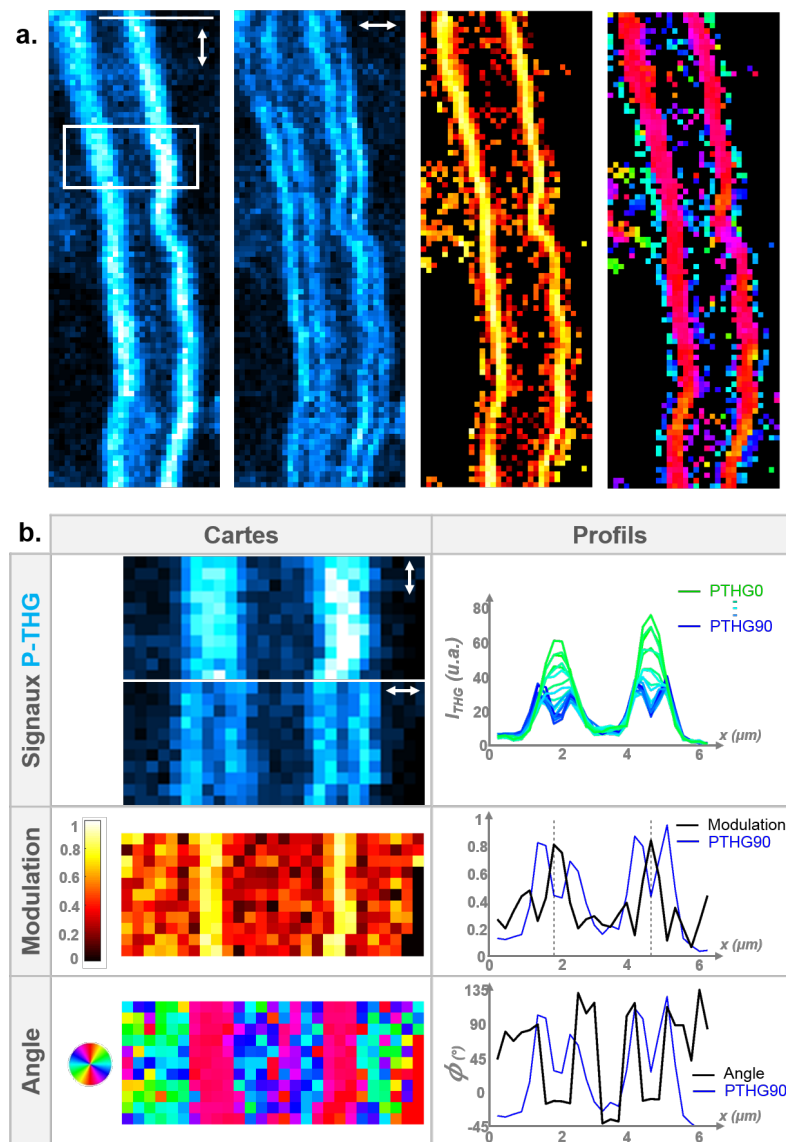


FIGURE 4.26 – Imagerie THG sur l'axone myélinisé d'une cellule de Purkinje. a. Cartes PTHG0, PTHG90, carte de modulation et carte angulaire. Echelle :  $5 \mu m$ . b. Analyse des profils PTHG, de modulation et angulaire sur une région d'intérêt de l'acquisition précédente.

### b) Caractérisation de la dépendance du contraste THG avec la polarisation sur les profils extraits

Pour décrire précisément les positions relatives du contraste PTHG et des paramètres étudiés, nous avons extrait les profils sur une région d'intérêt de petite dimension dont les lignes ont été recalées en appliquant la méthode décrite dans la partie 1.2 de ce chapitre. La figure 4.26.b présente les profils PTHG et les profils de modulation et angulaire déduits des signaux PTHG superposés au profil PTHG90. Similairement aux profils tracés sur l'axone Mauthner, on retrouve une forte modulation des signaux PTHG sur les bords de l'axone.

Cependant, pour une polarisation orthogonale à l'axe axonal, on observe clairement ici l'apparition de deux pics sur les interfaces extérieures avec une amplitude du signal THG plus faible entre ces pics en comparaison de celle provenant du pic unique obtenu pour une polarisation parallèle à l'axone.

Sur le profil angulaire, ces variations se traduisent par la présence d'une valeur angulaire nulle (associée à une polarisation parallèle à l'axone) entre ces deux pics PTHG90 et proche de  $90^\circ$  (polarisation perpendiculaire à l'axone) de part et d'autre des pics. On peut également noter que le signal THG qui émerge du centre de l'axone est légèrement majoré pour une polarisation parallèle à l'axone.

### c) Comparaison avec la réponse PTHG sur les axones Mauthner

Pour comprendre l'origine des divergences entre les profils PTHG issus de l'axone Mauthner du poisson-zèbre et de l'axone de Purkinje dans le cervelet de souris, il faut s'intéresser aux valeurs du *g-ratio* de ces différents types d'axones. Le *g-ratio* des fibres du cervelet de souris est estimé autour de 0.7 – 0.8, tandis que celui de l'axone Mauthner a été évalué à 0.91 [164]. L'épaisseur de la gaine de myéline déduite de la valeur du *g-ratio* de l'axone Mauthner est égale à  $0.2 \mu\text{m}$  pour un diamètre axonal d'environ  $4 \mu\text{m}$ , tandis que celle de l'axone d'une cellule de Purkinje est égale à  $0.4 \mu\text{m}$  pour un diamètre axonal d'environ  $2 \mu\text{m}$ . Connaissant la résolution latérale du volume focal qui est d'environ  $0.4 \mu\text{m}$ , les deux interfaces de la gaine de myéline peuvent effectivement être visualisées en contraste THG sur des fibres du cervelet.

Par ailleurs, pour expliquer que seule la polarisation d'excitation orthogonale à l'axone de Purkinje permet de visualiser les bords de l'axone, nous avons réalisé des simulations FDTD sur des géométries cylindriques isotropes du même calibre que la fibre de Purkinje. Ces simulations reproduisent le dédoublement des bords de la myéline observé expérimentalement pour une polarisation, ce qui signifie que le désaccord d'indice entre l'axone, la myéline et le milieu environnant modifie l'aspect de la réponse THG sur la myéline. Il serait intéressant ici aussi d'évaluer numériquement l'effet de l'anisotropie de la myéline sur la résolution de la myéline.

### d) Perspective d'une étude de la réponse THG polarimétrique pendant le développement

Une étude plus complète de l'évolution des signaux THG polarimétriques sur des axones myélinisés des cellules de Purkinje a été compromise par la grande fragilité des fibres myélinisées des tranches organotypiques pendant l'étape de myélinisation. Pour tenter de caractériser l'évolution de l'ordre moléculaire de la gaine de myéline à plusieurs étapes de la myélinisation et de la remyélinisation, il faudrait envisager l'utilisation de tranches organotypiques fixées. Un autre aspect intéressant à approfondir est de caractériser l'épaisseur de la myéline dans les tranches organotypiques remyélinisées qui a été rapportée être inférieure à celles des gaines non-démélinisées.



#### e) Conclusion de l'étude THG polarimétrique menée sur les axones myélinisés du cervelet

Nous avons mis en évidence la **forte dépendance de la réponse THG avec l'orientation de la polarisation incidente**. Bien que la compréhension du signal ne soit pas encore complète, ces variations contiennent la signature de l'ordre moléculaire de la fibre myélinisée.

### 4.2.6 Contraste THG sur des tissus pathologiques

Nous nous sommes ensuite intéressés à évaluer dans quelle mesure le contraste THG est sensible aux défauts de la myéline. Pour cela, nous avons utilisé des tissus de cervelet provenant de deux modèles pathologiques dismyélinisés : (a) des tranches organotypiques préparées sur une souris normale auxquelles a été appliqué l'agent *LysoPhosphatidylCholine* (LPC) et (b) des tranches préparées sur une souris mutante hypomyélinisée *shiverer*.

#### a) Contraste THG sur des tranches organotypiques traitées avec l'agent LPC

Comme décrit plus haut, l'agent LPC initie une réaction immunitaire avec activation des microglies présentes dans le tissu, à l'origine d'une inflammation de la myéline entourant les axones. Il a également été rapporté que les corps neuronaux des cellules de Purkinje et les neurones des cellules granulaires se conservent en présence du traitement LPC [178].

#### ***Encart 4.11 - Matériel et méthode : Traitement LPC démyélinisant***

Le traitement LPC a été appliqué aux tranches organotypiques au stade *DIV7* (habituellement vers 18h) en déposant les membranes semi-perméables dans des puits contenant 1 *mL* d'une solution de LPC. Cette solution est préparée par dilution à 1/100 d'une solution de **LPC** décongelée et vortexée (ex : 10  $\mu$ L) dans le **milieu de culture** (ex : 1 *mL*). 15 heures après l'application du traitement (généralement le lendemain matin à 9 h), le traitement LPC a été évacué et les membranes ont été rincées par contact de la face du dessous avec du milieu de culture, puis elles ont été déposées dans des puits contenant 1 *mL* de milieu de culture frais. Les tranches ont été imagées au stade *DIV9*.

A la différence des tissus non-traités (cf. figure 4.27.a), les tissus traités avec le LPC ne présentent pas de contraste THG sur les fibres myélinisées individuelles de la couche granulaire mais révèlent un fort contraste THG sur des petits domaines de forme ovoïde répartis dans tout le folium (cf. figure 4.27.b). Ces observations confirment la disparition de la myéline sous l'effet du traitement LPC. De plus, les petits domaines observés sont probablement des agrégats de débris de myéline formés par les microglies/ vésicules de dégradation à l'intérieur des microglies après la destruction des gaines de myéline. Un marquage spécifique des microglies permettrait de colocaliser les débris de myéline identifiables en contraste THG avec les microglies rendus visibles en fluorescence. Par ailleurs, le contraste THG négatif qui persiste au niveau des noyaux des cellules de Purkinje des tranches traitées, montre que la concentration de la solution LPC utilisée n'endommage pas la structure du tissu.

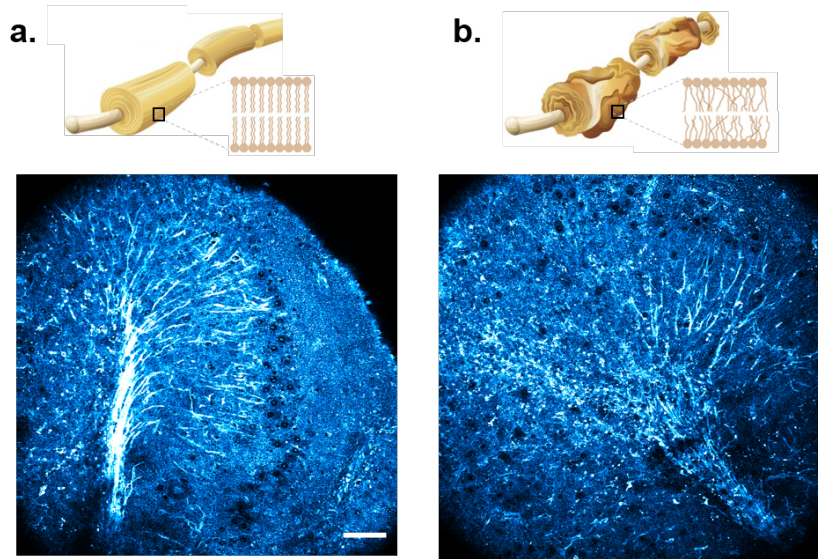


FIGURE 4.27 – Comparaison des contrastes THG émergents de tissus de cervelet non-traité et traité avec du LPC. a. Contraste THG sur un folium d’une tranche organotypique de cervelet non-traitée. b. Contraste THG sur un folium traité avec le LPC. Echelle :  $100\ \mu\text{m}$

#### b) Contraste THG sur des tissus *shiverer*

Le second aspect de l’étude du contraste THG sur des tissus avec des défauts de myélinisation utilise le modèle hypomyélinisé *shiverer* décrit dans l’encart 4.12. Comme nous allons le voir, la présence d’une fine gaine de myéline peu compacte autour des fibres induit une persistance du contraste THG sur le faisceau central, ce qui nous a permis une comparaison quantitative des réponses THG et PTHG sur des régions de la substance blanche des tissus normaux et *shiverer* (cf. figure 4.28).

#### **Encart 4.12 - Matériel et méthode : Préparation des tissus et méthode d’imagerie**

Les tissus imagés ont été prélevés sur une souris contrôle et sur une souris *shiverer* (homozygote pour la mutation récessive autosomale *shiverer*). Ces deux souris - âgées de 2 mois - sont issues de la même portée conçue de deux parents *shiverer* hétérozygotes (caractère récessif du gène *shiverer*). Des tranches de  $100\ \mu\text{m}$  d’épaisseur ont été réalisées dans l’ensemble du cervelet de ces deux souris puis ont été fixées dans du PFA à l’ICM. Nous avons imagé au LOB le contraste THG dans des plans situés à environ  $20\ \mu\text{m}$  de profondeur sur des folia de 6 tranches provenant de régions identiques dans les deux cervelets. Pour chaque folium, nous avons réalisé 3 acquisitions P-THG dans 3 petites régions d’intérêt de la substance blanche en remontant depuis l’extrémité du faisceau de fibres myélinisées vers l’intérieur des folia.

Les acquisitions THG sur des tissus normaux et *shiverer* font apparaître une diminution qualitative du contraste THG entre les faisceaux denses d’axones myélinisés et la couche moléculaire sur les tissus *shiverer* en comparaison des tissus normaux en accord avec les premières observations rapportées par Farrar et al. [94].

Cette étude statistique caractérise plus précisément la sensibilité du contraste THG polarimétrique sur ces tissus : le contraste THG chute de 45.0 % et la modulation PTHG diminue de 15.7 %.

**Encart 4.13 - Modèle de souris *shiverer* :**

Le modèle *shiverer* est un modèle mutant de souris qui présente un **déficit de myéline dans le CNS** [183]. Ce déficit trouve son origine dans une mutation récessive autosomale du gène codant la protéine basique de la myéline (MBP : Myelin basic protein) [184], responsable de l'adhésion des plis cytoplasmiques. Cette mutation empêche une compaction correcte de la myéline, qui a pour conséquence la formation de gaines de myéline plus fines avec un nombre réduit d'enroulements dans la gaine de myéline autour des axones exclusivement dans le CNS des souris [185]. Cependant, aucune altération majeure de la structure des axones n'a été rapportée bien qu'ils présentent un diamètre plus petit que ceux des souris normales. Ce défaut de myélinisation est associé à une distribution des canaux de sodium tout le long de l'axo-lemme, de sorte que la conduction axonale est assurée mais que la propagation des potentiels d'action s'effectue sans accélération/saut (non saltatoire). Les souris *shiverer* ont un comportement distinct caractérisé par des tremblements (*shivering*), des convulsions et une mort précoce.

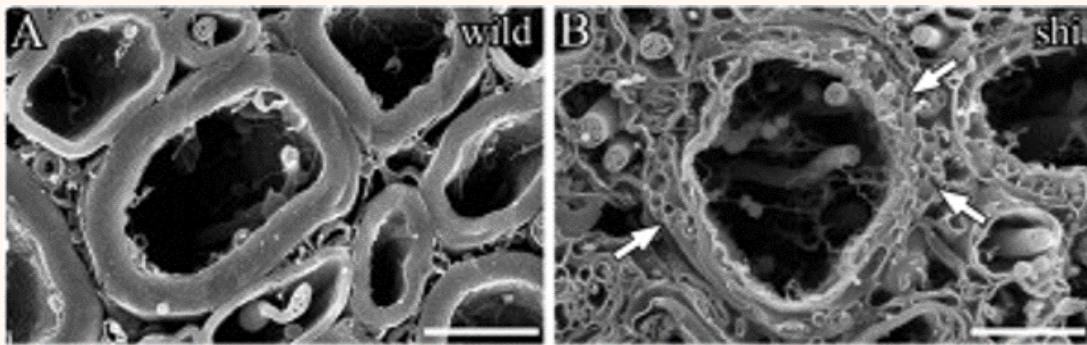


FIGURE 4.28 – Ultrastructure de la myéline imagée en microscopie électronique à balayage sur des axones de moelle épinière de souris de type *sauvage* et *shiverer*. Barre d'échelle : 1.5  $\mu\text{m}$ . Adapté de [186].

**Encart 4.14 - Matériel et méthode : Méthode d'analyse**

Pour être sélectif des régions myélinisées sur ces images, nous avons construit un filtre en imposant un seuil sur le calcul du  $R^2 \geq 0.5$  et un seuil sur le bruit pour conserver uniquement les pixels avec en moyenne plus d'un photon par pixel par accumulation. Nous avons ensuite réalisé une opération d'érosion (-1) - dilatation (+4) sur le filtre calculé pour retirer les pixels isolés et prendre en compte des régions étendues de faisceaux denses myélinisés.

Après avoir appliqué ce masque dans chaque région d'intérêt, nous avons extrait 3 paramètres quantitatifs :

- (i) le niveau d'intensité THG
- (ii) la modulation PTHG
- (iii) la dispersion angulaire

**c) Conclusion**

A travers une caractérisation fine des contrastes THG et PTHG générés sur des tranches organotypiques ayant subies une inflammation induite par l'agent LPC et sur des tranches fixées de



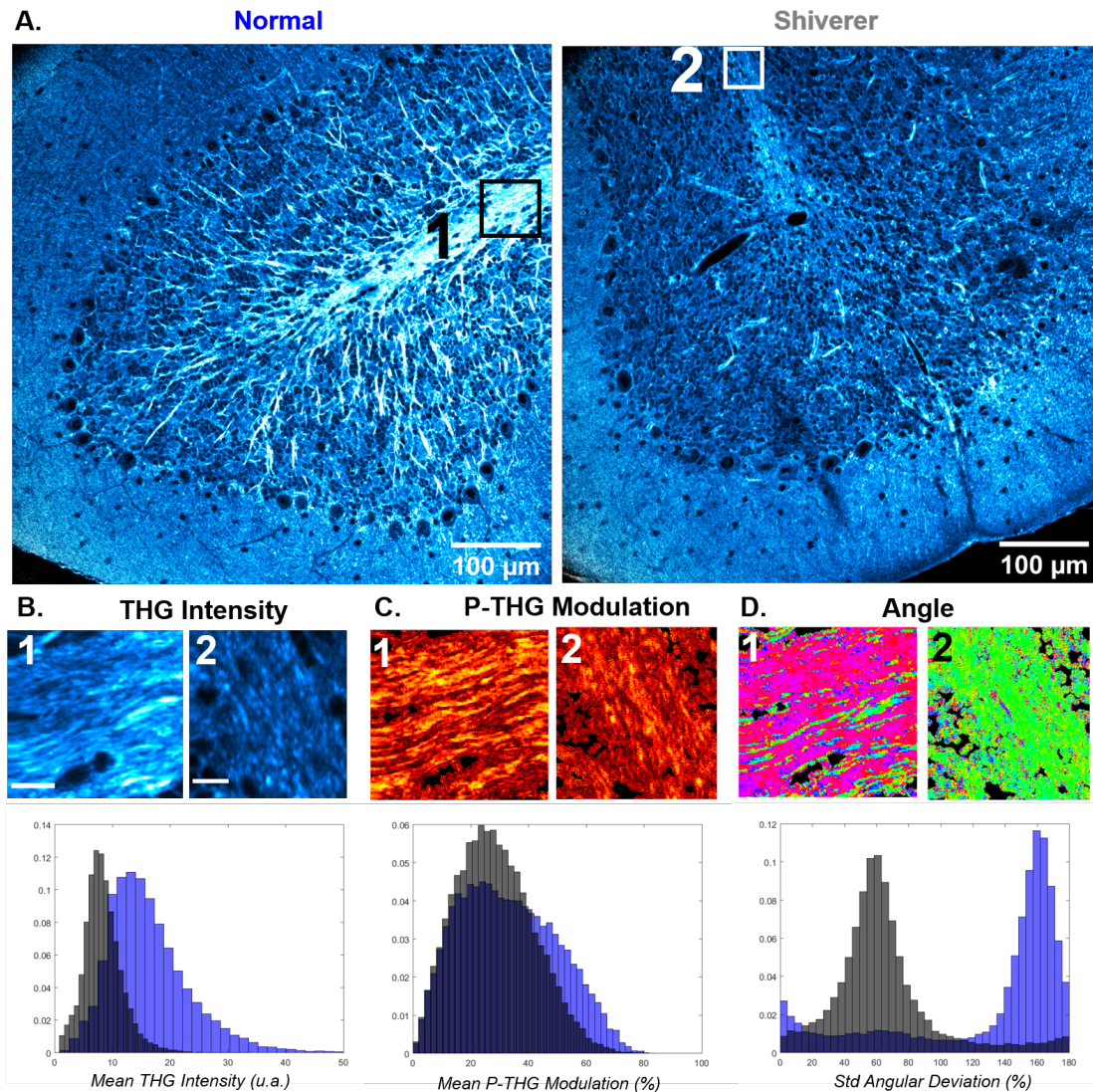


FIGURE 4.29 – Comparaison des contrastes THG/PTHG sur des tissus fixés de souris *sauvage* et mutante *shiverer*. a. Imagerie des contrastes THG sur un folium normal et shiverer. b. Imagerie PTHG de domaines dans la matière blanche des folia. Extraction des diagrammes en intensité. c. Cartes de modulation PTHG et diagrammes associés. d. Cartes angulaires et diagrammes associés.

souris *shiverer*, nous avons montré que les paramètres d'intensité THG et de modulation PTHG issus de ces contrastes se révèle capable de **détecter des changements pathologiques de la myéline**. Cette capacité de la microscopie THG à détecter des défauts (absence de myéline ou état hypomyélinisé) sur des tissus myélinisés non marqués offre un atout considérable par comparaison aux techniques de fluorescence qui requièrent l'utilisation de lignées mutantes et transgéniques - à la fois viables et stables - dont la construction peut se révéler longue et complexe, sans oublier la présence éventuelle d'autres mutations non désirées qui peuvent être à l'origine de modifications structurelles difficilement décelables.

