



Génération de seconde harmonique par le collagène et application à l'étude de fibres par microscopie multiphoton.

Ana-Maria Pena

► To cite this version:

Ana-Maria Pena. Génération de seconde harmonique par le collagène et application à l'étude de fibres par microscopie multiphoton.. Biophysique [physics.bio-ph]. Ecole Polytechnique X, 2006. Français. NNT : . pastel-00002033

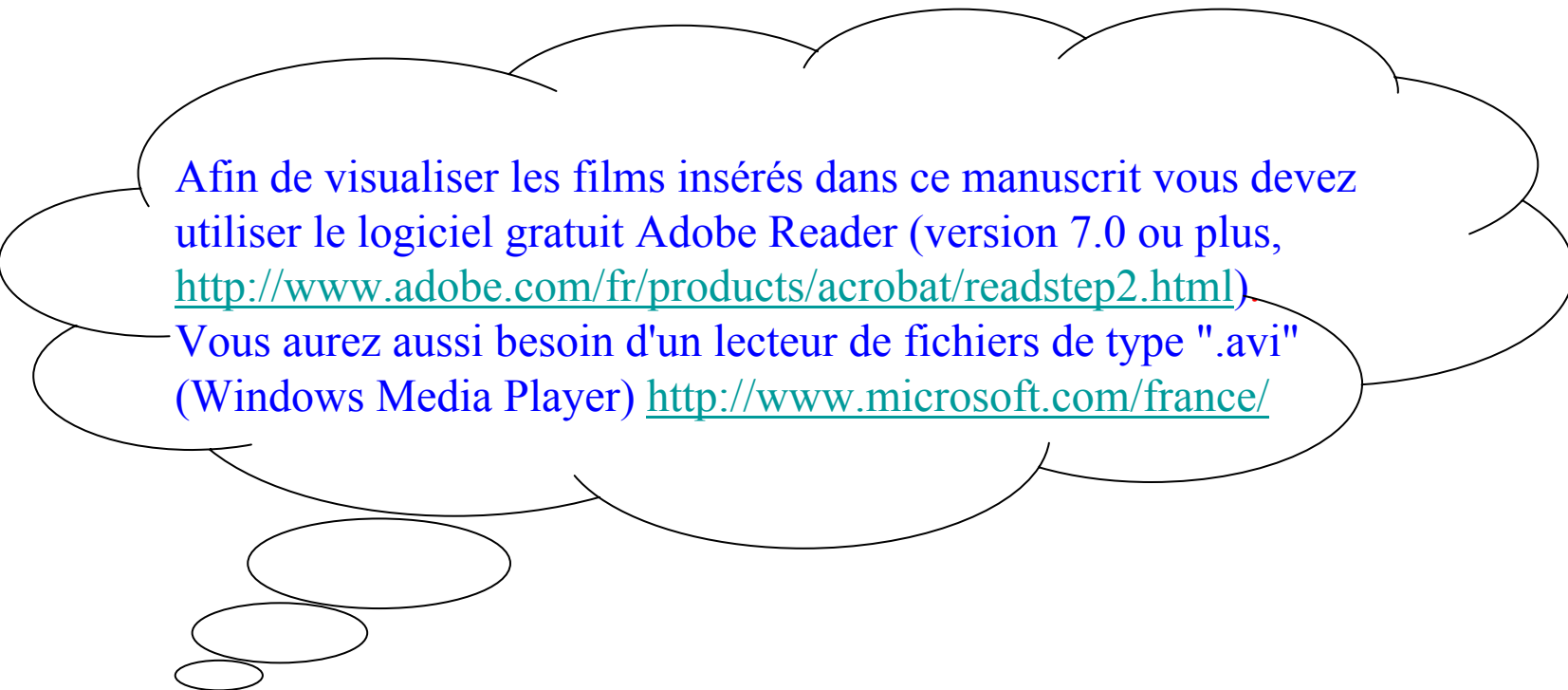
HAL Id: pastel-00002033

<https://pastel.hal.science/pastel-00002033>

Submitted on 28 Jul 2010

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.



Afin de visualiser les films insérés dans ce manuscrit vous devez utiliser le logiciel gratuit Adobe Reader (version 7.0 ou plus, <http://www.adobe.com/fr/products/acrobat/readstep2.html>).