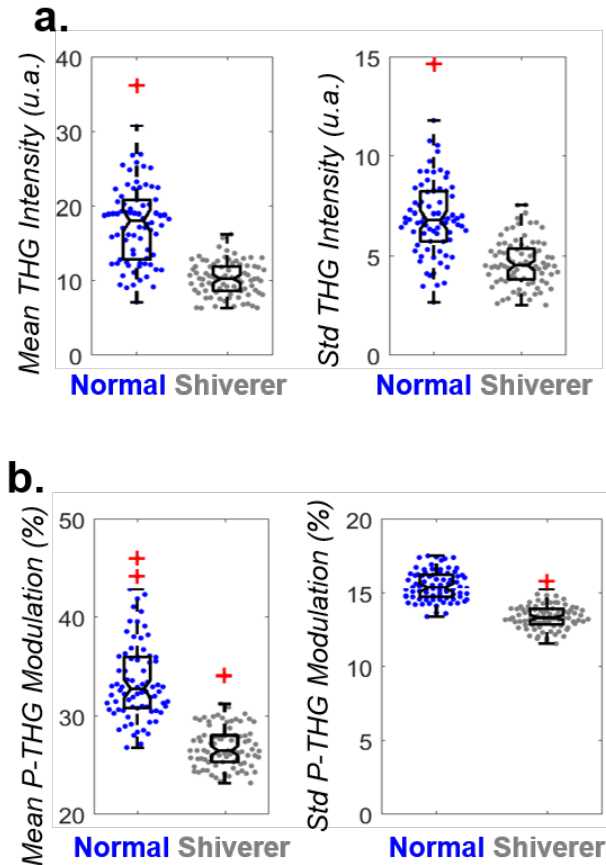


FIGURE 4.30 – Statistiques des distributions de (a, b) l’intensité THG moyenne, (c, d) de la modulation PTHG.

## 4.2.7 Conclusion

Dans cette partie, nous avons mis en évidence la **forte sensibilité du contraste THG qui émerge des structures myélinisées** sur des tranches organotypiques non marquées de cervelet de souris. Nous avons notamment rapporté la capacité à fournir des **informations structurales multi-échelles** sur les fibres myélinisées, sur la matière blanche à l’échelle de l’ensemble du tissu via une mosaïque à basse résolution, sur un folium par l’imagerie d’un champ et jusqu’aux fibres individuelles de la matière grise grâce à l’imagerie très résolue d’une petite région d’intérêt.

Nous avons également été capables de **visualiser la progression de la myélinisation le long de l’arborescence des axones des cellules de Purkinje** à partir d’acquisitions réalisées à différentes étapes du processus de myélinisation. Nous avons aussi montré la capacité à tracer en 3D les fibres myélinisées individuelles dans la perspective d’une étude quantitative sur la progression de la myélinisation (cf. figure 4.25).

Par ailleurs, nous avons montré que le contraste PTHG sur des axones myélinisés uniques présente une **forte dépendance avec l’orientation de la polarisation**.

Préalablement à une étude plus approfondie sur du matériel humain *postmortem*, nous avons sondé la capacité à détecter des changements pathologiques de la myéline sur un modèle animal de sclérose en plaques et sur un modèle d’hypomyélinisation. La combinaison des contrastes THG et PTHG ont révélé des changements pathologiques dans les deux cas.

### 4.2.8 Perspectives

Cette étude a confirmé l'intérêt de la microscopie THG pour l'étude des tissus myélinisés. Elle redéfinit également les contours du champ d'applications de la THG polarimétrique et fournit de nouvelles pistes à explorer que nous présentons ci-dessous.

#### a) Optimisation des conditions d'imagerie THG selon les propriétés des tissus myélinisés

Comme il a été décrit dans la littérature, l'intensité THG dépend de la dimension et de l'orientation des structures imagées. Dans ce contexte, Redlich et al. [96] ont cherché à optimiser le signal THG issu des structures myélinisées du cortex en choisissant une faible ouverture numérique. On peut intuitivement que le choix de l'ouverture numérique est en effet un facteur important à optimiser selon la dimension des fibres et de leur orientation des tissus imagés. De plus, comme il a été détaillé ici, une grande résolution dédouble le contraste THG observé sur les gaines myéline à partir d'une certaine épaisseur. On peut supposer qu'une diminution de l'ouverture numérique permettrait de rester dans un régime où la modulation issue des gaines de myéline sous-résolues augmente lorsque l'épaisseur de la myéline croît et ainsi caractériser plus précisément la formation de la myéline.

#### b) Imagerie multimodale des tissus myélinisés

L'imagerie THG présente l'avantage de pouvoir être combinée avec d'autres contrastes non-linéaires qui permettent d'accéder à des informations complémentaires sur les tissus. En particulier, la collection des signaux THG provenant de l'axone et de la gaine de myéline peut être complétée par d'autres contrastes intrinsèques des tissus, comme la SHG qui provient de la tubuline des axones, ou la fluorescence à deux photons issue de protéines endogènes. Par ailleurs, nous avons mené une étude préliminaire sur des tissus vivants où la combinaison THG-FLIM se révèle très intéressante pour accéder à des informations structurelles et métaboliques complémentaires (cf. figure 4.31) et devra faire l'objet d'investigations plus approfondies. De plus, le contraste THG peut également être combiné avec la fluorescence à deux photons sur des tissus fixés immunomarqués (comme avec un marquage de la *calbindine* pour les cellules de Purkinje, *Nav* pour les nœuds de Ranvier). Enfin, l'implémentation d'un système d'imagerie confocale sur le microscope actuel permettrait d'acquérir le contraste SCoRe et de bénéficier de la complémentarité de ces deux contrastes.

#### c) Imagerie THG de biopsies de tissus humains *post mortem*

Une troisième perspective de ce travail est de caractériser le contraste THG sur des biopsies de tissus humains *post mortem* non marquées réalisées sur des individus atteints de pathologies caractérisées par une neurodégénération comme la sclérose en plaques. Les contrastes THG et PTHG sont en effet apparus comme des techniques efficaces pour décrire les changements microstructuraux de la myéline inaccessibles par IRM. Un premier aspect du travail consistera à caractériser les contrastes THG et PTHG sur des lésions de la matière blanche périventriculaire, du cervelet, du cortex et du tronc cérébral à différents stades d'évolution de la maladie. Un second aspect sera d'évaluer la possibilité de détecter des changements qui affectent la myéline dans la matière blanche d'apparence normale.

#### d) Imagerie THG en profondeur de tissus myélinisés épais

Les fibres myélinisées sont des structures diffusantes sur lesquelles le signal THG s'atténue rapidement comme montré sur la figure 4.32. Sur la corne ventrale de la moelle épinière de souris présentée dans la partie 4.1, on trouve en effet une longueur d'atténuation d'environ



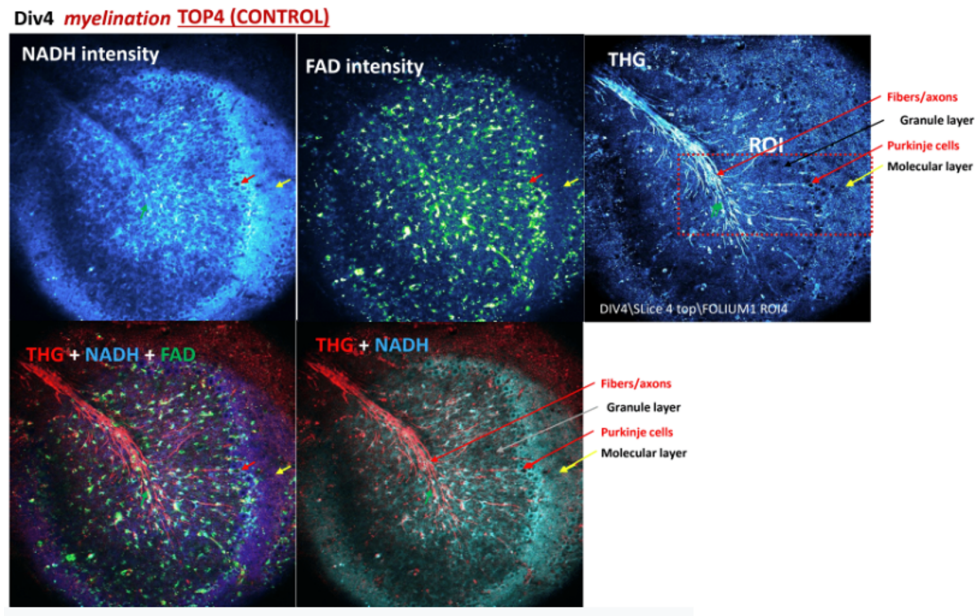


FIGURE 4.31 – Imageries FLIM et THG séquentielles sur un folium de cervelet de souris.

$20 \mu m$  dans la substance blanche, et d'environ  $50 \mu m$  dans la matière grise (pour la puissance d'excitation d'environ  $100 mW$ ). La longueur d'atténuation est limitée soit par la puissance de la source laser OPO (puissance moyenne  $< 150 mW$  sous l'objectif), soit par l'échauffement des tissus (au-delà d'une puissance moyenne de  $150 mW$  sous l'objectif). Pour espérer imager plus en profondeur des tissus épais, l'utilisation d'une **source OPA** (*OPA : optical parametric amplifier*) peut être envisagée.

La disponibilité récente des sources laser par amplificateur paramétrique optique a redéfini les profondeurs d'imagerie accessibles pour les processus à 3 photons (3PEF et THG). En augmentant la puissance-crête des impulsions générées par la source laser, les imageries THG/3PEF atteignent désormais des profondeurs de plus de  $1 mm$  à travers le cortex de souris en contraste 3PEF ([187], thèse en cours de Jùlia Ferrer-Ortas). Malgré des contraintes liées à une plus grande phototoxicité, les sources OPA sont prometteuses pour l'imagerie THG de tissus myélinisés épais.

#### e) Comparaison des contrastes THG-IRM

Une dernière perspective est de corréler les contrastes obtenus par imagerie par résonance magnétique (IRM) (résolution d'environ  $200 \mu m$ ) avec le contraste THG résolu à l'échelle de la fibre unique (résolution submicrométrique) pour enrichir l'interprétation des images par IRM sur les domaines myélinisés. Le développement du système ChromS grand volume à haute résolution [188] dans le laboratoire profitera potentiellement à fournir une imagerie THG 3D détaillée d'un organe entier de souris qui pourra ensuite être comparée aux images IRM. De plus, le contraste par imagerie THG polarimétrique pourra être comparé à celui fourni par l'IRM par diffusion (DWI) qui donne l'orientation et l'anisotropie des faisceaux de fibres myélinisées.

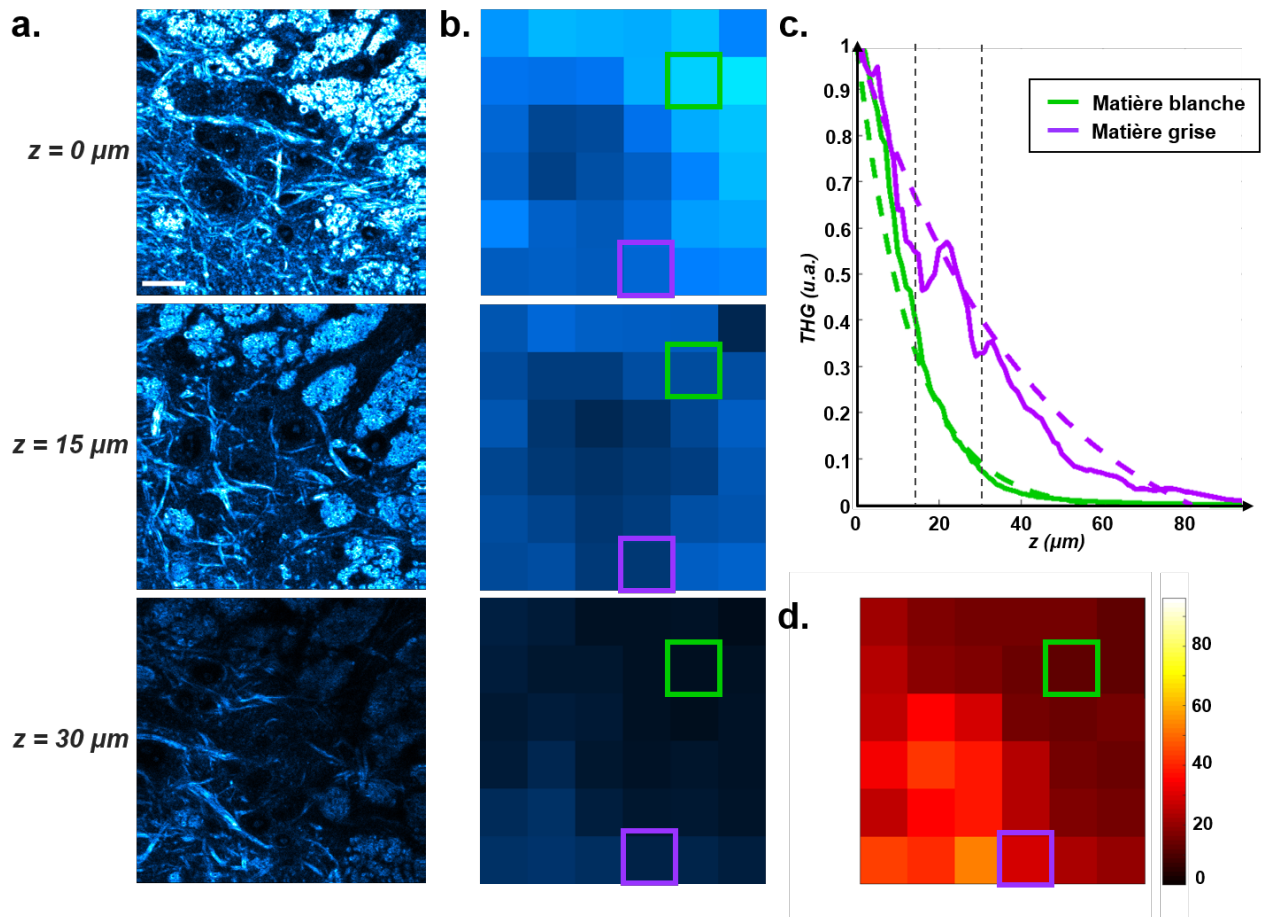


FIGURE 4.32 – Caractérisation de la longueur d’atténuation du signal THG sur un tissu de moelle épinière de souris *sauvage*. Imagerie THG d’un champ à proximité de la corne ventrale a. à  $z = 0 \mu m$  (resp. b. à  $z = 20 \mu m$ ) à forte résolution. Signaux moyennés dans le champ sur  $50 \mu m$  c. à  $z = 0 \mu m$  (resp. d.  $z = 20 \mu m$ ) de profondeur. e. Profil du profil THG sur les régions encadrées en orange dans la substance blanche et en vert dans la matière grise. f. Carte des longueurs d’atténuation dans le champs.

# Chapitre 5

## Conclusion

### 5.1 Conclusion du travail de thèse

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'imagerie multiphotonique par génération de troisième harmonique (THG) combinée à des mesures résolues en polarisation (PTHG) sur des systèmes biologiques pour accéder à des informations complémentaires sur la morphologie et la microstructure des structures anisotropes. Grâce à sa forte sensibilité aux discontinuités des propriétés optiques et à l'anisotropie des matériaux, la microscopie THG est en effet un outil de choix pour visualiser la gaine de myéline dans les tissus biologiques ainsi que certains biocristaux, le tout sans marquage et avec une résolution submicrométrique. Nous récapitulons ci-dessous nos contributions au domaine de l'imagerie THG des systèmes biologiques :

Dans le **chapitre II**, nous avons présenté un travail fondamental de **caractérisation analytique, numérique** (modèle FDTD) **et expérimentale de la réponse PTHG sur des structures modèles**.

Tout d'abord, nous avons proposé un formalisme qui permet d'unifier les descriptions rapportées dans la littérature pour décrire les signaux PTHG générés dans le volume et sur les interfaces de matériaux anisotropes. Nous nous sommes intéressés en particulier au couplage entre les propriétés d'anisotropie linéaires (indice  $n$ ) et non-linéaires (réponse THG  $\chi^{(3)}$ ) pour extraire les orientations des axes optiques principaux des matériaux à l'échelle du volume focal d'excitation.

Nous avons ensuite étudié la réponse PTHG issue d'interfaces parallèles à l'axe de propagation du faisceau. Nous avons mis en évidence expérimentalement et numériquement la présence d'aberrations induites par les différences d'indices linéaires à l'origine d'une réponse THG polarimétrique artefactuelle entre des matériaux isotropes. Puis nous avons réévalué la capacité à détecter l'ordre moléculaire à partir du signal PTHG issu d'interfaces verticales pour détecter l'ordre moléculaire et l'orientation cristalline. Ces récents développements profitent directement à la compréhension des signaux polarimétriques émergeant des axones myélinisés mais également à d'autres applications possibles comme une future caractérisation par THG de biominéraux tels que les calculs rénaux et les otolithes.

Dans le **chapitre III**, nous avons présenté un nouveau **système de microscopie PTHG rapide destiné à l'imagerie *in vivo* de structures biologiques**. Jusqu'ici restreint à l'imagerie d'échantillons immobiles ou faiblement dynamiques, le champ d'applications de la microscopie PTHG s'étend désormais à des échantillons dynamiques à une échelle temporelle inférieure à la seconde.



Ce système est basé sur la combinaison d'un système de commutation rapide de la polarisation (de l'ordre de la dizaine de microsecondes) avec un mode d'acquisition XPY où la polarisation est commutée entre les lignes pour atteindre une résolution temporelle sur les mesures polarimétriques de l'ordre de la dizaine de millisecondes à l'échelle du pixel. Nous avons optimisé ce système pour réaliser deux types d'acquisitions : (i) une imagerie PTHG qui repose sur le balayage de la polarisation d'excitation d'états linéaires situés le long de l'équateur de la sphère de Poincaré et (ii) une imagerie L-C-THG avec une polarisation d'excitation qui décrit des états linéaires et circulaires le long d'un méridien.