Vous aurez aussi besoin d'un lecteur de fichiers de type ".avi" (Windows Media Player) <http://www.microsoft.com/france/>

Attention !

Thèse de doctorat de l'École Polytechnique

SPÉCIALITÉ : BIOPHYSIQUE

Génération de seconde harmonique par le collagène et application à l'étude de fibres par microscopie multiphoton

présentée par

ANA-MARIA PENA

pour obtenir le titre de **Docteur de l'École Polytechnique**

soutenue le 14 septembre 2006 devant le Jury composé de

Pr. André PERSOONS	Président
Dr. Geneviève BOURG-HECKLY	Rapporteur
Dr. Laurent BOURDIEU	Rapporteur
Dr. Marie-Claire SCHANNE-KLEIN	Directrice de thèse
Pr. Bruno CRESTANI	
Pr. Jean-Louis MARTIN	

Thèse effectuée au

LABORATOIRE D'OPTIQUE ET BIOSCIENCES
CNRS UMR 7645 - INSERM U696 -École Polytechnique

Remerciements

Le travail présenté dans ce manuscrit a été effectué au sein du Laboratoire d'Optique et Biosciences à l'Ecole Polytechnique. Je tiens tout d'abord à remercier Jean-Louis Martin de m'y avoir accueillie et de m'avoir donné les moyens de travailler dans d'excellentes conditions.

Je remercie chaleureusement ma directrice de thèse, Marie-Claire Schanne-Klein, qui m'a donné l'occasion de travailler sur un sujet très passionnant. J'ai beaucoup appris en travaillant à tes côtés et je te remercie pour ton efficacité, tes conseils et ton soutien aux moments difficiles. Je te remercie également pour toutes les demandes de financements que tu as fait afin que je puisse mener à bien cette thèse. Ces démarches ont été fructueuses et je remercie donc la Fondation pour la Recherche Médicale de m'avoir accordé la bourse de fin de thèse.

Je souhaite également remercier les membres du jury, Geneviève Bourg-Heckly, Laurent Bourdieu, Bruno Crestani et André Persoons, qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail. Merci à André Persoons d'avoir accepté de présider ce jury et à Geneviève Bourg-Heckly et Laurent Bourdieu qui ont accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit.

Une grande partie de ce travail représente le fruit de collaborations avec les équipes de recherche de Pierre-Louis Tharaux à l'Hôpital Tenon / Inserm U702 et de Bruno Crestani à l'Hôpital Bichat-Claude Bernard / Inserm U700. Je tiens donc les remercier d'avoir accepté d'entamer ces collaborations qui ont porté sur l'étude des fibroses rénales et pulmonaires. J'ai eu beaucoup de plaisir au cours de cette thèse à pouvoir interagir avec Emmanuel Beaurepaire et François Hache dont les compétences scientifiques et techniques m'ont permis d'avancer dans mes recherches. C'est un plaisir d'exprimer toute ma gratitude à Xavier Solinas pour les travaux d'électroniques, à Jean-Marc Sintès et Marcel Bierry pour les travaux de mécaniques, à André Campos pour l'informatique et aux secrétaires du laboratoire, Christelle Français et Laure Lachapelle. Merci pour votre gentillesse et votre bonne humeur de tous les jours !

Je remercie chaleureusement les personnes avec lesquelles j'ai été très heureuse de partager le bureau : Delphine (ma collègue de rédaction !), Willy, Edward et Nicolas. Bonne chance pour la suite ! Un grand merci à ceux qui ont eu la gentillesse de lire mon manuscrit et dont les remarques constructives m'ont permis de l'améliorer : Delphine, Michel, Nora, Emmanuel et François. Je tiens aussi à remercier les étudiants avec lesquels j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler : Thierry Boulesteix, Thibault Dartigalongue, Delphine Débarre, Monica Hernest et Mathias Strupler. Merci à l'ensemble de membres du laboratoire pour leur accueil et leur bonne humeur. Bonne recherche à tous !

Merci à mes amis ! Je remercie de tout coeur ma mère, mon frère, ma grand-mère et les autres membres de ma famille qui m'ont beaucoup soutenue ! Un tendre merci à Funji, qui m'a accompagnée durant ces années, et à sa famille. Merci pour votre soutien, vos encouragements et votre présence.