Nous avons ensuite illustré l'adéquation de notre système d'imagerie pour venir sonder les orientations moléculaire ou l'anisotropie dans le plan d'imagerie sur des échantillons qui se déforment ou qui sont en mouvement à une échelle temporelle inférieure à la seconde sans subir d'artefacts de mesures liés au mouvement. D'une part, en utilisant le mode P-THG, nous avons démontré sa capacité à mesurer la désorganisation de l'ordre moléculaire induite par une transition de phase sur des structures lipidiques soumises à un échauffement, puis à détecter la nature cristalline des microparticules précurseurs d'otolithe qui circulent rapidement dans l'oreille interne de l'embryon de poisson-zèbre. Pour ces acquisitions PTHG, nous avons développé une nouvelle méthode d'analyse des signaux PTHG par transformée de Fourier pour extraire rapidement des mesures à partir d'images PTHG. D'autre part, nous avons montré le potentiel de ce système d'imagerie utilisant le mode L-C-THG pour détecter *in situ* le caractère biréfringent d'échantillons biologiques. Nous avons caractérisé la sensibilité de notre système sur des échantillons modèles présentant des degrés divers d'anisotropie (gouttelettes d'huile, otolithe, MLVs), puis nous avons montré la capacité de notre système à détecter *in vivo* des vésicules biréfringentes dans les cellules intestinales du ver *c-elegans*. Nous avons développé ici un nouvel outil pour extraire des informations d'anisotropie avec une méthode ratiométrique à partir des images L-C-THG.

Dans le **chapitre IV**, nous avons présenté un **travail systématique de caractérisation des contrastes THG et PTHG émergeant des structures myélinisées, depuis le tissu jusqu'à la fibre individuelle**.

Dans un premier temps, nous avons confirmé que la gaine de myéline des axones est la source principale de signal THG dans les tissus myélinisés à partir de l'imagerie de tissus fixés du CNS de souris. Nous avons également montré que le contraste THG est sensible aux fibres myélinisées quelle que soit leur orientation par rapport au plan d'imagerie. En nous appuyant sur cette propriété, nous avons mis en évidence la capacité de l'imagerie THG à fournir une description structurelle multi-échelle du CNS de souris, depuis la fibre individuelle myélinisée jusqu'au tissu en distinguant la matière grise de la substance blanche.

Ensuite, nous avons caractérisé l'évolution des contrastes THG/PTHG sur des axones myélinisés présentant plusieurs états de myélinisation, à partir de l'imagerie *in vivo* d'axones myélinisés de la moelle épinière du poisson-zèbre au cours des stades précoces du développement (entre 2 et 5 jours). Nous avons rapporté une caractérisation de l'évolution du contraste THG polarimétrique sur des axones myélinisés du poisson-zèbre de différents calibres - de diamètre de plusieurs microns pour les axones Mauthner et de l'ordre du micron pour les axones dorsaux. Enfin, nous avons mené un travail combinant des aspects expérimentaux et numériques pour comprendre le mécanisme de contraste THG sur des fibres myélinisées individuelles. Pour cela, nous nous sommes intéressés aux contrastes THG et P-THG émergeants de structures cylindriques modèles qui reproduisent la géométrie des axones myélinisées avec des propriétés optiques simplifiées. Nous avons notamment montré l'influence des indices de réfraction, de l'épaisseur de la myéline et du rayon de courbure dans la réponse PTHG observée au niveau de

la gaine de myéline d'axones parallèles au plan d'imagerie.

Dans un second temps, nous avons réalisé une application d'imagerie THG sur des tissus vivants de cervelet de souris. Tout d'abord, nous avons mis en évidence la forte sensibilité du contraste THG qui émerge des structures myélinisées sur des tranches organotypiques non marquées de cervelet de souris. Nous avons notamment rapporté la capacité à fournir des informations structurales multi-échelles sur les fibres myélinisées, sur la matière blanche à l'échelle de l'ensemble du tissu via une mosaïque à basse résolution, sur un folium par l'imagerie d'un champ et jusqu'aux fibres individuelles de la matière grise grâce à l'imagerie très résolue d'une petite région d'intérêt. Ensuite, nous avons également été capables de visualiser la progression de la myélinisation le long de l'arborescence des axones des cellules de Purkinje à partir d'acquisitions réalisées à différentes étapes du processus de myélinisation. Nous avons montré la capacité à tracer en 3D les fibres myélinisées individuelles dans la perspective d'une étude quantitative sur la progression de la myélinisation. Enfin, nous avons démontré la capacité à détecter des changements pathologiques de la myéline sur un modèle animal de sclérose en plaques et sur un modèle d'hypomyélinisation. La combinaison des contrastes THG et PTHG ont révélé des changements pathologiques dans les deux cas.

En bref, la compréhension de la physique des signaux THG polarimétriques par le biais des expériences sur des systèmes modèles et des simulations numériques FDTD est apparue comme un élément essentiel pour interpréter les contrastes observés sur des tissus myélinisés. Ce travail ouvre la voie à de nombreux sujets d'étude que nous décrivons rapidement ci-dessous.

## 5.2 Travail futur

Une première série de perspectives sur lesquelles débouche cette étude concerne la **caractérisation de biomatériaux semi-cristallins** comme les otolithes grâce à leur réponse THG polarimétrique. En effet, les développements analytiques, numériques et expérimentaux présentés appuient la possibilité de détecter et caractériser les axes cristallins des matériaux anisotropes grâce à leur signature PTHG. L'ajout éventuel d'un système d'imagerie par réflectance confocale (sensible uniquement aux effets d'indices linéaires) sur le microscope THG et la réalisation de nouvelles simulations FDTD prenant en compte les effets tensoriels permettraient de découpler les effets d'indices linéaires et de susceptibilité non-linéaire  $\chi^{(3)}$  pour une caractérisation fine de leur nature optique et de leur orientation.

Une seconde série de perspectives concerne la **poursuite de l'étude sur les tissus myélinisés présentée dans ce manuscrit**. Un premier aspect est d'imager de grands volumes de tissus myélinisés, soit *ex vivo* avec l'approche d'imagerie 3D grand volume à haute résolution en coupes sériées (ChroMS [188]) développée récemment au laboratoire, soit avec une excitation de type OPA permettant l'imagerie 3 photons/THG du cerveau de souris à des profondeurs millimétriques, potentiellement *in vivo*. Un second aspect est de combiner l'imagerie THG avec d'autres imageries optiques (3PEF, FLIM, CARS, réflectance) pour accéder à des informations structurales et fonctionnelles complémentaires comme d'autres structures cellulaires marquées (cellules de Purkinje, nœuds de Ranvier), ou la fluorescence endogène de tissus vivants. Un troisième aspect consiste à évaluer la sensibilité des contrastes THG/PTHG sur des tissus pathologiques, comme au sein de lésions de la matière blanche et de la matière grise et de changements dans la matière blanche d'apparence normale, chez la souris atteinte d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) et sur des tissus humains *post-mortem*. Enfin, une dernière perspective serait d'effectuer une comparaison systématique des contrastes THG

et IRM pour relier le contraste par IRM avec une résolution millimétrique avec l'architecture des tissus à l'échelle cellulaire en s'appuyant sur le contraste THG. Ce dernier point pourrait notamment servir à améliorer l'interprétation des images IRM ou d'IRM par diffusion en terme de contenu myélinisé, en se basant sur les comparaisons IRM - PTHG.

# Annexe A

## Expression de la polarisation non-linéaire induite

Dans cette annexe, nous nous intéressons à la forme de la polarisation d'ordre 3 -  $\vec{P}(3\omega)$  - induite par des matériaux présentant soit une **symétrie hexagonale** de type  $C_{\infty v}$ , soit une **symétrie isotrope**.

### A.1 Matériau avec une symétrie hexagonale

- Expression générale de la polarisation d'ordre 3 induite :

Pour commencer, nous allons considérer un matériau avec une **symétrie**  $C_{\infty v}$ , aussi notée  $6mm$ , avec un axe principal selon  $x$ . D'après [73], le tenseur  $\chi^{(3)}$  se réduit à 21 composantes dont seulement 10 sont indépendantes. Ces éléments non-nuls sont décrits ci-dessous et, pour davantage de simplicité dans la lecture, nous remplaçons ici l'expression  $\chi_{ijkl}^{(3)}$  par  $ijkl$  :

$$\left\{ \begin{array}{l} xxxx \\ yyyy = zzzz = yyzz + yzzy + yzyz \\ yyzz = zzyy \\ yzzy = zyyz \\ yzyz = zyzzy \\ zzzx = yyxx \\ xxzz = xxyy \\ xzzx = xyyx \\ zxxz = yxxy \\ zxxz = yxxy \\ xzzz = xyxy \end{array} \right. \quad (\text{A.1})$$

En faisant l'hypothèse de symétrie de Kleinman (absence de résonances), on trouve l'égalité des termes de même couleur dans l'équation précédente. Le tenseur  $\chi^{(3)}$  se réduit ainsi à 3

composantes indépendantes parmi les 21 éléments non-nuls, que l'on réécrit ainsi :

$$\begin{cases} \chi_{xxxx}^{(3)} = \chi_{\parallel}^{(3)} \\ \frac{1}{3}\chi_{yyyy}^{(3)} = \frac{1}{3}\chi_{zzzz}^{(3)} = \chi_{yyzz}^{(3)} = \chi_{yzzz}^{(3)} = \chi_{yzyz}^{(3)} = \chi_{zzyy}^{(3)} = \chi_{zyyz}^{(3)} = \chi_{zyzy}^{(3)} = \frac{1}{3}\chi_{\perp}^{(3)} \\ \chi_{xxyy}^{(3)} = \chi_{xyyx}^{(3)} = \chi_{xyxy}^{(3)} = \chi_{xxzz}^{(3)} = \chi_{xzxx}^{(3)} = \chi_{xzzx}^{(3)} \\ = \chi_{yyxx}^{(3)} = \chi_{yxyx}^{(3)} = \chi_{yxyx}^{(3)} = \chi_{zzxx}^{(3)} = \chi_{zxxz}^{(3)} = \chi_{zxxz}^{(3)} = \frac{1}{3}\chi_{cr}^{(3)} \end{cases} \quad (\text{A.2})$$

Comme les composantes de la polarisation induite d'ordre 3 -  $\vec{P}(3\omega)$  - se déduisent de l'expression :

$$P_i(3\omega) = \epsilon_0 \sum_{j,k,l} \chi_{ijkl}^{(3)} E_j(\omega) E_k(\omega) E_l(\omega) \quad (\text{A.3})$$

On en déduit :

$$\vec{P}(3\omega) = \epsilon_0 \begin{pmatrix} \chi_{xxxx}^{(3)} E_x^3 + (\chi_{xxyy}^{(3)} + \chi_{xyyx}^{(3)} + \chi_{xyxy}^{(3)}) E_x E_y^2 + (\chi_{xxzz}^{(3)} + \chi_{xzxx}^{(3)} + \chi_{xzzx}^{(3)}) E_x E_z^2 \\ (\chi_{yyxx}^{(3)} + \chi_{yxyx}^{(3)} + \chi_{yxyx}^{(3)}) E_x E_y + \chi_{yyyy}^{(3)} E_y^3 + (\chi_{yyzz}^{(3)} + \chi_{yzzz}^{(3)} + \chi_{yzyz}^{(3)}) E_y E_z^2 \\ (\chi_{zzxx}^{(3)} + \chi_{zxxz}^{(3)} + \chi_{zxxz}^{(3)}) E_x E_z + (\chi_{zzyy}^{(3)} + \chi_{zyyz}^{(3)} + \chi_{zyzy}^{(3)}) E_y E_z + \chi_{zzzz}^{(3)} E_z^3 \end{pmatrix} \quad (\text{A.4})$$

ou encore sous une forme simplifiée :

$$\vec{P}(3\omega) = \epsilon_0 \begin{pmatrix} E_x \left( \chi_{\parallel}^{(3)} E_x^2 + \chi_{cr}^{(3)} E_y^2 + \chi_{cr}^{(3)} E_z^2 \right) \\ E_y \left( \chi_{cr}^{(3)} E_x^2 + \chi_{\perp}^{(3)} E_y^2 + \chi_{\perp}^{(3)} E_z^2 \right) \\ E_z \left( \chi_{cr}^{(3)} E_x^2 + \chi_{\perp}^{(3)} E_y^2 + \chi_{\perp}^{(3)} E_z^2 \right) \end{pmatrix} \quad (\text{A.5})$$

### - Polarisation d'excitation linéaire :

On s'intéresse à l'expression de la polarisation induite d'ordre 3 en fonction de l'état de la polarisation d'excitation. Pour une **polarisation d'excitation linéaire** orientée dans le plan  $(xy)$  et qui forme un angle  $\phi$  avec l'axe  $x$ , le champ électrique se décompose au premier ordre sur les axes  $x$  (axe extraordinaire) et  $y$  (axe ordinaire) selon :

$$\vec{E}_1(\vec{r}, \omega) = \begin{pmatrix} E_x(\vec{r}, \omega) \\ E_y(\vec{r}, \omega) \\ 0 \end{pmatrix} = A_1(\vec{r}) \begin{pmatrix} \cos(\phi) e^{ik_e z} \\ \sin(\phi) e^{ik_0 z} \\ 0 \end{pmatrix} \quad (\text{A.6})$$

où  $A_1(\vec{r}) \in \mathbb{R}$  On en déduit l'expression de la polarisation induite d'ordre 3 :

$$\vec{P}(\vec{r}, 3\omega) = \epsilon_0 A_1^3(\vec{r}) \begin{pmatrix} \chi_{\parallel}^{(3)} \cos^3(\phi) e^{3ik_e z} + \chi_{cr}^{(3)} \cos(\phi) \sin^2(\phi) e^{i(2k_0+k_e)z} \\ \chi_{cr}^{(3)} \cos^2(\phi) \sin(\phi) e^{i(2k_e+k_0)z} + \chi_{\perp}^{(3)} \sin^3(\phi) e^{3ik_0 z} \\ 0 \end{pmatrix} \quad (\text{A.7})$$

### - Polarisation d'excitation circulaire :

Pour une **polarisation d'excitation circulaire**, le champ électrique se décompose au premier ordre sur les axes  $x$  et  $y$  selon :

$$\vec{E}_1(\vec{r}, \omega) = \begin{pmatrix} E_x(\vec{r}, \omega) \\ E_y(\vec{r}, \omega) \\ 0 \end{pmatrix} = \frac{A_1(\vec{r})}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} e^{ik_e z} \\ ie^{ik_0 z} \\ 0 \end{pmatrix} \quad (\text{A.8})$$

et la polarisation induite d'ordre 3 s'exprime :

$$\vec{P}(\vec{r}, 3\omega) = \epsilon_0 \frac{A_1^3(\vec{r})}{2\sqrt{2}} \begin{pmatrix} \chi_{\parallel}^{(3)} e^{3ik_e z} - \chi_{cr}^{(3)} e^{i(2k_o+k_e)z} \\ i \left( \chi_{cr}^{(3)} e^{i(2k_e+k_o)z} - \chi_{\perp}^{(3)} e^{3ik_o z} \right) \\ 0 \end{pmatrix} \quad (\text{A.9})$$

## A.2 Matériau isotrope

### - Expression générale de la polarisation d'ordre 3 induite

Dans le cas d'un milieu homogène **isotrope**, le tenseur de susceptibilité  $\chi^{(3)}$  se réduit à 21 composantes dont seulement 3 sont indépendantes :

$$\begin{cases} xxxx = yyyy = zzzz = yyzz + yzzy + yzyz \\ zzzx = xxzz = xxyy = yyxx = yyzz = zzyy \\ zxxz = xzxx = xyxy = yxyx = yzyz = zyzzy \\ zxxz = xzxx = xyxy = yxyx = yzzy = zyyz \end{cases} \quad (\text{A.10})$$

Avec l'hypothèse de symétrie de Kleinman, les termes en couleur de l'équation précédente sont égaux. Par conséquent, le tenseur se réduit à 1 composante indépendante :

$$\chi_{ijkl}^{(3)} = \chi_0^{(3)} (\delta_{ij}\delta_{kl} + \delta_{ik}\delta_{jl} + \delta_{il}\delta_{jk}) \quad (\text{A.11})$$

et l'expression de la polarisation induite du troisième ordre se trouve simplifiée telle que :

$$\vec{P}(3\omega) = 3\chi_0^{(3)} \begin{pmatrix} E_x(E_x^2 + E_y^2 + E_z^2) \\ E_y(E_x^2 + E_y^2 + E_z^2) \\ E_z(E_x^2 + E_y^2 + E_z^2) \end{pmatrix} \quad (\text{A.12})$$

### - Polarisation d'excitation linéaire :

Dans la cas particulier d'une **polarisation d'excitation linéaire**, la polarisation induite d'ordre 3 se réécrit :

$$\vec{P}(\vec{r}, 3\omega) = \epsilon_0 A_1^3(\vec{r}) \chi_0^{(3)} \begin{pmatrix} \cos(\phi)(\cos^2(\phi) + \sin^2(\phi)) \\ \sin(\phi)(\cos^2(\phi) + \sin^2(\phi)) \\ 0 \end{pmatrix} e^{3ik_{\omega} z} \quad (\text{A.13})$$

soit :

$$\vec{P}(\vec{r}, 3\omega) = \epsilon_0 A_1^3(\vec{r}) \chi_0^{(3)} \begin{pmatrix} \cos(\phi) \\ \sin(\phi) \\ 0 \end{pmatrix} e^{3ik_{\omega} z} \quad (\text{A.14})$$



- **Polarisation d'excitation circulaire :**

Pour une **polarisation d'excitation circulaire**, la polarisation induite d'ordre 3 est nulle :

$$\vec{P}(\vec{r}, 3\omega) = \epsilon_0 \frac{A_1^3(\vec{r})}{2\sqrt{2}} \chi_0^{(3)} \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} e^{3ik_\omega z} = \vec{0} \quad (\text{A.15})$$

# Annexe B

## Solution THG de l'équation d'onde

### B.1 Equation d'onde

A partir des équations de Maxwell :

$$\left\{ \begin{array}{l} \vec{\nabla} \cdot \vec{D}(\vec{r}, t) = \vec{\rho}(\vec{r}, t) \\ \vec{\nabla} \cdot \vec{B}(\vec{r}, t) = 0 \\ \vec{\nabla} \times \vec{E}(\vec{r}, t) = -\frac{\partial \vec{B}(\vec{r}, t)}{\partial t} \\ \vec{\nabla} \times \vec{H}(\vec{r}, t) = \frac{\partial \vec{D}(\vec{r}, t)}{\partial t} + \vec{j}(\vec{r}, t) \end{array} \right. \quad (\text{B.1})$$

Pour un **milieu non-magnétique**,

$$\vec{H}(\vec{r}, t) = \frac{1}{\mu_0} \vec{B}(\vec{r}, t) \quad (\text{B.2})$$

**non-linéaire**,

$$\vec{D}(\vec{r}, t) = \epsilon_0 \vec{E}(\vec{r}, t) + \vec{P}(\vec{r}, t) \quad (\text{B.3})$$

et **sans courant libre**,  $\vec{j}(\vec{r}, t) = \vec{0}$ , on en déduit :

$$\vec{\nabla} \times \vec{E}(\vec{r}, t) = -\mu_0 \frac{\partial \vec{H}(\vec{r}, t)}{\partial t} \quad (\text{B.4})$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{H}(\vec{r}, t) = \epsilon_0 \frac{\partial \vec{E}(\vec{r}, t)}{\partial t} + \frac{\partial \vec{P}(\vec{r}, t)}{\partial t} \quad (\text{B.5})$$

et on retrouve l'équation d'onde :

$$\vec{\nabla} \times \vec{\nabla} \times \vec{E}(\vec{r}, t) = -\mu_0 \vec{\nabla} \times \left( \frac{\partial \vec{H}(\vec{r}, t)}{\partial t} \right) = -\mu_0 \frac{\partial \left( \vec{\nabla} \times \vec{H}(\vec{r}, t) \right)}{\partial t} = -\frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{E}(\vec{r}, t)}{\partial t^2} - \frac{1}{\epsilon_0 c^2} \frac{\partial^2 \vec{P}(\vec{r}, t)}{\partial t^2} \quad (\text{B.6})$$

Le premier terme de l'équation précédente peut être remplacé par :  $\vec{\nabla} \times \vec{\nabla} \times \vec{E} = \vec{\nabla} \left( \vec{\nabla} \cdot \vec{E} \right) - \vec{\nabla}^2 \vec{E}$ . Comme  $\vec{\nabla} \cdot \vec{D}(\vec{r}, t) = 0$  dans un **milieu isotrope sans source**, on a  $\vec{\nabla} \cdot \vec{E}(\vec{r}, t) = 0$ . L'équation d'onde s'écrit :

$$\vec{\nabla}^2 \vec{E}(\vec{r}, t) - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{E}(\vec{r}, t)}{\partial t^2} = \frac{1}{\epsilon_0 c^2} \frac{\partial^2 \vec{P}(\vec{r}, t)}{\partial t^2} \quad (\text{B.7})$$

Le terme de polarisation peut être décomposé en un terme linéaire et un terme non-linéaire :  $\vec{P}(\vec{r}, t) = \vec{P}^{(1)}(\vec{r}, t) + \vec{P}^{NL}(\vec{r}, t)$  où  $\vec{P}^{(1)}(\vec{r}, t) = \epsilon_0 \chi^{(1)} \vec{E}(\vec{r}, t)$ . On en déduit :

$$\vec{\nabla}^2 \vec{E}(\vec{r}, t) - \frac{(1 + \chi^{(1)})}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{E}(\vec{r}, t)}{\partial t^2} = \frac{1}{\epsilon_0 c^2} \frac{\partial^2 \vec{P}^{NL}(\vec{r}, t)}{\partial t^2} \quad (\text{B.8})$$

En posant  $\epsilon^{(1)} = 1 + \chi^{(1)}$ , l'équation d'onde se réécrit :

$$\vec{\nabla}^2 \vec{E}(\vec{r}, t) - \frac{\epsilon^{(1)}}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{E}(\vec{r}, t)}{\partial t^2} = \frac{1}{\epsilon_0 c^2} \frac{\partial^2 \vec{P}^{NL}(\vec{r}, t)}{\partial t^2} \quad (\text{B.9})$$

## B.2 Equation d'onde non-linéaire

Pour un milieu dispersif, les champs électrique  $\vec{E}$ , de déplacement linéaire  $\vec{D}$  et de polarisation  $\vec{P}^{NL}$  peuvent être décrits comme une somme des différentes composantes fréquentielles :

$$\begin{cases} \vec{E}(\vec{r}, t) = \sum_n \vec{E}_n(\vec{r}, t) \\ \vec{D}(\vec{r}, t) = \sum_n \vec{D}_n(\vec{r}, t) \\ \vec{P}^{NL}(\vec{r}, t) = \sum_n \vec{P}_n(\vec{r}, t) \end{cases} \quad (\text{B.10})$$

En introduisant les équations précédentes dans l'équation d'onde, on obtient une équation d'onde valable pour chaque fréquence :

$$\vec{\nabla}^2 \vec{E}_n(\vec{r}, t) - \frac{\epsilon^{(1)}(\omega_n)}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{E}_n(\vec{r}, t)}{\partial t^2} = \frac{1}{\epsilon_0 c^2} \frac{\partial^2 \vec{P}_n(\vec{r}, t)}{\partial t^2} \quad (\text{B.11})$$

## B.3 Equation d'onde d'ordre 3 dans l'approximation paraxiale

On s'intéresse ici à résoudre l'équation d'onde à la fréquence  $3\omega$  :

$$\vec{\nabla}^2 \vec{E}_3(\vec{r}, t) - \frac{\epsilon^{(1)}(\omega_3)}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{E}_3(\vec{r}, t)}{\partial t^2} = \frac{1}{\epsilon_0 c^2} \frac{\partial^2 \vec{P}_3(\vec{r}, t)}{\partial t^2} \quad (\text{B.12})$$

pour un **champ monochromatique** à la fréquence  $3\omega$

$$\begin{cases} \vec{\tilde{E}}_3(\vec{r}, t) = \vec{E}_3(\vec{r})e^{-i\omega_3 t} + c.c. \\ \vec{\tilde{P}}_3(\vec{r}, t) = \vec{P}_3(\vec{r})e^{-i\omega_3 t} + c.c. \end{cases} \quad (\text{B.13})$$

et dans l'**approximation paraxiale** (direction de propagation du faisceau proche de l'axe optique du système, défini selon l'axe  $z$ ) :

$$\begin{cases} \vec{E}_3(\vec{r}) = \vec{A}_3(\vec{r})e^{ik_3 z} \\ \vec{P}_3(\vec{r}) = \vec{p}_3(\vec{r})e^{ik_3 z} \end{cases} \quad (\text{B.14})$$

On note que les amplitudes complexes  $\vec{A}_3$  et  $\vec{p}_3$  varient en fonction de  $r$ , ce qui signifie que les champs  $\vec{\tilde{E}}_3$  et  $\vec{\tilde{P}}_3$  ne représentent pas nécessairement des ondes planes.

De plus, la polarisation induite d'ordre 3 s'écrit :

$$\vec{p}_3(\vec{r}) = \epsilon_0 \chi^{(3)} \vec{A}_1^3(\vec{r}) \quad (\text{B.15})$$

avec :

$$\vec{E}_1(\vec{r}) = \vec{A}_1(\vec{r})e^{ik_1 z} \quad (\text{B.16})$$

Comme le champ  $\vec{\tilde{E}}_3(\vec{r}, t)$  se propage principalement suivant la direction  $z$ , il est ici judicieux d'utiliser l'expression du laplacien :  $\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial z^2} + \nabla_T^2$ . L'équation d'onde se calcule comme suit :

$$\left[ \left( \frac{\partial^2 \vec{A}_3}{\partial z^2}(\vec{r}) + 2ik_3 \frac{\partial \vec{A}_3}{\partial z}(\vec{r}) - k_3^2 \vec{A}_3(\vec{r}) \right) + \nabla_T^2 \vec{A}_3(\vec{r}) + \frac{n_3^2 \omega_3^2}{c^2} \vec{A}_3(\vec{r}) \right] e^{ik_3 z} = -\frac{\omega_3^2}{c^2} \chi^{(3)} \vec{A}_1^3(\vec{r}) e^{3ik_1 z} \quad (\text{B.17})$$

D'après l'**approximation de l'onde lentement variable** (hypothèse selon laquelle l'enveloppe du faisceau varie lentement dans le temps et l'espace par rapport à la longueur d'onde) :

$$\left| \frac{\partial^2 A_3}{\partial z^2}(\vec{r}) \right| \ll \left| k_3 \frac{\partial A_3}{\partial z}(\vec{r}) \right| \quad (\text{B.18})$$

L'équation d'onde paraxiale se simplifie donc :

$$2ik_3 \frac{\partial A_3}{\partial z}(\vec{r}) + \nabla_T^2 A_3(\vec{r}) = -\frac{\omega_3^2}{c^2} \chi^{(3)} A_1^3(\vec{r}) e^{i\Delta k z} \quad (\text{B.19})$$

où  $\Delta k = 3k_1 - k_3$  soit :

$$\frac{\partial A_3}{\partial z}(\vec{r}) = \frac{i\omega_3}{2n_3 c \epsilon_0} \vec{P}_3(\vec{r}) e^{-ik_3 z} \quad (\text{B.20})$$

## B.4 Résolution de l'équation d'onde pour des faisceaux gaussiens

Cette équation d'onde paraxiale est résolue dans le cas d'un faisceau d'excitation dont la distribution d'intensité transverse est gaussienne.

### a) Faisceaux gaussiens

On fait l'hypothèse que pour un champ d'excitation gaussien, le champ harmonique est également gaussien et que son waist et son paramètre confocal dépendent du waist et du paramètre confocal du faisceau d'excitation par les relations  $w_{0,3}^2 = w_0^2/3$  et  $b_3 = k_3 w_{0,3}^2/2$ , de sorte que le champ d'excitation et le champ harmonique sont décrits par les équations :

$$\begin{cases} A_1(\vec{r}) = \frac{\mathcal{A}_1(z)}{1+i\zeta} e^{-r^2/w_0^2(1+i\zeta)} \\ A_3(\vec{r}) = \frac{\mathcal{A}_3(z)}{1+i\zeta} e^{-3r^2/w_0^2(1+i\zeta)} \end{cases} \quad (\text{B.21})$$

### b) Milieu isotrope

L'équation d'onde paraxiale pour un processus de génération de troisième harmonique se réécrit :

$$\frac{d\mathcal{A}_3}{dz} = \frac{3i\omega}{2n_3c} \chi^{(3)} \mathcal{A}_1^3 \frac{e^{i\Delta kz}}{(1+i\zeta)^2} \quad (\text{B.22})$$

L'amplitude du champ harmonique du troisième ordre se déduit en intégrant la relation précédente entre  $z_0$  et  $z$  qui sont les coordonnées axiales des plans d'entrée et de sortie du milieu :

$$\mathcal{A}_3(z) = \frac{3i\omega}{2n_3c} \chi^{(3)} \mathcal{A}_1^3 J_3(\Delta k, z_0, z) \quad (\text{B.23})$$

où l'intégrale  $J_3$  s'écrit :

$$J_3(\Delta k, z_0, z) = \int_{z_0}^z \frac{e^{i\Delta kz'}}{(1+2iz'/b)^2} dz' \quad (\text{B.24})$$

Dans le cas d'un milieu homogène infini ( $z_0 = -\infty$  et  $z = +\infty$ ), l'intégrale  $J_3$  se calcule analytiquement :

$$J(\Delta k, z_0, z) = \begin{cases} 0 & \text{si } \Delta k \leq 0 \\ \frac{\pi b^2 \Delta k}{2} e^{-b\Delta k/2} & \text{si } \Delta k > 0 \end{cases} \quad (\text{B.25})$$

On en déduit une expression de l'intensité THG, sachant que  $I(3\omega) = 2n_3\epsilon_0c |A(3\omega)|^2$  :

$$I(3\omega) = \begin{cases} 0 & \text{si } \Delta k \leq 0 \\ 2n_3\epsilon_0c \left| \frac{3i\omega}{2n_3c} \chi^{(3)} \mathcal{A}_1^3 \left( \frac{\pi b^2 \Delta k}{2} e^{-b\Delta k/2} \right) \right|^2 & \text{si } \Delta k > 0 \end{cases} \quad (\text{B.26})$$

$$I(3\omega) = \begin{cases} 0 & \text{si } \Delta k \leq 0 \\ \frac{9\omega^2\epsilon_0\pi^2b^4\Delta k^2}{8n_3c} |\chi^{(3)}|^2 \mathcal{A}_1^6 e^{-b\Delta k} & \text{si } \Delta k > 0 \end{cases} \quad (\text{B.27})$$

### c) Réponse d'un milieu anisotrope

#### - Polarisation d'excitation linéaire

On s'intéresse à la résolution de l'équation d'onde pour un matériau non-linéaire **anisotrope uniaxe avec une symétrie**  $C_{\infty v}$ . Nous calculons ici l'expression analytique de l'intensité THG

en combinant l'aspect tensoriel et d'accord de phase.

Nous avons vu dans l'annexe A que la polarisation induite d'ordre 3 s'écrit :

$$\vec{P}_3(\vec{r}) = \epsilon_0 A_1^3(\vec{r}) \begin{pmatrix} \chi_{\parallel}^{(3)} \cos^3(\phi) e^{3ik_e z} + \chi_{cr}^{(3)} \cos(\phi) \sin^2(\phi) e^{i(2k_o+k_e)z} \\ \chi_{cr}^{(3)} \cos^2(\phi) \sin(\phi) e^{i(2k_e+k_o)z} + \chi_{\perp}^{(3)} \sin^3(\phi) e^{3ik_o z} \\ 0 \end{pmatrix} \quad (\text{B.28})$$

On réinjecte cette expression dans l'équation d'onde paraxiale d'ordre 3 :

$$\frac{\partial A_3}{\partial z}(\vec{r}) = \frac{i\omega_3}{2n_3 c \epsilon_0} \vec{P}_3(\vec{r}) e^{-ik_3 z} \quad (\text{B.29})$$

Et on trouve :

$$\begin{cases} \frac{dA_{3,x}}{dz} = \frac{3i\omega}{2n_{3e}c} \left[ \chi_{\parallel}^{(3)} \cos^3(\phi) e^{i(3k_{1e}-k_{3e})z} + \chi_{cr}^{(3)} \cos(\phi) \sin^2(\phi) e^{i(2k_{1o}+k_{1e}-k_{3e})z} \right] \frac{\mathcal{A}_1^3}{(1+i\zeta)^2} \\ \frac{dA_{3,y}}{dz} = \frac{3i\omega}{2n_{3o}c} \left[ \chi_{cr}^{(3)} \cos^2(\phi) \sin(\phi) e^{i(2k_{1e}+k_{1o}-k_{3o})z} + \chi_{\perp}^{(3)} \sin^3(\phi) e^{i(3k_{1o}-k_{3o})z} \right] \frac{\mathcal{A}_1^3}{(1+i\zeta)^2} \\ \frac{dA_{3,z}}{dz} = 0 \end{cases} \quad (\text{B.30})$$

$$\begin{cases} \mathcal{A}_{3,x} = \frac{3i\omega}{2n_{3e}c} \left[ \chi_{\parallel}^{(3)} \cos^3(\phi) J(\Delta k_{eeee}, z_1, z_2) + \chi_{cr}^{(3)} \cos(\phi) \sin^2(\phi) J(\Delta k_{eooo}, z_1, z_2) \right] \mathcal{A}_1^3 \\ \mathcal{A}_{3,y} = \frac{3i\omega}{2n_{3o}c} \left[ \chi_{cr}^{(3)} \cos^2(\phi) \sin(\phi) J(\Delta k_{oeeo}, z_1, z_2) + \chi_{\perp}^{(3)} \sin^3(\phi) J(\Delta k_{oooo}, z_1, z_2) \right] \mathcal{A}_1^3 \\ \mathcal{A}_{3,z} = 0 \end{cases} \quad (\text{B.31})$$

On peut noter que les coefficients donnés par l'intégrale  $J$  viennent pondérer chaque terme. On remarquera que les termes croisés sont pondérés par des coefficients différents.

Dans le cas d'un **milieu uniaxe à biréfringence positive** ( $\Delta n = n_e - n_o > 0$ ) et à dispersion normale ( $n_\omega < n_{3\omega}$ ) :

- l'accord de phase de type I  $eee \rightarrow e$  et  $ooo \rightarrow o$  est associé à des vecteurs d'onde  $\Delta k_{eeee}$  et  $\Delta k_{oooo}$  négatifs qui ne permettent pas de compenser la phase de Gouy, ainsi  $J(\Delta k_{eeee}, -\infty, +\infty) = J(\Delta k_{oooo}, -\infty, +\infty) = 0$

- l'accord de phase de type II  $eee \rightarrow e$  est associé à un vecteur d'onde  $\Delta k_{eooo}$  négatif qui ne permet pas de compenser la phase de Gouy, ainsi  $J(\Delta k_{eooo}, -\infty, +\infty) = 0$

Par exemple, le tenseur associé aux cristaux présentant une symétrie hexagonale est dépourvu du terme diagonal  $\chi_{fsss}^{(3)}$ . La génération d'un signal avec l'accord de phase de type I ( $sss \rightarrow f$ ) est donc impossible.

On trouve donc que le champ non-linéaire d'ordre 3 se réduit à une seule composante :

$$\mathcal{A}_3(\phi) = \begin{pmatrix} 0 \\ \frac{3i\omega}{2n_{3o}c} \chi_{cr}^{(3)} \cos^2(\phi) \sin(\phi) J(\Delta k_{oeeo}, -\infty, +\infty) \mathcal{A}_1^3 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (\text{B.32})$$

Le champ non-linéaire d'ordre 3 généré est polarisé selon  $y$  à partir d'un champ avec une polarisation orientée à un angle  $\phi$  de l'axe  $x$ .

$$I_y(3\omega, \phi) = \frac{9\epsilon_0 \omega^2 \pi^2 b^4 \Delta k^2}{8n_{3\omega}c} \left| \chi_{cr}^{(3)} \right|^2 \cos^4(\phi) \sin^2(\phi) |\mathcal{A}_1|^6 e^{-b\Delta k} \quad (\text{B.33})$$

Dans le cas d'un **milieu uniaxe à biréfringence négative** ( $\Delta n = n_e - n_o < 0$ ) et à dispersion



normale ( $n_\omega < n_{3\omega}$ ),  $J(\Delta k_{eeee}, -\infty, +\infty) = J(\Delta k_{oooo}, -\infty, +\infty) = J(\Delta k_{oeeo}, -\infty, +\infty) = 0$ .  
On trouve donc :

$$\mathcal{A}_3(\phi) = \begin{pmatrix} \frac{3i\omega}{2n_{3\omega}c} \chi_{cr}^{(3)} \cos(\phi) \sin^2(\phi) J(\Delta k_{eooe}, -\infty, +\infty) \mathcal{A}_1^3 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (\text{B.34})$$

Le champ non-linéaire d'ordre 3 généré est polarisé selon  $x$  à partir d'un champ avec une polarisation orientée à un angle  $\phi$  de l'axe  $x$

$$I_x(3\omega, \phi) = \frac{9\epsilon_0\omega^2\pi^2b^4\Delta k^2}{8n_{3\omega}c} \left| \chi_{cr}^{(3)} \right|^2 \cos^2(\phi) \sin^4(\phi) |\mathcal{A}_1|^6 e^{-b\Delta k} \quad (\text{B.35})$$

### - Polarisation d'excitation circulaire

Nous avons vu dans l'annexe A que la polarisation induite d'ordre 3 par un faisceau d'excitation avec une polarisation circulaire s'écrit :

$$\vec{P}_3(\vec{r}) = \epsilon_0 \frac{\mathcal{A}_1^3(\vec{r})}{2\sqrt{2}} \begin{pmatrix} \chi_{\parallel}^{(3)} e^{3ik_e z} - \chi_{cr}^{(3)} e^{i(2k_o+k_e)z} \\ i \left( \chi_{cr}^{(3)} e^{i(2k_e+k_o)z} - \chi_{\perp}^{(3)}(\phi) e^{3ik_o z} \right) \\ 0 \end{pmatrix} \quad (\text{B.36})$$

En réinjecte cette expression dans l'équation d'onde paraxiale d'ordre 3, on trouve :

$$\begin{cases} \frac{d\mathcal{A}_{3,x}}{dz} = \frac{3i\omega}{2n_{3\omega}c} \left[ \chi_{\parallel}^{(3)} e^{i(3k_{1e}-k_{3e})z} - \chi_{cr}^{(3)} e^{i(2k_{1o}+k_{1e}-k_{3e})z} \right] \frac{\mathcal{A}_1^3}{(1+i\zeta)^2} \\ \frac{d\mathcal{A}_{3,y}}{dz} = \frac{3i\omega}{2n_{3\omega}c} \left[ i \left( \chi_{cr}^{(3)} e^{i(2k_{1e}+k_{1o}-k_{3o})z} - \chi_{\perp}^{(3)} e^{i(3k_{1o}-k_{3o})z} \right) \right] \frac{\mathcal{A}_1^3}{(1+i\zeta)^2} \\ \frac{d\mathcal{A}_{3,z}}{dz} = 0 \end{cases} \quad (\text{B.37})$$

$$\begin{cases} \mathcal{A}_{3,x} = \frac{3i\omega}{2n_{3\omega}c} \left[ \chi_{\parallel}^{(3)} J(\Delta k_{eeee}, z_1, z_2) - \chi_{cr}^{(3)} J(\Delta k_{eooe}, z_1, z_2) \right] \mathcal{A}_1^3 \\ \mathcal{A}_{3,y} = \frac{3i\omega}{2n_{3\omega}c} \left[ i \left( \chi_{cr}^{(3)} J(\Delta k_{oeeo}, z_1, z_2) - \chi_{\perp}^{(3)} J(\Delta k_{oooo}, z_1, z_2) \right) \right] \mathcal{A}_1^3 \\ \mathcal{A}_{3,z} = 0 \end{cases} \quad (\text{B.38})$$

# Annexe C

## Modèle de simulation semi-analytique

La méthode numérique standard utilisée pour calculer le signal THG généré par un faisceau focalisé sur une géométrie d'échantillon arbitraire a été proposée par Cheng et al. [110]. Elle repose sur 3 étapes de calcul illustrées sur la figure C.1 : (i) la description du champ focalisé à la longueur d'onde fondamentale, (ii) le calcul de la distribution de la polarisation non linéaire induite, et (iii) la propagation de la polarisation non-linéaire en champ lointain.