Table des matières

Introduction	1
1 L'imagerie multimodale multiphoton	3
1.1 Principe et avantages de la microscopie multiphoton	3
1.2 Dispositif expérimental	10
2 Signaux optiques non-linéaires endogènes	15
2.1 Origine des signaux endogènes non-linéaires	15
2.2 Imagerie multiphoton des artères	21
2.3 Imagerie multiphoton de la peau	27
2.4 Étude de la kératine - protéine de l'épiderme humain	31
2.4.1 Théorie et principe de l'expérience	32
2.4.2 Résultats expérimentaux	35
2.5 Conclusion	41
3 Génération de seconde harmonique par le collagène	43
3.1 Structure et assemblage des collagènes I et IV	44
3.2 Aspects théoriques de la SHG en surface	47
3.2.1 Rappels sur l'activité optique et les effets non-linéaires	47
3.2.1.1 Activité optique linéaire	48
3.2.1.2 Effets non-linéaires d'ordre 2 et activité optique	50
3.2.2 Génération de seconde harmonique en surface	51
3.2.3 Génération de seconde harmonique en surface résolue en polarisation	53
3.3 Principe des expériences	58
3.3.1 Préparation des films de collagène	58
3.3.2 Dispositifs expérimentaux	58
3.4 Résultats expérimentaux	61
3.4.1 Expériences de caractérisation	61
3.4.2 Activité optique de SHG des films minces des collagènes I et IV	64
3.5 Discussion	71
3.6 Conclusion	73

4	Imagerie multiphoton de la fibrose	75
4.1	Introduction	75
4.2	Protocoles expérimentaux. Quantification d'images	77
4.2.1	Protocoles expérimentaux	77
4.2.2	Principe de la quantification du signal SHG	79
4.3	Fibrose pulmonaire	80
4.3.1	Structure du poumon et modèle murin de fibrose pulmonaire. Préparation des échantillons	81
4.3.2	Résultats expérimentaux et discussion	84
4.3.2.1	Mise en évidence des signaux endogènes du poumon normal	84
4.3.2.2	Visualisation de l'architecture de la fibrose pulmonaire par SHG	94
4.3.2.3	Analyse quantitative du signal SHG - proposition des scores de fibrose	97
4.3.2.4	Imagerie multiphoton de la fibrose pulmonaire humaine idiopathique	102
4.3.3	Conclusions	102
4.4	Fibrose rénale	103
4.4.1	Structure du rein et modèle murin de fibrose rénale. Préparation des échantillons	105
4.4.2	Résultats expérimentaux et discussion	110
4.4.2.1	Imagerie multiphoton du rein normal et fibrosé	110
4.4.2.2	Caractérisation de la distribution de la fibrose rénale	117
4.4.2.3	Cartographie des facteurs (cellules/protéines) responsables de la fibrose	119
4.4.3	Conclusions et perspectives	125
4.5	Conclusion	126
	Conclusion	129

Introduction

La microscopie optique joue un rôle central en biologie en permettant de visualiser une grande variété de cellules et de tissus, notamment depuis l'apparition de la microscopie de fluorescence basée sur l'absorption à 1 photon. Cette technique est par contre limitée à des profondeurs de quelques dizaines de micromètres, car les propriétés diffusives des tissus biologiques brouillent l'image d'un objet enfoui en profondeur et la lumière d'excitation, dont l'intensité est augmentée pour atteindre des profondeurs plus importantes, endommage l'échantillon. La microscopie de fluorescence excitée à 2 photons (2PEF), basée sur une interaction non-linéaire entre la lumière et le tissu, permet de contourner en partie ces difficultés et de maintenir une résolution tridimensionnelle micrométrique lors de l'observation en profondeur d'un milieu optiquement diffusant.

Un autre avantage de la microscopie 2PEF réside dans la possibilité d'effectuer une imagerie combinant différents modes de contraste qui fournissent des informations complémentaires par rapport à l'imagerie de fluorescence, comme la génération de seconde harmonique (SHG) sensible à la non centrosymétrie du milieu ou la génération de troisième harmonique (THG) où un signal est obtenu pour toute hétérogénéité des propriétés optiques du milieu.

De plus, il est possible de visualiser la structure d'une cellule ou d'un tissu en utilisant des sources de contraste endogènes qui permettent une imagerie très peu invasive. Par exemple, la microscopie 2PEF permet de mettre en évidence différents fluorophores endogènes cellulaires ou des composants de la matrice extracellulaire tels que l'élastine et la kératine, la microscopie SHG permet de détecter le collagène fibrillaire ou les filaments de myosine dans les sarcomères et la microscopie THG permet d'observer sans marquage le développement embryonnaire de petits organismes. Du fait de ces avantages, les applications de la microscopie multiphoton sont très nombreuses et variées, dans des domaines comme les neurosciences, la cancérologie, l'embryologie,...

Cependant, des progrès sont encore nécessaires dans la compréhension des contrastes optiques non-linéaires endogènes observés dans les tissus. En effet, il est important de bien analyser toutes les caractéristiques physiques d'un signal afin de l'exploiter correctement. Dans ce contexte, la génération de seconde harmonique par le collagène fibrillaire soulevait différentes questions au début de ce travail, notamment sur la spécificité de la SHG en fonction du type de collagène et sur le rôle de sa structure chirale en triple hélice dans la forte amplitude des signaux observés.

Cette thèse est centrée sur l'étude du collagène, qui présente beaucoup d'intérêt pour les raisons suivantes : i) cette protéine a une structure en triple hélice très particulière et produit un

fort signal de seconde harmonique. Il est donc intéressant de comprendre l'origine de ce signal au niveau moléculaire, et notamment les effets liés à la chiralité, ii) le collagène représente 30 % du contenu total du corps humain en protéines et il est le constituant principal de la matrice extracellulaire d'une grande variété de tissus et d'organes. De ce fait, il est impliqué dans tout remodelage de la matrice extracellulaire et dans de nombreuses pathologies iii) actuellement, on manque d'outils performants pour visualiser l'architecture tridimensionnelle du collagène à l'échelle micrométrique. Dans ce contexte, la microscopie SHG est un outil prometteur pour visualiser la distribution du collagène dans les tissus.

Ce travail de thèse a débuté avec des expériences de génération de seconde harmonique en surface résolue en polarisation sur des films minces de molécules de collagène de type I et IV, qui nous ont permis de démontrer que la microscopie SHG est une sonde de l'organisation macromoléculaire du collagène et non pas du type de collagène. Nous avons appliqué ensuite ces résultats à l'étude des fibroses collagéniques pulmonaires et rénales dans des modèles murins. Ce travail répond au manque d'outils disponibles pour étudier cette accumulation pathologique de collagène fibrillaire qui peut conduire à une insuffisance rénale terminale ou à une insuffisance respiratoire souvent létale à terme.

Ce manuscrit est structuré de la façon suivante :

- Le chapitre 1 décrit le principe de la microscopie de fluorescence excitée à 2 photons et par génération de seconde harmonique et le dispositif expérimental que nous avons utilisé pour les expériences de microscopie.
- Les principales sources de contraste endogène pour la microscopie multiphoton, quelques applications pour l'étude des artères et de la peau, ainsi que la caractérisation spectroscopique des kératines épidermiques seront présentées dans le chapitre 2, afin d'illustrer les potentialités de cette technique.
- Le chapitre 3 répond à la question du rôle du type de collagène et de la chiralité dans la génération de seconde harmonique par le collagène.
- Le chapitre 4 présente les potentialités de la microscopie multiphoton pour l'étude de fibroses collagéniques pulmonaires et rénales.

Ces expériences sont le fruit des collaborations avec les équipes suivantes :

- **Pierre-Louis Tharaux et son équipe**, INSERM U702, Université Pierre et Marie Curie - Hôpital Tenon, Paris pour les expériences sur la fibrose rénale,
- **Bruno Crestani, Aurélie Fabre et Joëlle Marchal-Somme**, Services de pneumologie et Laboratoire d'anatomie-pathologique, Université Paris 7, Faculté de médecine X. Bichat - Hôpital Bichat-Claude Bernard, INSERM U700, Paris pour les expériences sur la fibrose pulmonaire,
- **Gervaise Mosser**, Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée, CNRS UMR 7574, Université Pierre et Marie Curie, Paris pour l'imagerie TEM et
- **Gaston Godeau** Laboratoire de physiopathologie des tissus non minéralisés, Université Paris V, Montrouge pour nous avoir fourni les coupes histologiques de peau.