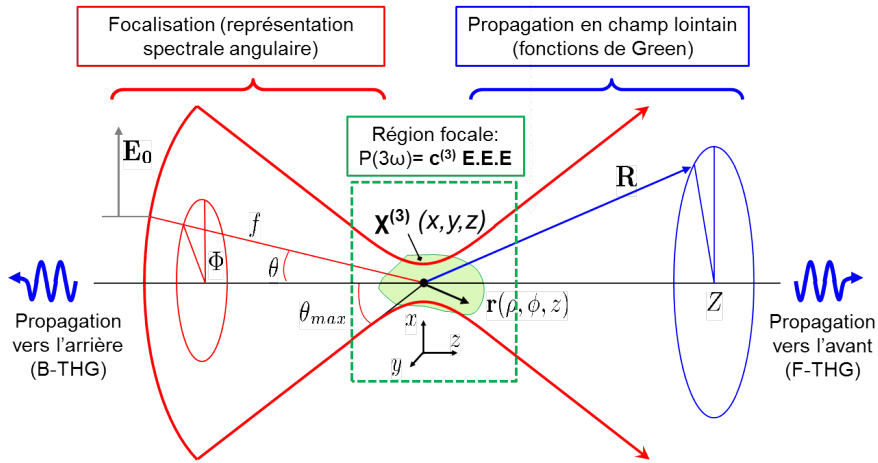


FIGURE C.1 – Modèle semi-analytique de modélisation du signal THG

### i) La distribution du champ gaussien focalisé

La distribution du champ gaussien focalisé est calculée à partir du champ au niveau de la pupille avant en utilisant une intégrale de diffraction Debye-Wolf ([112], [113]). Pour un faisceau gaussien polarisé selon l'axe  $x$  et focalisé avec un objectif à forte ouverture numérique, elle s'écrit en coordonnées cylindriques :

$$\vec{E}(\rho, \phi, z) = E_1 \begin{pmatrix} I_{010}(\rho, z) + I_{011}(\rho, z) + \cos(2\phi) [I_{210}(\rho, z) - I_{211}(\rho, z)] \\ \sin(2\phi) [I_{210}(\rho, z) - I_{211}(\rho, z)] \\ -2i\cos(\phi) I_{120}(\rho, z) \end{pmatrix} \quad (C.1)$$

où  $I_{lmn}$  est défini par :

---


$$I_{lmn}(\rho, z) = \int_0^{\alpha_{max}} f_w(\theta) \cos^{1/2}(\theta) \sin^m(\theta) \cos^n(\theta) J_l(k\rho \sin(\theta)) e^{ikz \cos(\theta)} d\theta \quad (C.2)$$

et le facteur de remplissage  $f_w(\theta)$

$$f_w(\theta) = e^{-\sin(\theta)/(f_0 \sin(\theta_{max}))^2} \quad (C.3)$$

On remarquera l'asymétrie  $xy$  du faisceau focalisé polarisé linéairement.

## ii) La polarisation non-linéaire

La polarisation non-linéaire induite par l'interaction entre le champ fondamental focalisé  $\vec{E}(\omega)$  et un matériau - décrit numériquement par une grille régulière avec une réponse THG ( $\chi^{(3)}$ ) présentant une distribution spatiale - est calculée analytiquement à partir de la relation suivante :

$$P_i^{(THG)}(3\omega) = \epsilon_0 \sum_{j,k,l} \chi_{ijkl}^{(3)} E_j(\omega) E_k(\omega) E_l(\omega) \quad (C.4)$$

## iii) Champ THG

La dernière étape consiste à propager l'ensemble des polarisations non-linéaires du troisième ordre générées par l'ensemble des sources THG de coordonnées  $r$  appartenant au volume d'excitation  $V$  jusqu'en un point de coordonnée  $R$  appartenant au détecteur situé en champ lointain. L'amplitude du champ de troisième harmonique en champ lointain - ici calculée avec des fonctions de Green  $G_{FF}$  - résulte d'interférences entre les polarisations non-linéaires induites au niveau du volume d'excitation, et s'écrit :

$$E_{FF}(\vec{R}) = \int_V \vec{P}^{(3\omega)}(\vec{r}) G_{FF}(\vec{R} - \vec{r}) dV \quad (C.5)$$

où la fonction de Green en champ lointain  $G_{FF}$  est donnée par :

$$G_{FF}(\vec{R}) = \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \left[ \mathbb{1} - \frac{\vec{R}\vec{R}}{R^2} \right] \quad (C.6)$$

L'intensité THG émise totale  $I_{FF}$  est enfin calculée en sommant l'ensemble des intensités THG calculées aux points de coordonnées  $R$  d'une grille 2D (dont les dimensions sont déterminées par l'ouverture numérique de détection) qui représente la surface du détecteur.

$$I_{FF} = \int_S |\vec{E}_{FF}^{(3\omega)}(\vec{R})|^2 d\vec{R} \quad (C.7)$$

## Annexe D

### Réglage précis des lames d'ondes

Pour orienter précisément la polarisation linéaire qui arrive dans l'EOM à  $45^\circ$  de ses axes neutres, nous avons cherché l'orientation exacte des axes neutres de l'EOM. Pour cela, nous avons orienté la lame demi-onde de sorte que la polarisation qui traverse l'EOM soit inchangée pour toutes les valeurs de tension appliquées, ce qui nous indique qu'elle est parallèle à un des axes neutres de l'EOM. Nous l'avons ensuite réorientée précisément à  $22.5^\circ$  de cette position. En comparaison de sa position initiale, la lame demi-onde a été tournée d'un angle correctif d'un degré dans le sens négatif et la lame quart-d'onde de deux degrés dans le sens négatif (double de la rotation de la première lame d'onde).

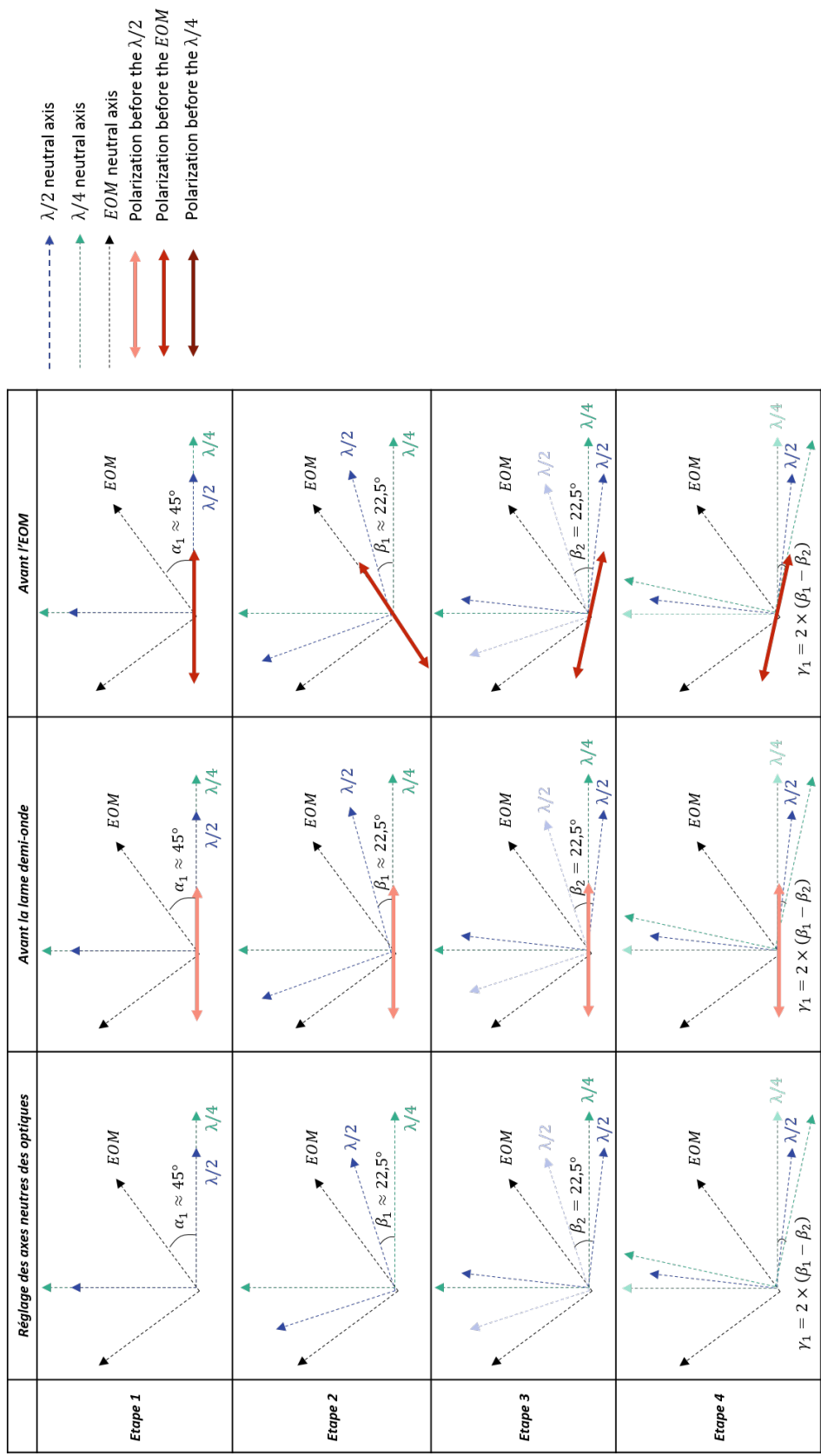


FIGURE D.1 – Etapes de réglage des lames d’onde.

## Annexe E

# Evolution du diamètre des axones myélinisés et de l'épaisseur de la gaine de myéline

Buckley et al. [164] ont caractérisé précisément l'évolution de l'épaisseur de la gaine de myéline avec le diamètre des axones de la moelle épinière en évaluant le *g-ratio* - défini par le rapport entre le diamètre de l'axone seul et celui de l'axone myélinisé. Ils ont mis en évidence la constance du *g-ratio* (valeur moyenne : 0.91) sur les axones Mauthner malgré l'augmentation rapide du diamètre axonal - passant de 2.9 à 10.4  $\mu m$  entre 3 et 10 dpf - tandis que le *g-ratio* des axones dorsaux et ventraux est fortement dépendant de leur diamètre qui reste constant 0.3 – 2.6  $\mu m$  au cours du développement embryonnaire.



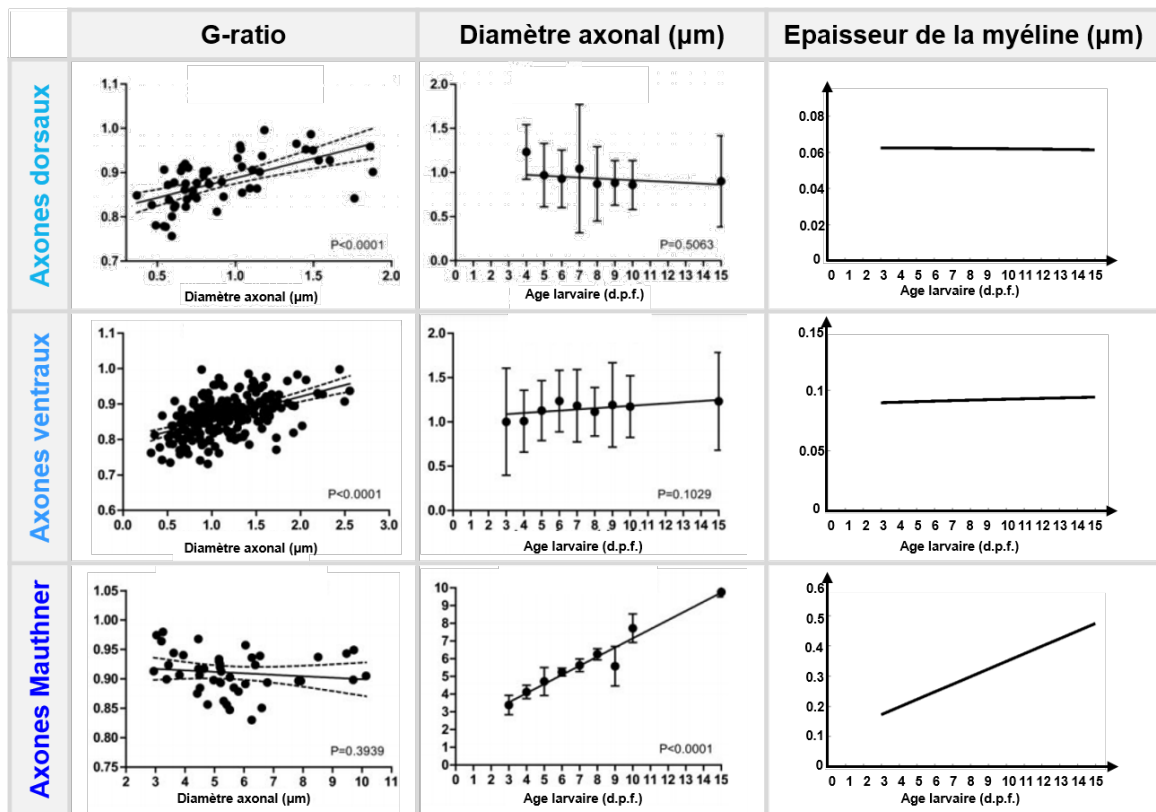


FIGURE E.1 – Etude de la régulation de l'épaisseur de la myéline avec le diamètre des axones Mauthner, ventraux et dorsaux dans la moelle épinière du poisson-zèbre à partir de l'évaluation du g-ratio. Mise en évidence de l'augmentation du g-ratio avec le diamètre axonal sur les axones ventraux et dorsaux dont la dimension reste inchangée pendant le développement larvaire, tandis que le g-ratio de l'axone Mauthner conserve une valeur constante alors que son diamètre augmente dans le temps. Buckley et al. concluent sur une forte régulation de l'épaisseur de la myéline de l'axone Mauthner et l'absence de régulation sur les axones ventraux et dorsaux. Adapté de [164].

# Annexe F

## Estimation des $\chi^{(3)}$ des liquides

Cette annexe présente la méthode d'estimation expérimentale des  $\chi^{(3)}$  de liquides d'intérêt, dont les valeurs ont ensuite été utilisées pour décrire les propriétés optiques des matériaux dans les modélisations numériques du signal THG. Cette méthode - décrite notamment par Clay et al. [189] - consiste à déduire la valeur du  $\chi^{(3)}$  des liquides à partir des profils axiaux d'intensité THG mesurés lorsque le volume focal traverse successivement un milieu d'immersion, une lamelle de verre et un liquide.

### - Acquisition des profils d'intensité THG

La première étape correspond à l'acquisition expérimentale des profils d'intensité THG. Pour cela, un liquide est monté entre une lamelle et une lame de verre en utilisant des espaceurs pour éviter l'adhésion entre la lame et la lamelle. Une série d'images en contraste THG est ensuite enregistrée lorsque le volume focal traverse l'eau d'immersion de l'objectif, la lamelle et le liquide (cf. figure F.1.a). A partir de cette pile d'image, le profil d'intensité THG selon  $z$  est extrait (cf. figure F.1.b). Ce profil THG fait apparaître un premier pic d'intensité  $I_{eau/verre}$  qui correspond à l'interface eau d'immersion/verre et un second d'intensité  $I_{verre/liquide}$  associé à l'interface verre/liquide. Un second profil de référence est déterminé en substituant l'eau au liquide dans la géométrie précédente.

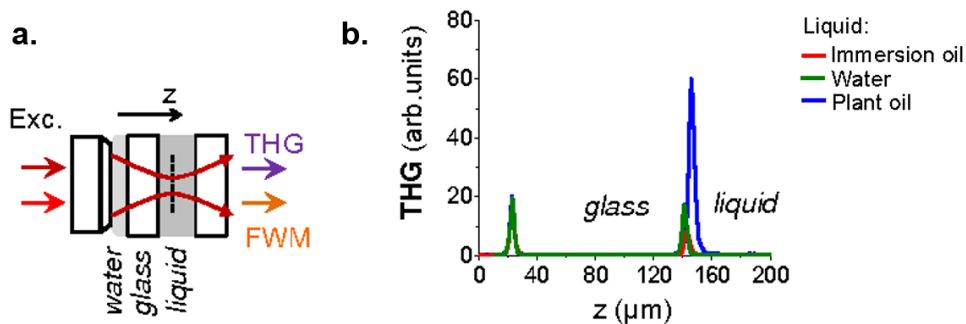


FIGURE F.1 – a. Géométrie utilisée pour l'estimation du  $\chi^{(3)}$  d'un liquide à partir d'un balayage en  $z$ . b. Profils THG en  $z$  pour différents liquides. Adapté de [190].

### - Estimation de $\chi_{verre}^{(3)}$

La seconde étape consiste à déterminer numériquement la valeur du  $\chi_{verre}^{(3)}$  à partir des valeurs expérimentales  $I_{verre/eau}$  et  $I_{eau/verre}$ . Loin des résonances, ces grandeurs sont reliées par la

relation suivante où **liquide** = **eau** (d'après [189]) :

$$\frac{\chi_{liquide}^{(3)}(3\omega)}{\chi_{verre}^{(3)}(3\omega)} = \frac{J(b_{verre}\Delta\kappa_{verre})b_{verre}(\omega)}{J(b_{liquide}\Delta\kappa_{liquide})b_{liquide}(\omega)} \times \left(1 \pm \sqrt{\frac{I_{verre/liquide}}{I_{eau/verre}}}\right) \quad (F.1)$$

On en déduit :

$$\chi_{verre}^{(3)}(3\omega) = \chi_{eau}^{(3)}(3\omega) \frac{J(b_{eau}\Delta\kappa_{eau})b_{eau}(\omega)}{J(b_{verre}\Delta\kappa_{verre})b_{verre}(\omega)} \frac{1}{\left(1 \pm \sqrt{\frac{I_{verre/eau}}{I_{eau/verre}}}\right)} \quad (F.2)$$

avec les paramètres suivants :

- le paramètre confocal  $b(\omega)$  :

$$b(\omega) = 2\pi n(\omega) \frac{\omega_0^2}{\lambda} = \frac{2n(\omega)\lambda [n^2(\omega) - NA^2]}{\pi NA^2} \quad (F.3)$$

- le paramètre  $\Delta\kappa$  :

$$\Delta\kappa = 6\pi \frac{n(\omega) - n(3\omega)}{\lambda} \quad (F.4)$$

- l'intégrale  $J(b\Delta\kappa)$  :

$$J(b\Delta\kappa) = \int_0^\infty \frac{e^{ib\Delta\kappa\phi}}{(1 + 2i\phi)^2} d\phi \quad (F.5)$$

- **Estimation de  $\chi_{liquide}^{(3)}$**

Enfin, la valeur de  $\chi_{liquide}^{(3)}$  est estimée numériquement à partir des valeurs de  $\chi_{verre}^{(3)}$ ,  $I_{eau/verre}$  et  $I_{verre/liquide}$  en utilisant l'équation (2).