Chapitre 1

L'imagerie multimodale multiphoton

Depuis quelques années la microscopie multiphoton a été largement utilisée pour répondre à différentes problématiques biologiques. Cette microscopie à balayage laser, initialement basée sur des signaux de fluorescence excitée à deux photons (2PEF) [Denk et al., 1990], s'est peu à peu généralisée à d'autres phénomènes optiques non-linéaires : la génération de seconde harmonique (SHG) [Zipfel et al., 2003a], technique qui avait été pourtant proposée [Sheppard and Kompfner, 1978] et démontrée [Roth and Freund, 1979, Freund and Deutsch, 1986] des années auparavant, la génération de troisième harmonique [Barad et al., 1997, Squier et al., 1998] et la diffusion Raman anti-Stokes stimulée (CARS) [Duncan et al., 1982], techniques développées plus récemment. La SHG et la 2PEF sont deux phénomènes optiques non-linéaires très différents : le premier repose sur la diffusion non-linéaire de la lumière, alors que le deuxième est basé sur l'absorption non-linéaire suivi d'une émission de fluorescence. Autrement dit, le premier est un phénomène cohérent, alors que le deuxième ne l'est pas. Les conséquences qui en découlent seront discutées ci-dessous. Nous allons commencer par présenter le principe de la microscopie multiphoton, ses avantages par rapport aux microscopies conventionnelles de fluorescence et ensuite nous allons décrire le dispositif expérimental.

1.1 Principe et avantages de la microscopie multiphoton

Nous allons tout d'abord présenter les principes de base et les avantages de la microscopie 2PEF, la forme la plus connue de microscopie non-linéaire, pour ensuite passer à la microscopie SHG.

Microscopie 2PEF

Ce type de microscopie repose sur l'utilisation d'une excitation non-linéaire pour produire une émission de fluorescence seulement au voisinage du point focal de l'objectif. Les microscopes de fluorescence conventionnels reposent sur l'excitation à un photon (1PE), c'est-à-dire qu'un

seul photon est nécessaire pour exciter une molécule fluorescente depuis son état fondamental (f) dans un état excité (e). Ce processus est schématisé sur la Fig. 1.1 (en haut à gauche), pour une molécule fluorescente considérée comme un système modèle à deux niveaux d'énergie. Une fois excitée, la molécule revient dans l'état fondamental le plus souvent par l'émission d'un