- **Résumé des valeurs d'indices de réfraction et de  $\chi^{(3)}$**

On résume dans le tableau ci-dessous les propriétés optiques des liquides utilisés pour modéliser les milieux d'immersion et de remplissage des géométries cylindriques dans les simulations numériques présentées au chapitre IV :

Liquide	Indice de réfraction $n$		$\chi^{(3)}(3\omega)$ ( $10^{-22} m^2 V^{-2}$ )
	$n(\omega)$	$n(3\omega)$	
Eau	1.3234	1.3473	1.6800
Glycérol dilué	1.4112	1.4325	2.915
Glycérol pur	1.4627	1.4825	2.422
TDE dilué	1.4543	1.5034	3.080
TDE pur	1.4932	1.5497	3.535
Sorbitol	1.4627	1.4825	
BK7	1.5062	1.5360	2.13

On résume également les propriétés optiques des liquides utilisés dans la géométrie des interfaces verticales des simulations numériques présentées au chapitre II :

Liquide	Fraction	Indice de réfraction $n$			$\chi^{(3)}(3\omega)$ ( $10^{-22} \text{ m}^2 \text{ V}^{-2}$ )
		$n(\text{réfractomètre})$	$n(\omega)$	$n(3\omega)$	
Liquide 1 : Eau	1.0000	1.3335	1.3234	1.3473	1.680
Liquide 2	0.7402	1.3800	1.3675	1.3999	2.283
Liquide 3	0.5240	1.4192	1.4042	1.4436	2.784
Liquide 4	0.2454	1.4697	1.4515	1.5000	3.431
Liquide 5 : TDE	0.0000	1.5142	1.4932	1.5497	4.000

avec  $NA = 0.74$ ,  $\lambda_{exc} = 1100 \text{ nm}$

Pour essayer d'expliquer la valeur élevée du  $\chi^{(3)}$  du TDE, nous avons mesuré son spectre de transmission (cf. figure F.2). Les faibles valeurs d'absorption mesurées aux longueurs d'onde d'excitation ( $\lambda_{exc} = 1100 \text{ nm}$ ) et harmonique ( $\lambda_{THG} = 367 \text{ nm}$ ) ne fournissent pas d'explication simple pour justifier la présence d'une résonance à ces longueurs d'onde qui pourrait être à l'origine de la valeur élevée du  $\chi^{(3)}$  du TDE.

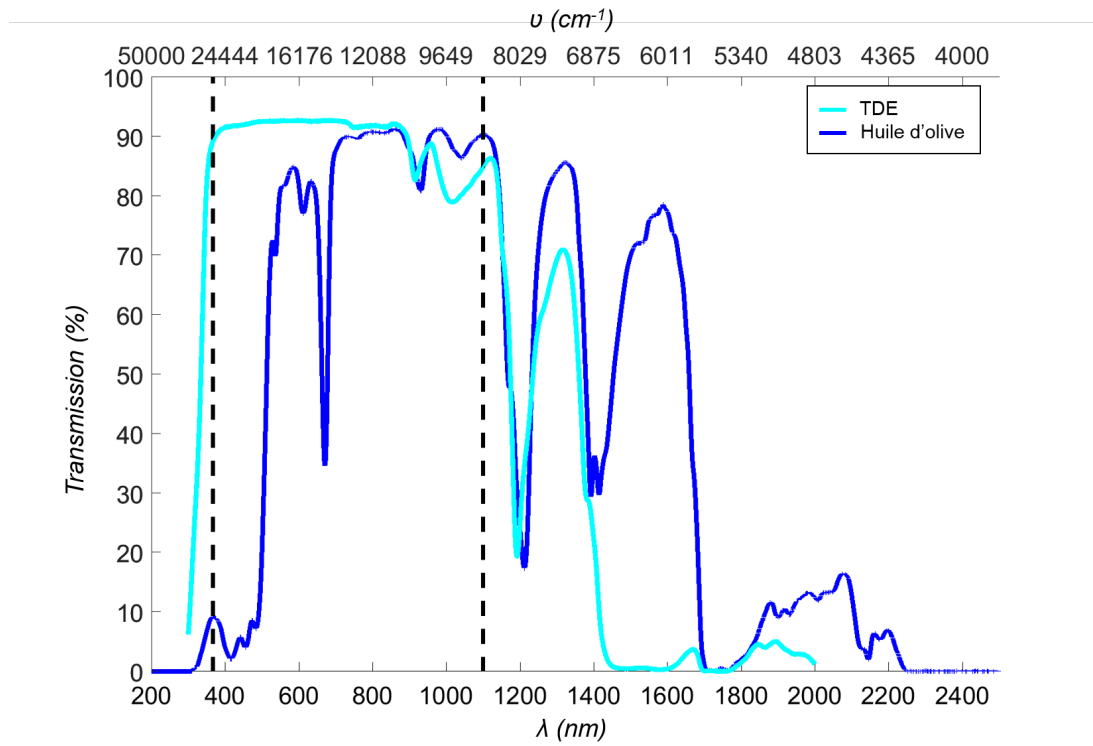


FIGURE F.2 – Spectres de transmission du Thiodiéthanol (TDE) et de l'huile d'olive végétale.

# Annexe G

## Matériel et méthodes

### *Encart G.1 - Préparation des tranches de cervelet sur des membranes de culture*

Les souris d'une portée ont été élevées pendant 9 ou 10 jours après leur naissance (P9 ou P10) dans l'animalerie de l'ICM puis amenées dans notre laboratoire où elles sont sacrifiées. Après prélèvement, le cervelet de chaque souris est placé dans une solution tampon **HBSS** ( $\times 1$ ) à 4°C puis découpé en tranches de 250 - 300  $\mu m$  d'épaisseur avec un chopper mécanique. Les plus belles tranches sont disposées sur deux membranes semi-perméables entre l'air et un **milieu de culture** - pour maintenir une oxygénation correcte - dans une plaque à 6 puits puis conservées dans un incubateur à 35.5°C avec régulation de  $CO_2$  (cf. fig.4.23.a)

### *Encart G.2 - Préparation du milieu de culture des tranches*

Le milieu de culture des tranches est une solution riche en glucose préparée en mélangeant 32  $mL$  de produit de culture **BME** ( $\times 1$ ), 9.5  $mL$  de **sérum de cheval** et 500  $\mu L$  de **de PeniStreptomycine** (antibiotique). Ce milieu de culture est ensuite filtré au moyen d'un filtre avec des pores de 0.2  $\mu m$  puis réchauffé dans l'incubateur pendant une dizaine de minutes. L'ancien milieu est évacué des puits puis remplacé par 1  $mL$  de milieu de culture frais tous les trois jours.

### *Encart G.3 - Imagerie des tranches*

On dépose la membrane à imager dans une petite boîte de Pétri avec lamelle de verre remplie de 1  $mL$  d'un milieu d'imagerie réchauffé dans l'incubateur. On verse ensuite délicatement 1  $mL$  de ce milieu sur le dessus de la membrane. La boîte de Pétri est enfin placée dans la chambre **OKOLab** régulée en oxygène, en  $CO_2$  (5 %), en humidité et en température (34-35°) pour l'imagerie.

**Encart G.4 - Préparation du milieu d'imagerie**

Un volume de 10 mL de milieu d'imagerie est préparé en mélangeant 7.5 mL de **DMEM**, 2 mL de **HBSS**, 0.5 mL de **sérum de cheval**, 100  $\mu$ L de **GlutaMAX**, 100  $\mu$ L de **D-glucose** et 100  $\mu$ L de **PeniStreptomycine**, puis filtré au moyen d'un filtre avec des pores de 0.2  $\mu$ m.

**Encart G.5 - Traitement de fixation des tranches**

La fixation des tranches est réalisée en déposant la membrane dans un puits contenant 1 mL de **PFA** à 4 % puis en ajoutant 1 mL de **PFA** à 4 % sur le dessus de la membrane. Après 20 minutes, le PFA est aspiré, puis le dessous de la membrane est rincé à trois reprises pendant 10 minutes dans une solution de **PBS**. La membrane avec la tranche est ensuite conservée dans un puits contenant 2 mL de **PBS** à 4°C.

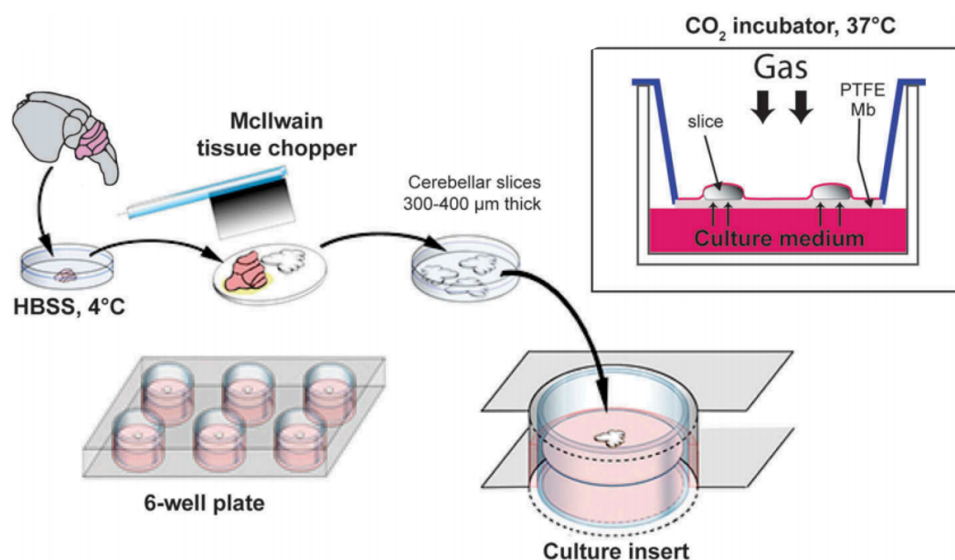


FIGURE G.1 – Procédure de préparation des cultures organotypiques sur des membranes semi-perméables. Adapté de [180].



# Bibliographie

- [1] Pierre Morell and William T Norton. Myelin. *Scientific American*, 242(5) :88–119, 1980.
- [2] Frederico AC Azevedo, Ludmila RB Carvalho, Lea T Grinberg, José Marcelo Farfel, Renata EL Ferretti, Renata EP Leite, Wilson Jacob Filho, Roberto Lent, and Suzana Herculano-Houzel. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *Journal of Comparative Neurology*, 513(5) :532–541, 2009.
- [3] Nicola J Allen and David A Lyons. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science*, 362(6411) :181–185, 2018.
- [4] Keiichiro Susuki. Myelin : a specialized membrane for cell communication. *Nature Education*, 3(9) :59, 2010.
- [5] Rud Virchow. Ueber das ausgebreitete vorkommen einer dem nervenmark analogen substanz in den thierischen gewebe. *Virchows Archiv*, 6(4) :562–572, 1854.
- [6] P Morell, RH Quarles, and WT Norton. Neural membranes : myelin formation, structure, and biochemistry. *Basic Neurochemistry*, 5, 1994.
- [7] Gopakumar Gopalakrishnan, Anshul Awasthi, Wiam Belkaid, Omar De Faria Jr, Dalinda Liazoghli, David R Colman, and Ajit S Dhaunchak. Lipidome and proteome map of myelin membranes. *Journal of neuroscience research*, 91(3) :321–334, 2013.
- [8] DLD Caspar and DANIEL A KIRSCHNER. Myelin membrane structure at 10 Å resolution. *Nature New Biology*, 231(19) :46, 1971.
- [9] Alan Peters and James E Vaughn. Microtubules and filaments in the axons and astrocytes of early postnatal rat optic nerves. *The Journal of cell biology*, 32(1) :113–119, 1967.

- [10] Joel Eyer and Alan Peterson. Neurofilament-deficient axons and perikaryal aggregates in viable transgenic mice expressing a neurofilament- $\beta$ -galactosidase fusion protein. *Neuron*, 12(2) :389–405, 1994.
- [11] Lukas C Kapitein and Casper C Hoogenraad. Which way to go ? cytoskeletal organization and polarized transport in neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 46(1) :9–20, 2011.
- [12] János A Perge, Jeremy E Niven, Enrico Mugnaini, Vijay Balasubramanian, and Peter Sterling. Why do axons differ in caliber ? *Journal of Neuroscience*, 32(2) :626–638, 2012.
- [13] Richard H Quarles, Wendy B Macklin, and Pierre Morell. Myelin formation, structure and biochemistry. *Basic neurochemistry : molecular, cellular and medical aspects*, 7 :51–71, 2006.
- [14] Ursula Fünfschilling, Lotti M Supplie, Don Mahad, Susann Boretius, Aiman S Saab, Julia Edgar, Bastian G Brinkmann, Celia M Kassmann, Iva D Tzvetanova, Wiebke Möbius, et al. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature*, 485(7399) :517, 2012.
- [15] Sarah Richert, Sandra Kleinecke, Jenniffer Günther, Florian Schaumburg, Julia Edgar, Gerd Ulrich Nienhaus, Klaus-Armin Nave, and Celia M Kassmann. In vivo labeling of peroxisomes by photoconvertible meos2 in myelinating glia of mice. *Biochimie*, 98 :127–134, 2014.
- [16] PILA Yakovlev. The myelogenetic cycles of regional maturation of the brain. *Regional development of the brain in early life*, pages 3–70, 1967.
- [17] Betty Ann Brody, Hannah C Kinney, Alexander S Kloman, and Floyd H Gilles. Sequence of central nervous system myelination in human infancy. i. an autopsy study of myelination. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 46(3) :283–301, 1987.
- [18] Seonok Lee, Michelle K Leach, Stephanie A Redmond, SY Christin Chong, Synthia H Mellon, Samuel J Tuck, Zhang-Qi Feng, Joseph M Corey, and Jonah R Chan. A culture system to study oligodendrocyte myelination processes using engineered nanofibers. *Nature methods*, 9(9) :917, 2012.

- 
- [19] Claes-Henric Berthold, I Nilsson, and M Rydmark. Axon diameter and myelin sheath thickness in nerve fibres of the ventral spinal root of the seventh lumbar nerve of the adult and developing cat. *Journal of anatomy*, 136(Pt 3) :483, 1983.
- [20] Marie E Bechler, Lauren Byrne, et al. Cns myelin sheath lengths are an intrinsic property of oligodendrocytes. *Current Biology*, 25(18) :2411–2416, 2015.
- [21] Nicole Baumann and Danielle Pham-Dinh. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological reviews*, 81(2) :871–927, 2001.
- [22] R Douglas Fields. White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends in neurosciences*, 31(7) :361–370, 2008.
- [23] Bernhard Hemmer, Juan J Archelos, and Hans-Peter Hartung. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(4) :291, 2002.
- [24] Christine Stadelmann, Sebastian Timmler, Alonso Barrantes-Freer, and Mikael Simons. Myelin in the central nervous system : Structure, function, and pathology. *Physiological reviews*, 99(3) :1381–1431, 2019.
- [25] Marie T Fischer, Rakhi Sharma, Jamie L Lim, Lukas Haider, Josa M Frischer, Joost Drexhage, Don Mahad, Monika Bradl, Jack van Horssen, and Hans Lassmann. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain*, 135(3) :886–899, 2012.
- [26] Andrew PD Henderson, Michael H Barnett, John DE Parratt, and John W Prineas. Multiple sclerosis : distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Annals of Neurology : Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 66(6) :739–753, 2009.
- [27] Wolfgang Brück, Mascha Schmied, Gerda Suchanek, Yvonne Brück, Helene Breitschopf, Sigrid Poser, Sara Piddlesden, and Hans Lassmann. Oligodendrocytes in the early course of multiple sclerosis. *Annals of Neurology : Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 35(1) :65–73, 1994.
- [28] I Mews, M Bergmann, S Bunkowski, F Gullotta, and W Brück. Oligodendrocyte and axon pathology in clinically silent multiple sclerosis lesions. *Multiple Sclerosis Journal*, 4(2) :55–62, 1998.

- [29] Otto Marburg. *Die sogenannte akute multiple Sklerose.* , 1906.
- [30] John W Prineas, Robin O Barnard, Tamas Revesz, Eunice E Kwon, Leroy Sharer, and Eun-Sock Cho. Multiple sclerosis : pathology of recurrent lesions. *Brain*, 116(3) :681–693, 1993.
- [31] John W Prineas. The neuropathology of multiple sclerosis. *Handbook of clinical neurology*, 3(47) :213–257, 1985.
- [32] Alexandra Kutzelnigg, Jens C Faber-Rod, Jan Bauer, Claudia F Lucchinetti, Per S Sorensen, Henning Laursen, Christine Stadelmann, Wolfgang Brück, Helmut Rauschka, Manfred Schmidbauer, et al. Widespread demyelination in the cerebellar cortex in multiple sclerosis. *Brain pathology*, 17(1) :38–44, 2007.
- [33] GC DeLuca, K Williams, N Evangelou, GC Ebers, and MM Esiri. The contribution of demyelination to axonal loss in multiple sclerosis. *Brain*, 129(6) :1507–1516, 2006.
- [34] Claudia F Lucchinetti, Bogdan FG Popescu, Reem F Bunyan, Natalia M Moll, Shanu F Roemer, Hans Lassmann, Wolfgang Brück, Joseph E Parisi, Bernd W Scheithauer, Caterina Giannini, et al. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 365(23) :2188–2197, 2011.
- [35] Lars Bø, Christian A Vedeler, Harald I Nyland, Bruce D Trapp, and Sverre J Mørk. Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 62(7) :723–732, 2003.
- [36] Josa M Frischer, Stephen D Weigand, Yong Guo, Nilufer Kale, Joseph E Parisi, Istvan Pirko, Jay Mandrekar, Stephan Bramow, Imke Metz, Wolfgang Brück, et al. Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque. *Annals of neurology*, 78(5) :710–721, 2015.
- [37] Monique Dubois-Dalcq, Robin JM Franklin, et al. Enhancing central nervous system remyelination in multiple sclerosis. *Neuron*, 48(1) :9–12, 2005.
- [38] Robin JM Franklin. C. ffrench-constant, “remyelination in the cns : from biology to therapy,”. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(11) :839–855, 2008.

- 
- [39] KA Irvine and WF Blakemore. Remyelination protects axons from demyelination-associated axon degeneration. *Brain*, 131(6) :1464–1477, 2008.
- [40] Ofira Einstein, Nikolaos Grigoriadis, Rachel Mizrachi-Kol, Etti Reinhartz, Eleni Polyzoidou, Iris Lavon, Ioannis Milonas, Dimitrios Karussis, Oded Abramsky, and Tamir Ben-Hur. Transplanted neural precursor cells reduce brain inflammation to attenuate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Experimental neurology*, 198(2) :275–284, 2006.
- [41] Stefano Pluchino, Angelo Quattrini, Elena Brambilla, Angela Gritti, Giuliana Salani, Giorgia Dina, Rossella Galli, Ubaldo Del Carro, Stefano Amadio, Alessandra Bergami, et al. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature*, 422(6933) :688, 2003.
- [42] Warren R Zipfel, Rebecca M Williams, and Watt W Webb. Nonlinear magic : multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature biotechnology*, 21(11) :1369, 2003.
- [43] Paul C Lauterbur et al. Image formation by induced local interactions : examples employing nuclear magnetic resonance. 1973.
- [44] Alex Rovira, Cristina Auger, and Juli Alonso. Magnetic resonance monitoring of lesion evolution in multiple sclerosis. *Therapeutic advances in neurological disorders*, 6(5) :298–310, 2013.
- [45] Peter J Basser, James Mattiello, and Denis LeBihan. Mr diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophysical journal*, 66(1) :259–267, 1994.
- [46] Olga Ciccarelli, David J Werring, Gareth J Barker, Colette M Griffin, Claudia AM Wheeler-Kingshott, David H Miller, and Alan J Thompson. A study of the mechanisms of normal-appearing white matter damage in multiple sclerosis using diffusion tensor imaging. *Journal of neurology*, 250(3) :287–292, 2003.
- [47] Margaret Rosenbloom, Edith V Sullivan, Adolf Pfefferbaum, et al. Using magnetic resonance imaging and diffusion tensor imaging to assess brain damage in alcoholics. *Alcohol Research and Health*, 27(2) :146–152, 2003.

- [48] Yaniv Assaf and Ofer Pasternak. Diffusion tensor imaging (dti)-based white matter mapping in brain research : a review. *Journal of molecular neuroscience*, 34(1) :51–61, 2008.
- [49] Bruno Stankoff, Yanming Wang, Michel Bottlaender, Marie-Stephane Aigrot, Frederic Dolle, Chunying Wu, Douglas Feinstein, Guo-Feng Huang, Frank Semah, Chester A Mathis, et al. Imaging of cns myelin by positron-emission tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24) :9304–9309, 2006.
- [50] Caius G Radu, Chengyi J Shu, Stephanie M Shelly, Michael E Phelps, and Owen N Witte. Positron emission tomography with computed tomography imaging of neuroinflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(6) :1937–1942, 2007.
- [51] Yanming Wang, Chunying Wu, Andrew V Caprariello, Eduardo Somoza, Wenxia Zhu, Changning Wang, and Robert H Miller. In vivo quantification of myelin changes in the vertebrate nervous system. *Journal of Neuroscience*, 29(46) :14663–14669, 2009.
- [52] Wiebke Möbius, Klaus-Armin Nave, and Hauke B Werner. Electron microscopy of myelin : structure preservation by high-pressure freezing. *Brain research*, 1641 :92–100, 2016.
- [53] Richard P Bunge, Mary Bartlett Bunge, and Margaret Bates. Movements of the schwann cell nucleus implicate progression of the inner (axon-related) schwann cell process during myelination. *The Journal of Cell Biology*, 109(1) :273–284, 1989.
- [54] C Laule, E Leung, D KB Li, AL Traboulsee, DW Paty, AL MacKay, and G RW Moore. Myelin water imaging in multiple sclerosis : quantitative correlations with histopathology. *Multiple Sclerosis Journal*, 12(6) :747–753, 2006.
- [55] Seung-Hyun Jung, Suhyun Kim, Ah-Young Chung, Hyun-Taek Kim, Ju-Hoon So, Jaeho Ryu, Hae-Chul Park, and Cheol-Hee Kim. Visualization of myelination in gfp-transgenic zebrafish. *Developmental Dynamics*, 239(2) :592–597, 2010.
- [56] Aaron J Schain, Robert A Hill, and Jaime Grutzendler. Label-free in vivo imaging of myelinated axons in health and disease with spectral confocal reflectance microscopy. *Nature medicine*, 20(4) :443, 2014.



- [57] Juliette Ben Arous, Jonas Binding, Jean-François Léger, Mariano Casado, Piotr Topilko, Laurent Bourdieu, Sylvain Gigan, and A Claude Boccara. Single myelin fiber imaging in living rodents without labeling by deep optical coherence microscopy. *Journal of biomedical optics*, 16(11) :116012, 2011.
- [58] Joseph A Izatt, Michael R Hee, Eric A Swanson, Charles P Lin, David Huang, Joel S Schuman, Carmen A Puliafito, and James G Fujimoto. Micrometer-scale resolution imaging of the anterior eye in vivo with optical coherence tomography. *Archives of ophthalmology*, 112(12) :1584–1589, 1994.
- [59] E Beaupaire, A Claude Boccara, M Lebec, L Blanchot, and H Saint-Jalmes. Full-field optical coherence microscopy. *Optics letters*, 23(4) :244–246, 1998.
- [60] Francis P Henry, Yan Wang, Carissa LR Rodriguez, Mark A Randolph, Esther AZ Rust, Jonathan M Winograd, Johannes F de Boer, and B Hyle Park. In vivo optical microscopy of peripheral nerve myelination with polarization sensitive-optical coherence tomography. *Journal of biomedical optics*, 20(4) :046002, 2015.
- [61] CJR Sheppard and R Kompfner. Resonant scanning optical microscope. *Applied optics*, 17(18) :2879–2882, 1978.
- [62] Winfried Denk, James H Strickler, and Watt W Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951) :73–76, 1990.
- [63] Massimo Cazzanelli and Joerg Schilling. Second order optical nonlinearity in silicon by symmetry breaking. *Applied Physics Reviews*, 3(1) :011104, 2016.
- [64] Delphine Débarre. *Microscopie par génération de troisième harmonique appliquée à la biologie*. PhD thesis, Ecole Polytechnique X, 2006.
- [65] Patrick Theer, Mazahir T Hasan, and Winfried Denk. Two-photon imaging to a depth of 1000  $\mu\text{m}$  in living brains by use of a  $\text{Ti} : \text{Al}_2\text{O}_3$  regenerative amplifier. *Optics letters*, 28(12) :1022–1024, 2003.
- [66] Maria Göppert-Mayer. Über elementarakte mit zwei quantensprüngen. *Annalen der Physik*, 401(3) :273–294, 1931.

- [67] Adi Mizrahi, Justin C Crowley, Eran Shtoyerman, and Lawrence C Katz. High-resolution in vivo imaging of hippocampal dendrites and spines. *Journal of Neuroscience*, 24(13) :3147–3151, 2004.
- [68] Michael J Levene, Daniel A Dombeck, Karl A Kasischke, Raymond P Molloy, and Watt W Webb. In vivo multiphoton microscopy of deep brain tissue. *Journal of neurophysiology*, 91(4) :1908–1912, 2004.
- [69] Demirhan Kobat, Michael E Durst, Nozomi Nishimura, Angela W Wong, Chris B Schaffer, and Chris Xu. Deep tissue multiphoton microscopy using longer wavelength excitation. *Optics express*, 17(16) :13354–13364, 2009.
- [70] Kyle P Quinn, Gautham V Sridharan, Rebecca S Hayden, David L Kaplan, Kyongbum Lee, and Irene Georgakoudi. Quantitative metabolic imaging using endogenous fluorescence to detect stem cell differentiation. *Scientific reports*, 3 :3432, 2013.
- [71] S Maiti, Jason B Shear, RM Williams, WR Zipfel, and Watt W Webb. Measuring serotonin distribution in live cells with three-photon excitation. *Science*, 275(5299) :530–532, 1997.
- [72] Nicholas G Horton, Ke Wang, Demirhan Kobat, Catharine G Clark, Frank W Wise, Chris B Schaffer, and Chris Xu. In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain. *Nature photonics*, 7(3) :205, 2013.
- [73] Robert W Boyd. *Nonlinear optics*. Elsevier, 2003.
- [74] Patrick Christian Stoller, Beop-Min Kim, Alexander M Rubenchik, Karen M Reiser, and Luiz Barroca Da Silva. Polarization-dependent optical second-harmonic imaging of rat-tail tendon. *Journal of biomedical optics*, 7(2) :205–215, 2002.
- [75] Rebecca M Williams, Warren R Zipfel, and Watt W Webb. Interpreting second-harmonic generation images of collagen i fibrils. *Biophysical journal*, 88(2) :1377–1386, 2005.
- [76] William Mohler, Andrew C Millard, and Paul J Campagnola. Second harmonic generation imaging of endogenous structural proteins. *Methods*, 29(1) :97–109, 2003.
- [77] Alex C Kwan, Daniel A Dombeck, and Watt W Webb. Polarized microtubule arrays in apical dendrites and axons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(32) :11370–11375, 2008.

- 
- [78] William H Stoothoff, Brian J Bacsikai, and Bradley T Hyman. Monitoring tau-tubulin interactions utilizing second harmonic generation in living neurons. *Journal of biomedical optics*, 13(6) :064039, 2008.
- [79] Laurent Moreaux, Olivier Sandre, Mireille Blanchard-Desce, and Jerome Mertz. Membrane imaging by simultaneous second-harmonic generation and two-photon microscopy. *Optics letters*, 25(5) :320–322, 2000.
- [80] Yan Fu, Haifeng Wang, Riyi Shi, and Ji-Xin Cheng. Second harmonic and sum frequency generation imaging of fibrous astroglial filaments in ex vivo spinal tissues. *Biophysical Journal*, 92(9) :3251–3259, 2007.
- [81] Daniel A Dombeck, Karl A Kasischke, Harshad D Vishwasrao, Martin Ingelsson, Bradley T Hyman, and Watt W Webb. Uniform polarity microtubule assemblies imaged in native brain tissue by second-harmonic generation microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12) :7081–7086, 2003.
- [82] Y Barad, H Eisenberg, M Horowitz, and Yaron Silberberg. Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation. *Applied Physics Letters*, 70(8) :922–924, 1997.
- [83] M Müller, J Squier, KR Wilson, and GJ Brakenhoff. 3d microscopy of transparent objects using third-harmonic generation. *Journal of microscopy*, 191(3) :266–274, 1998.
- [84] Jeff A Squier, Michiel Müller, GJ Brakenhoff, and Kent R Wilson. Third harmonic generation microscopy. *Optics express*, 3(9) :315–324, 1998.
- [85] Shi-Wei Chu, Szu-Yu Chen, Tsung-Han Tsai, Tzu-Ming Liu, Cheng-Yung Lin, Huai-Jen Tsai, and Chi-Kuang Sun. In vivo developmental biology study using noninvasive multi-harmonic generation microscopy. *Optics express*, 11(23) :3093–3099, 2003.
- [86] Chi-Kuang Sun, Shi-Wei Chu, Szu-Yu Chen, Tsung-Han Tsai, Tzu-Ming Liu, Chung-Yung Lin, and Huai-Jen Tsai. Higher harmonic generation microscopy for developmental biology. *Journal of structural biology*, 147(1) :19–30, 2004.
- [87] Virginijus Barzda, Catherine Greenhalgh, Jürg Aus der Au, Steven Elmore, Johannes HGM van Beek, and Jeff Squier. Visualization of mitochondria in cardiomyocytes. *Optics express*, 13(20) :8263–8276, 2005.

- [88] Delphine Débarre, Willy Supatto, Ana-Maria Pena, Aurélie Fabre, Thierry Tordjmann, Laurent Combettes, Marie-Claire Schanne-Klein, and Emmanuel Beaurepaire. Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy. *Nature methods*, 3(1) :47, 2006.
- [89] Che-Hang Yu, Shih-Peng Tai, Chun-Ta Kung, I-Jong Wang, Han-Chieh Yu, Hsiang-Ju Huang, Wen-Jeng Lee, Yi-Fan Chan, and Chi-Kuang Sun. In vivo and ex vivo imaging of intra-tissue elastic fibers using third-harmonic-generation microscopy. *Optics express*, 15(18) :11167–11177, 2007.
- [90] Jonathan M Bélisle, Santiago Costantino, Mara L Leimanis, Marie-Josée Bellemare, D Scott Bohle, Elias Georges, and Paul W Wiseman. Sensitive detection of malaria infection by third harmonic generation imaging. *Biophysical journal*, 94(4) :L26–L28, 2008.
- [91] Nicolas Olivier, Florent Aptel, Karsten Plamann, Marie-Claire Schanne-Klein, and Emmanuel Beaurepaire. Harmonic microscopy of isotropic and anisotropic microstructure of the human cornea. *Optics express*, 18(5) :5028–5040, 2010.
- [92] Dvir Yelin and Yaron Silberberg. Laser scanning third-harmonic-generation microscopy in biology. *Optics express*, 5(8) :169–175, 1999.
- [93] EJ Gualda, G Filippidis, M Mari, G Voglis, M Vlachos, C Fotakis, and N Tavernarakis. In vivo imaging of neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans* by third harmonic generation microscopy. *Journal of microscopy*, 232(2) :270–275, 2008.
- [94] Matthew J Farrar, Frank W Wise, Joseph R Fetcho, and Chris B Schaffer. In vivo imaging of myelin in the vertebrate central nervous system using third harmonic generation microscopy. *Biophysical journal*, 100(5) :1362–1371, 2011.
- [95] Stefan Witte, Adrian Negrean, Johannes C Lodder, Christiaan PJ De Kock, Guilherme Testa Silva, Huibert D Mansvelder, and Marie Louise Groot. Label-free live brain imaging and targeted patching with third-harmonic generation microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(15) :5970–5975, 2011.
- [96] Michael Redlich and Hyungsik Lim. A method to measure myeloarchitecture of the murine

- cerebral cortex in vivo and ex vivo by intrinsic third-harmonic generation. *Frontiers in neuroanatomy*, 13 :65, 2019.
- [97] Hyungsik Lim, Denis Sharoukhov, Imran Kassim, Yanqing Zhang, James L Salzer, and Carmen V Melendez-Vasquez. Label-free imaging of schwann cell myelination by third harmonic generation microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(50) :18025–18030, 2014.
- [98] Eric O Potma and X Sunney Xie. Detection of single lipid bilayers with coherent anti-stokes raman scattering (cars) microscopy. *Journal of Raman spectroscopy*, 34(9) :642–650, 2003.
- [99] Xiaolin Nan, Ji-Xin Cheng, and X Sunney Xie. Vibrational imaging of lipid droplets in live fibroblast cells with coherent anti-stokes raman scattering microscopy. *Journal of lipid research*, 44(11) :2202–2208, 2003.
- [100] Haifeng Wang, Yan Fu, Phyllis Zickmund, Riyi Shi, and Ji-Xin Cheng. Coherent anti-stokes raman scattering imaging of axonal myelin in live spinal tissues. *Biophysical journal*, 89(1) :581–591, 2005.
- [101] Terry B Huff and J-X Cheng. In vivo coherent anti-stokes raman scattering imaging of sciatic nerve tissue. *Journal of microscopy*, 225(2) :175–182, 2007.
- [102] Yan Fu, T Brandon Huff, Han-Wei Wang, Haifeng Wang, and Ji-Xin Cheng. Ex vivo and in vivo imaging of myelin fibers in mouse brain by coherent anti-stokes raman scattering microscopy. *Optics express*, 16(24) :19396–19409, 2008.
- [103] Francis P Henry, Daniel Côté, Mark A Randolph, Esther AZ Rust, Robert W Redmond, Irene E Kochevar, Charles P Lin, and Jonathan M Winograd. Real-time in vivo assessment of the nerve microenvironment with coherent anti-stokes raman scattering microscopy. *Plastic and reconstructive surgery*, 123(2S) :123S–130S, 2009.
- [104] E Bélanger, FP Henry, R Vallée, MA Randolph, IE Kochevar, JM Winograd, CP Lin, and D Côté. In vivo evaluation of demyelination and remyelination in a nerve crush injury model. *Biomedical optics express*, 2(9) :2698–2708, 2011.

- [105] Conor L Evans, Xiaoyin Xu, Santosh Kesari, X Sunney Xie, Stephen TC Wong, and Geoffrey S Young. Chemically-selective imaging of brain structures with cars microscopy. *Optics express*, 15(19) :12076–12087, 2007.
- [106] Raphaël Turcotte, Danette J Rutledge, Erik Bélanger, Dorothy Dill, Wendy B Macklin, and Daniel C Côté. Intravital assessment of myelin molecular order with polarimetric multiphoton microscopy. *Scientific reports*, 6 :31685, 2016.
- [107] F Kajzar and J Messier. Third-harmonic generation in liquids. *Physical Review A*, 32(4) :2352, 1985.
- [108] Jerome Mertz. *Introduction to optical microscopy*. Cambridge University Press, 2019.
- [109] Nicolas Olivier. *Mécanismes de contraste et contrôle du front d'onde en microscopie non linéaire cohérente*. PhD thesis, 2009.
- [110] Ji-Xin Cheng and X Sunney Xie. Green's function formulation for third-harmonic generation microscopy. *JOSA B*, 19(7) :1604–1610, 2002.
- [111] Nicolas Olivier and Emmanuel Beaurepaire. Third-harmonic generation microscopy with focus-engineered beams : a numerical study. *Optics express*, 16(19) :14703–14715, 2008.
- [112] B Richards and E Wolf. Electromagnetic diffraction in optical systems, ii. structure of the image field in an aplanatic system. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 253(1274) :358–379, 1959.
- [113] Lukas Novotny and Bert Hecht. *Principles of nano-optics*. Cambridge university press, 2012.
- [114] RW Terhune, PD Maker, and CM Savage. Optical harmonic generation in calcite. *Physical Review Letters*, 8(10) :404, 1962.
- [115] PD Maker and RW Terhune. Study of optical effects due to an induced polarization third order in the electric field strength. *Physical Review*, 137(3A) :A801, 1965.
- [116] GHC New and JF Ward. Optical third-harmonic generation in gases. *Physical Review Letters*, 19(10) :556, 1967.



- 
- [117] JF Ward and GHC New. Optical third harmonic generation in gases by a focused laser beam. *Physical Review*, 185(1) :57, 1969.
- [118] Paul P Bey, John F Giuliani, and Herbert Rabin. Generation of a phase-matched optical third harmonic by introduction of anomalous dispersion into a liquid medium. *Physical Review Letters*, 19(15) :819, 1967.
- [119] Andrew C Millard, Paul W Wiseman, David N Fittinghoff, Kent R Wilson, Jeffrey A Squier, and Michiel Müller. Third-harmonic generation microscopy by use of a compact, femtosecond fiber laser source. *Applied optics*, 38(36) :7393–7397, 1999.
- [120] Florent Aptel, Nicolas Olivier, Ariane Deniset-Besseau, Jean-Marc Legeais, Karsten Plamann, Marie-Claire Schanne-Klein, and Emmanuel Beaurepaire. Multimodal nonlinear imaging of the human cornea. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(5) :2459–2465, 2010.
- [121] Nicolas Olivier, Miguel A Luengo-Oroz, Louise Duloquin, Emmanuel Faure, Thierry Savy, Israël Veilleux, Xavier Solinas, Delphine Débarre, Paul Bourguine, Andrés Santos, et al. Cell lineage reconstruction of early zebrafish embryos using label-free nonlinear microscopy. *Science*, 329(5994) :967–971, 2010.
- [122] Bettina Weigelin, Gert-Jan Bakker, and Peter Friedl. Third harmonic generation microscopy of cells and tissue organization. *J Cell Sci*, 129(2) :245–255, 2016.
- [123] Steffen Dietzel, Joachim Pircher, A Katharina Nekolla, Mazhar Gull, André W Brändli, Ulrich Pohl, and Markus Rehberg. Label-free determination of hemodynamic parameters in the microcirculation with third harmonic generation microscopy. *PloS one*, 9(6) :e99615, 2014.
- [124] Che-Hang Yu, Shih-Peng Tai, Chun-Ta Kung, Wen-Jeng Lee, Yi-Fan Chan, Hsiang-Lin Liu, Jiun-Yi Lyu, and Chi-Kuang Sun. Molecular third-harmonic-generation microscopy through resonance enhancement with absorbing dye. *Optics letters*, 33(4) :387–389, 2008.
- [125] D Yelin, Y Silberberg, Y Barad, and JS Patel. Depth-resolved imaging of nematic liquid crystals by third-harmonic microscopy. *Applied physics letters*, 74(21) :3107–3109, 1999.
- [126] Jun-ichi Kosugi and Kotaro Kajikawa. Phase-matched third-harmonic generation from nematic liquid crystals. *Applied physics letters*, 84(24) :5013–5015, 2004.

- [127] Rajesh S Pillai, Masahito Oh-e, Hiroshi Yokoyama, GJ Brakenhoff, and Michiel Müller. Imaging colloidal particle induced topological defects in a nematic liquid crystal using third harmonic generation microscopy. *Optics express*, 14(26) :12976–12983, 2006.
- [128] Dan Oron, Eran Tal, and Yaron Silberberg. Depth-resolved multiphoton polarization microscopy by third-harmonic generation. *Optics letters*, 28(23) :2315–2317, 2003.
- [129] V Nucciotti, C Stringari, L Sacconi, F Vanzi, L Fusi, M Linari, G Piazzesi, V Lombardi, and FS Pavone. Probing myosin structural conformation in vivo by second-harmonic generation microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(17) :7763–7768, 2010.
- [130] Ji-Xin Cheng, Sophie Pautot, David A Weitz, and X Sunney Xie. Ordering of water molecules between phospholipid bilayers visualized by coherent anti-stokes raman scattering microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(17) :9826–9830, 2003.
- [131] Paulina Gasecka, Alexandre Jaouen, Fatma-Zohra Bioud, Hilton B De Aguiar, Julien Duboisset, Patrick Ferrand, Herve Rigneault, Naveen K Balla, Franck Debarbieux, and Sophie Brasselet. Lipid order degradation in autoimmune demyelination probed by polarized coherent raman microscopy. *Biophysical journal*, 113(7) :1520–1530, 2017.
- [132] VV Yakovlev and SV Govorkov. Diagnostics of surface layer disordering using optical third harmonic generation of a circular polarized light. *Applied Physics Letters*, 79(25) :4136–4138, 2001.
- [133] Maxwell Zimmerley, Pierre Mahou, Delphine Débarre, Marie-Claire Schanne-Klein, and Emmanuel Beaurepaire. Probing ordered lipid assemblies with polarized third-harmonic-generation microscopy. *Physical Review X*, 3(1) :011002, 2013.
- [134] Marc D Levenson and SS Kano. Introduction to nonlinear laser spectroscopy,(1982).
- [135] Alfons Penzkofer, F Ossig, and P Qiu. Picosecond third-harmonic light generation in calcite. *Applied Physics B*, 47(1) :71–81, 1988.
- [136] Kane Yee. Numerical solution of initial boundary value problems involving maxwell’s equations in isotropic media. *IEEE Transactions on antennas and propagation*, 14(3) :302–307, 1966.