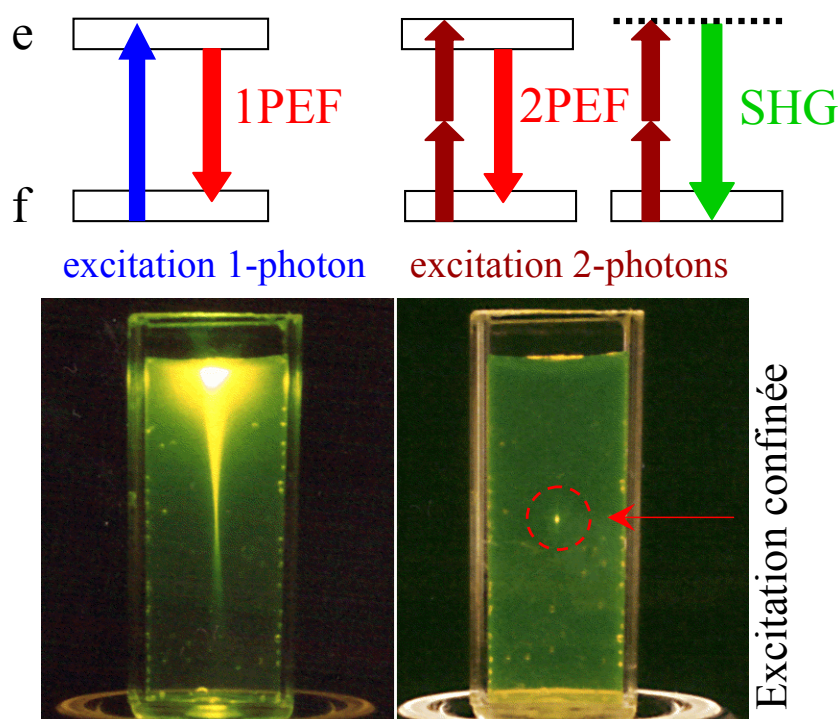


FIG. 1.1 – (haut) **Représentation d'un système modèle à deux niveaux d'énergie** : (gauche) excitation à 1 photon, (droite) excitation à 2 photons : 2PEF (fluorescence excitée à 2 photons), SHG (génération de seconde harmonique) ; (bas) **Distribution spatiale de l'excitation** dans le cas d'un phénomène d'absorption à 1 photon (gauche), respectivement 2 photons (droite) dans une solution de fluorescéine (image tirée de [Zipfel et al., 2003b]).

photon de fluorescence (1PEF). La détection de ce signal de fluorescence dénote la présence de la molécule et constitue le principe de base de la microscopie de fluorescence. L'excitation à 1 photon de la molécule a lieu si le photon incident possède une énergie plus grande ou égale à la différence d'énergie entre l'état excité et l'état fondamental. Le signal de fluorescence 1PEF émis dépendra linéairement de l'intensité d'excitation. Dans l'exemple de la Fig. 1.1 (en bas à gauche), on voit que le signal de fluorescence est créé non seulement au point focal, mais aussi tout au long du cône d'excitation. Ainsi, des filtres spatiaux doivent être utilisés pour localiser le signal de fluorescence provenant du point focal : c'est le principe de la microscopie confocale.

De la même façon, deux photons de même énergie peuvent simultanément être absorbés par la

molécule et produire une excitation équivalente à l'absorption d'un seul photon d'énergie double. C'est l'absorption à 2 photons (2PA), phénomène décrit par [Göppert-Mayer, 1931] et amplement détaillé par [Shen, 1984] et [Boyd, 2003]. La fluorescence créée est alors nommée **fluorescence excitée à 2 photons (2PEF)** (Fig. 1.1 en haut à droite), et ce signal varie avec le carré de l'intensité d'excitation. Cette dépendance non-linéaire en intensité d'excitation est à la base de la localisation tridimensionnelle du signal 2PEF (voir Fig. 1.1 en bas à droite) : l'absorption simultanée de deux photons ne peut avoir lieu que pour des intensités très importantes, c'est-à-dire au point focal, dans un volume d'excitation confiné. C'est le phénomène de "sectionnement optique" intrinsèque à la microscopie 2PEF.

La microscopie multiphoton présente plusieurs **avantages** par rapport à la microscopie conventionnelle (plein champ ou confocale), que nous allons présenter ci-dessous :

- profondeur de pénétration augmentée dans les tissus diffusants

La diffusion de la lumière visible par les tissus est le principal phénomène qui limite la profondeur d'observation en microscopie conventionnelle. Elle a pour effet de diminuer le nombre de photons de fluorescence provenant du point focal et d'augmenter le bruit de fond, car des photons créés en dehors du volume focal commencent à être détectés. Ainsi, en microscopie conventionnelle la diffusion dégrade le contraste et la résolution ce qui diminue fortement la profondeur d'imagerie. Au contraire, la microscopie non-linéaire permet de préserver la résolution à plus grande profondeur et cela pour les raisons suivantes : i) les longueurs d'onde utilisées en microscopie multiphoton, situées dans le proche infrarouge sont nettement moins diffusées et absorbées par les tissus que dans le cas de la microscopie conventionnelle (visible et proche UV), ce qui permet une meilleure pénétration dans les tissus ; ii) le caractère non-linéaire de l'excitation multiphoton préserve le confinement du volume d'excitation, donc la résolution, même en milieu diffusant (du moins jusqu'à une certaine profondeur qui dépend des propriétés optiques du tissu et du type de contraste, endogène ou exogène, utilisé). Par ailleurs, en microscopie multiphoton il y a peu de bruit de fond car les photons d'excitation diffusés excitent très peu ou pas du tout de fluorescence. L'absence de filtrage spatial permet en plus d'avoir une meilleure efficacité de collecte de la fluorescence, même pour les photons de fluorescence diffusés, car tous proviennent du point focal. Ainsi, la possibilité de visualiser des tissus biologiques intacts plus en profondeur, tout en gardant une résolution tridimensionnelle (3D) micrométrique, est un des avantages majeurs de la microscopie multiphoton.