- [137] AD Bangham, Malcolm M Standish, and Jeff C Watkins. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of molecular biology*, 13(1) :238–IN27, 1965.
- [138] Danielle Tokarz, Richard Cisek, Serguei Krouglov, Lukas Kontenis, Ulrich Fekl, and Virginijus Barzda. Molecular organization of crystalline  $\beta$ -carotene in carrots determined with polarization-dependent second and third harmonic generation microscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(14) :3814–3822, 2014.
- [139] Godofredo Bautista, Simon G Pfisterer, Mikko J Huttunen, Sanjeev Ranjan, Kristiina Kanerva, Elina Ikonen, and Martti Kauranen. Polarized thg microscopy identifies compositionally different lipid droplets in mammalian cells. *Biophysical journal*, 107(10) :2230–2236, 2014.
- [140] David Wu, Jonathan B Freund, Scott E Fraser, and Julien Vermot. Mechanistic basis of otolith formation during teleost inner ear development. *Developmental cell*, 20(2) :271–278, 2011.
- [141] Chi-Hsiang Lien, Karissa Tilbury, Shean-Jen Chen, and Paul J Campagnola. Precise, motion-free polarization control in second harmonic generation microscopy using a liquid crystal modulator in the infinity space. *Biomedical optics express*, 4(10) :1991–2002, 2013.
- [142] Patrick Stoller, Karen M Reiser, Peter M Celliers, and Alexander M Rubenchik. Polarization-modulated second harmonic generation in collagen. *Biophysical journal*, 82(6) :3330–3342, 2002.
- [143] Matthias Hofer, Naveen K Balla, and Sophie Brasselet. High-speed polarization-resolved coherent raman scattering imaging. *Optica*, 4(7) :795–801, 2017.
- [144] Emma L DeWalt, Victoria J Begue, Judith A Ronau, Shane Z Sullivan, Chittaranjan Das, and Garth J Simpson. Polarization-resolved second-harmonic generation microscopy as a method to visualize protein-crystal domains. *Acta Crystallographica Section D : Biological Crystallography*, 69(1) :74–81, 2013.
- [145] Yuji Tanaka, Eiji Hase, Shuichiro Fukushima, Yuki Ogura, Toyonobu Yamashita, Tetsuji Hirao, Tsutomu Araki, and Takeshi Yasui. Motion-artifact-robust, polarization-resolved second-harmonic-generation microscopy based on rapid polarization switching

- with electro-optic pockells cell and its application to in vivo visualization of collagen fiber orientation in human facial skin. *Biomedical optics express*, 5(4) :1099–1113, 2014.
- [146] Junichi Kaneshiro, Tomonobu M Watanabe, Hideaki Fujita, and Taro Ichimura. Full control of polarization state with a pair of electro-optic modulators for polarization-resolved optical microscopy. *Applied optics*, 55(5) :1082–1089, 2016.
- [147] Guillaume Ducourthial, Jean-sébastien Affagard, Margaux Schmeltz, Xavier Solinas, Maeva Lopez-Poncelas, Christelle Bonod-Bidaud, Ruth Rubio-Amador, Florence Ruggiero, Jean-Marc Allain, Emmanuel Beaurepaire, et al. Monitoring dynamic collagen reorganization during skin stretching with fast polarization-resolved second harmonic generation imaging. *Journal of biophotonics*, 12(5) :e201800336, 2019.
- [148] Xi-Lin Wang, Yongnan Li, Jing Chen, Cheng-Shan Guo, Jianping Ding, and Hui-Tian Wang. A new type of vector fields with hybrid states of polarization. *Optics express*, 18(10) :10786–10795, 2010.
- [149] Erik Bélanger, Raphaël Turcotte, Amy Daradich, Grégory Sadetsky, Pierre Gravel, Karine Bachand, Yves De Koninck, and Daniel C Côté. Maintaining polarization in polarimetric multiphoton microscopy. *Journal of biophotonics*, 8(11-12) :884–888, 2015.
- [150] Sotiris Psilodimitrakopoulos, Ivan Amat-Roldan, Susana Santos, Manoj Mathew, Anisha Thayil KN, Dobryna Zalvidea, David Artigas, and Pablo Loza-Alvarez. Starch granules as a probe for the polarization at the sample plane of a high resolution multiphoton microscope. In *Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences VIII*, volume 6860, page 68600E. International Society for Optics and Photonics, 2008.
- [151] S-W Chu, I-H Chen, T-M Liu, C-K Sun, S-P Lee, B-L Lin, P-C Cheng, M-X Kuo, D-J Lin, and H-L Liu. Nonlinear bio-photonic crystal effects revealed with multimodal nonlinear microscopy. *Journal of microscopy*, 208(3) :190–200, 2002.
- [152] Zong-Yan Zhuo, Chien-Sheng Liao, Chen-Han Huang, Jiun-Yann Yu, Yu-Yi Tzeng, Wen Lo, Chen-Yuan Dong, Hsiang-Chen Chui, Yu-Chan Huang, Hsi-Mei Lai, et al. Second harmonic generation imaging—a new method for unraveling molecular information of starch. *Journal of structural biology*, 171(1) :88–94, 2010.

- 
- [153] Aurélien Lorin, Christelle Flore, Annick Thomas, and Robert Brasseur. Les liposomes : description, fabrication et applications. *BASE*, 2004.
- [154] Richard Mark White, Anna Sessa, Christopher Burke, Teresa Bowman, Jocelyn LeBlanc, Craig Ceol, Caitlin Bourque, Michael Dovey, Wolfram Goessling, Caroline Erter Burns, et al. Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell stem cell*, 2(2) :183–189, 2008.
- [155] Greg J Hermann, Lena K Schroeder, Caroline A Hieb, Aaron M Kershner, Beverley M Rabbitts, Paul Fonarev, Barth D Grant, and James R Priess. Genetic analysis of lysosomal trafficking in *caenorhabditis elegans*. *Molecular biology of the cell*, 16(7) :3273–3288, 2005.
- [156] ZF Altun and DH Hall. Wormatlas. URL <http://www.wormatlas.org>, 1384, 2002.
- [157] Barbara Le Bras, Elli Chatzopoulou, Katharina Heydon, Salvador Martinez, Katzuhiko Ikenaka, Laetitia Prestoz, Nathalie Spassky, Bernard Zalc, and Jean-Leon Thomas. Oligodendrocyte development in the embryonic brain : the contribution of the plp lineage. *International Journal of Developmental Biology*, 49(2-3) :209–220, 2003.
- [158] Clare E Buckley, Paul Goldsmith, and Robin JM Franklin. Zebrafish myelination : a transparent model for remyelination? *Disease models & mechanisms*, 1(4-5) :221–228, 2008.
- [159] Tim Czopka. Insights into mechanisms of central nervous system myelination using zebrafish. *Glia*, 64(3) :333–349, 2016.
- [160] Marnie A Preston and Wendy B Macklin. Zebrafish as a model to investigate cns myelination. *Glia*, 63(2) :177–193, 2015.
- [161] M D’Rozario, KR Monk, and SC Petersen. Analysis of myelinated axon formation in zebrafish. In *Methods in cell biology*, volume 138, pages 383–414. Elsevier, 2017.
- [162] Hae-Chul Park, Amit Mehta, Joanna S Richardson, and Bruce Appel. *olig2* is required for zebrafish primary motor neuron and oligodendrocyte development. *Developmental biology*, 248(2) :356–368, 2002.
- [163] Tim Czopka, David A Lyons, et al. Individual oligodendrocytes have only a few hours in which to generate new myelin sheaths in vivo. *Developmental cell*, 25(6) :599–609, 2013.

- [164] Clare E Buckley, Anita Marguerie, Wendy K Alderton, and Robin JM Franklin. Temporal dynamics of myelination in the zebrafish spinal cord. *Glia*, 58(7) :802–812, 2010.
- [165] Mika Yoshida and Wendy B Macklin. Oligodendrocyte development and myelination in gfp-transgenic zebrafish. *Journal of neuroscience research*, 81(1) :1–8, 2005.
- [166] Bruce Mendelson. Soma position is correlated with time of development in three types of identified reticulospinal neurons. *Developmental biology*, 112(2) :489–493, 1985.
- [167] Brandon B Kirby, Norio Takada, Andrew J Latimer, Jimann Shin, Thomas J Carney, Robert N Kelsh, and Bruce Appel. In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development. *Nature neuroscience*, 9(12) :1506, 2006.
- [168] Sigrid Mensch, Marion Baraban, Rafael Almeida, Tim Czopka, Jessica Ausborn, Abdeljabbar El Manira, and David A Lyons. Synaptic vesicle release regulates myelin sheath number of individual oligodendrocytes in vivo. *Nature neuroscience*, 18(5) :628, 2015.
- [169] Andrea Zangari, Davide Micheli, Roberta Galeazzi, and Antonio Tozzi. Node of ranvier as an array of bio-nanoantennas for infrared communication in nerve tissue. *Scientific reports*, 8(1) :539, 2018.
- [170] Jan Voogd. The human cerebellum. *Journal of chemical neuroanatomy*, 26(4) :243–252, 2003.
- [171] Martina Novotna, M Mateo Paz Soldán, Nuhad Abou Zeid, Nilufer Kale, Melih Tutuncu, Daniel J Crusan, Elizabeth J Atkinson, Aksel Siva, B Mark Keegan, Istvan Pirko, et al. Poor early relapse recovery affects onset of progressive disease course in multiple sclerosis. *Neurology*, 85(8) :722–729, 2015.
- [172] Brian G Weinshenker, GPA Rice, JH Noseworthy, W Carriere, J Baskerville, and GC Ebers. The natural history of multiple sclerosis : a geographically based study : 3. multivariate analysis of predictive factors and models of outcome. *Brain*, 114(2) :1045–1056, 1991.
- [173] VM Anderson, CAM Wheeler-Kingshott, K Abdel-Aziz, DH Miller, A Toosy, AJ Thompson, and O Ciccarelli. A comprehensive assessment of cerebellar damage in multiple scler-



- rosis using diffusion tractography and volumetric analysis. *Multiple Sclerosis Journal*, 17(9) :1079–1087, 2011.
- [174] Doron Merkler, Robert Böscke, Barthel Schmelting, Boldizsár Czéh, Eberhard Fuchs, Wolfgang Brück, and Christine Stadelmann. Differential macrophage/microglia activation in neocortical eae lesions in the marmoset monkey. *Brain pathology*, 16(2) :117–123, 2006.
- [175] Shannon D Shields, Xiaoyang Cheng, Andreas Gasser, Carl Y Saab, Lynda Tyrrell, Emmanuella M Eastman, Masashi Iwata, Pamela J Zwinger, Joel A Black, Sulayman D Dib-Hajj, et al. A channelopathy contributes to cerebellar dysfunction in a model of multiple sclerosis. *Annals of neurology*, 71(2) :186–194, 2012.
- [176] Aleksandar Denic, Aaron J Johnson, Allan J Bieber, Arthur E Warrington, Moses Rodriguez, and Istvan Pirko. The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology*, 18(1) :21–29, 2011.
- [177] JM Anderson, DW Hampton, R Patani, G Pryce, RA Crowther, R Reynolds, RJM Franklin, G Giovannoni, DAS Compston, D Baker, et al. Abnormally phosphorylated tau is associated with neuronal and axonal loss in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Brain*, 131(7) :1736–1748, 2008.
- [178] Alessandra Di Penta, Beatriz Moreno, Stephanie Reix, Begona Fernandez-Diez, Maite Villanueva, Oihana Errea, Nagore Escala, Koen Vandebroek, Joan X Comella, and Pablo Villoslada. Oxidative stress and proinflammatory cytokines contribute to demyelination and axonal damage in a cerebellar culture model of neuroinflammation. *PLoS one*, 8(2) :e54722, 2013.
- [179] Thomas Skripuletz, Viktoria Gudi, Diane Hackstette, and Martin Stangel. De-and remyelination in the cns white and grey matter induced by cuprizone : the old, the new, and the unexpected. *Histology and histopathology*, Vol. 26, n<sup>o</sup>12 (2011), 2011.
- [180] Frédéric Doussau, Jean-Luc Dupont, Dorine Neel, Aline Schneider, Bernard Poulain, and Jean Louis Bossu. Organotypic cultures of cerebellar slices as a model to investigate demyelinating disorders. *Expert opinion on drug discovery*, 12(10) :1011–1022, 2017.
- [181] Isabelle Dusart, Matti S Airaksinen, and Constantino Sotelo. Purkinje cell survival and

- axonal regeneration are age dependent : an in vitro study. *Journal of Neuroscience*, 17(10) :3710–3726, 1997.
- [182] RICHARD Reynolds and GRAHAM P Wilkin. Development of macroglial cells in rat cerebellum. ii. an in situ immunohistochemical study of oligodendroglial lineage from precursor to mature myelinating cell. *Development*, 102(2) :409–425, 1988.
- [183] TD Bird, DF Farrell, and SM Sumi. Brain lipid composition of the shiverer mouse :(genetic defect in myelin development). *Journal of neurochemistry*, 31(1) :387–391, 1978.
- [184] P Dupouey, C Jacque, JM Bourre, F Cesselin, A Privat, and N Baumann. Immunochemical studies of myelin basic protein in shiverer mouse devoid of major dense line of myelin. *Neuroscience letters*, 12(1) :113–118, 1979.
- [185] J Rosenbluth. Peripheral myelin in the mouse mutant shiverer. *Journal of Comparative Neurology*, 193(3) :729–739, 1980.
- [186] Taichi Nomura, Yoshio Bando, Hiroki Bochimoto, Daisuke Koga, Tsuyoshi Watanabe, and Shigetaka Yoshida. Three-dimensional ultra-structures of myelin and the axons in the spinal cord : application of sem with the osmium maceration method to the central nervous system in two mouse models. *Neuroscience research*, 75(3) :190–197, 2013.
- [187] Dimitre G Ouzounov, Tianyu Wang, Mengran Wang, Danielle D Feng, Nicholas G Horton, Jean C Cruz-Hernández, Yu-Ting Cheng, Jacob Reimer, Andreas S Tolia, Nozomi Nishimura, et al. In vivo three-photon imaging of activity of gcamp6-labeled neurons deep in intact mouse brain. *Nature methods*, 14(4) :388, 2017.
- [188] Lamiae Abdeladim, Katherine S Matho, Solène Clavreul, Pierre Mahou, Jean-Marc Sintes, Xavier Solinas, Ignacio Arganda-Carreras, Stephen G Turney, Jeff W Lichtman, Anatole Chessel, et al. Multicolor multiscale brain imaging with chromatic multiphoton serial microscopy. *Nature communications*, 10(1) :1662, 2019.
- [189] G Omar Clay, Andrew C Millard, Chris B Schaffer, Juerg Aus-der Au, Philbert S Tsai, Jeffrey A Squier, and David Kleinfeld. Spectroscopy of third-harmonic generation : evidence for resonances in model compounds and ligated hemoglobin. *JOSA B*, 23(5) :932–950, 2006.

- [190] Pierre Mahou, Nicolas Olivier, Guillaume Labroille, Louise Duloquin, Jean-Marc Sintes, Nadine Peyri eras, Renaud Legouis, Delphine D ebarre, and Emmanuel Beaurepaire. Combined third-harmonic generation and four-wave mixing microscopy of tissues and embryos. *Biomedical optics express*, 2(10) :2837–2849, 2011.

**Titre :** Microscopie par génération de troisième harmonique résolue en polarisation pour l'imagerie de la myéline et des biocristaux

**Mots clés :** Microscopie non-linéaire, Microscopie THG, Polarisation, Myéline, Biocristal

**Résumé :** Cette thèse s'intéresse à l'imagerie multiphotonique par génération de troisième harmonique (THG) combinée à des mesures résolues en polarisation (PTHG) sur des systèmes biologiques pour accéder à des informations complémentaires sur la morphologie et la microstructure de structures anisotropes. Une première application vise à extraire des informations de la gaine de myéline qui est la gaine lipidique entourant les axones du système nerveux central (CNS) des vertébrés, et dont la destruction dans des pathologies comme la sclérose en plaques est à l'origine de perturbations dans la propagation des influx nerveux. Une seconde application concerne les biocristaux, dont nous traiterons ici l'exemple de l'otolithe situé dans l'oreille interne du poisson-zèbre. Grâce à sa forte sensibilité aux discontinuités des propriétés optiques et à l'anisotropie des matériaux, la microscopie THG apparaît comme un outil de choix pour visualiser ces deux structures biologiques non-marquées avec une résolution submicrométrique.

Dans ce manuscrit, nous présentons d'abord un travail fondamental de caractérisation analytique, numérique (modèle FDTD) et expérimentale de la réponse PTHG sur des structures modèles. Nous avons notamment mis en évidence la présence d'aberrations de la réponse PTHG au voisinage d'interfaces parallèles à l'axe de propagation du faisceau d'excitation induites par des désaccords d'indices. L'évaluation de la modulation artefactuelle induite par ces aberrations a permis d'interpréter la composante de modulation PTHG sur ces interfaces associée à l'ordre moléculaire dans des structures lipidiques modèles. Ensuite, nous décrivons la mise en place d'un dispositif d'acquisition PTHG rapide dédié à l'imagerie *in vivo* de structures biologiques. Nous présentons de nouvelles applications biologiques de la microscopie PTHG en utilisant une méthode d'analyse des signaux THG polarimétriques par transformée de Fourier. Enfin, nous présentons une étude systématique de caractérisation des contrastes THG/PTHG sur les fibres myélinisées du CNS de poisson-zèbres et de souris.

**Title :** Polarization-resolved third harmonic generation microscopy for myelin and biocrystals imaging

**Keywords :** Nonlinear microscopy, THG microscopy, Polarization, Myelin, Biocrystal

**Abstract :** This thesis focuses on multiphoton imaging by third harmonic generation (THG) combined with polarization resolved measurements (PTHG) on biological systems to access additional information on the morphology and microstructure of anisotropic structures. A first application aims at extracting information from the myelin sheath which is a ubiquitous lipid structure of the central nervous system (CNS) of vertebrates whose destruction in the pathology of multiple sclerosis causes disturbances in the propagation of nerve impulses. A second application concerns biocrystals, of which we will deal here with the example of the otolith located in the inner ear of the zebrafish. Thanks to its high sensitivity to discontinuities in optical properties and to the anisotropy of materials, THG microscopy appears to be a tool of choice for visualizing these unlabelled biological structures with submicrometric resolution.

We first present a fundamental analytical, numerical (FDTD model) and experimental characterization of the PTHG response on model structures. In particular, we highlighted the presence of aberrations of the PTHG response in the vicinity of interfaces parallel to the excitation beam propagation axis induced by index mismatches. The evaluation of the artifactual modulation induced by these aberrations allowed the interpretation of the PTHG modulation component at these interfaces associated with the molecular order in model lipid structures. Next, we describe the implementation of a fast PTHG acquisition device dedicated to *in vivo* imaging of biological structures. We present new biological applications of PTHG microscopy using a Fourier Transform Polarimetric THG (FT-PTHG) signal analysis method. Finally, we present a systematic characterization study of THG/PTHG contrasts on myelinated CNS fibers from zebrafish and mice.