- phototoxicité et photoblanchiment réduits

La cause principale de la phototoxicité est la formation d'espèces oxygénées réactives, suite à un transfert d'énergie non-radiatif par un chromophore cellulaire. Ces espèces oxygénées très toxiques pour les cellules provoquent rapidement la mort cellulaire, diminuant ainsi la possibilité de faire une imagerie de longue durée. En microscopie 2PEF, le confinement de l'excitation permet de restreindre les dommages optiques au niveau du volume focal, donc de réduire la phototoxicité. Le photoblanchiment des fluorophores est réduit pour les mêmes raisons.

- diversité des modes de contraste

La possibilité d'effectuer une imagerie combinant différents modes de contraste, notamment 2PEF et SHG est un grand avantage de la microscopie multiphoton. Plus récemment il a été démontré que cette technique peut aussi être combinée avec d'autres modes de contraste, comme la génération de troisième harmonique (THG) [Boyd, 2003, Chu et al., 2003, Sun et al., 2003, Barzda et al., 2005, Débarre et al., 2006] où un signal est obtenu pour toute hétérogénéité des propriétés optiques du milieu observé, ou la microscopie par diffusion Raman anti-Stokes stimulée (CARS - Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) sensible aux vibrations moléculaires [Boyd, 2003]. Ces modes de contraste ne seront pas abordés dans ce manuscrit, mais quelques exemples des images THG, qui montrent la compatibilité de ce contraste avec la 2PEF et la SHG, seront présentées dans le chapitre 4, dans le cadre de l'imagerie du poumon.

Nous allons décrire maintenant la génération de seconde harmonique (SHG), un phénomène non-linéaire particulièrement intéressant pour l'imagerie en milieu biologique.

Microscopie SHG

La génération de seconde harmonique est un processus cohérent du deuxième ordre où un milieu éclairé par un faisceau laser intense de fréquence ω , en général impulsionnel, crée une harmonique de fréquence 2ω [Boyd, 2003] sans phénomène d'absorption (voir la Fig. 1.1). Ce processus est lié, au niveau d'une molécule organique, à la présence d'électrons polarisables entre un groupement donneur (D) et un groupement accepteur (A) d'électrons (molécule non centrosymétrique de type "push-pull" ou octupolaire), et au niveau macroscopique, à la non centrosymétrie du milieu et à sa forte densité, qui assurent une construction cohérente efficace du signal.

a) Molécule isolée Considérons tout d'abord la génération de seconde harmonique d'une molécule isolée, vue comme un simple dipôle électrique. Si la molécule est symétrique (Fig. 1.2a en haut), son moment dipolaire est nul au repos. Lorsque la molécule est excitée par un champ électromagnétique, le nuage d'électrons oscillent de façon symétrique et le rayonnement diffusé sera à la fréquence ω de l'onde excitatrice : c'est la diffusion Rayleigh [Born and Wolf, 1980, Boyd, 2003]. Si la molécule est non centrosymétrique (Fig. 1.2a bas) le mouvement d'électrons sera disymétrique et le rayonnement diffusé contiendra, en plus de la composante habituelle de fréquence ω , des composantes non-linéaires aux fréquences 0 et 2ω . La composante non-linéaire à 2ω constitue la diffusion harmonique de la lumière. Ainsi la génération de seconde harmonique au niveau moléculaire, nécessite des molécules non centrosymétriques.

b) Deux molécules non centrosymétriques Au niveau macroscopique la SHG est très sensible à l'organisation macromoléculaire du milieu. Considérons le cas de deux molécules non centrosymétriques (Fig. 1.2b) alignées parallèlement et situées à une distance plus petite que la longueur d'onde. Dans ce cas, les rayonnements harmoniques créés par excitation à la fréquence ω sont en phase et interfèrent de façon constructive. En conséquence, l'amplitude du signal à

2ω résultant sera doublée, et la puissance totale sera 4 fois plus grande que celle obtenue pour une molécule individuelle. Si maintenant les molécules ont des orientations antiparallèles, les

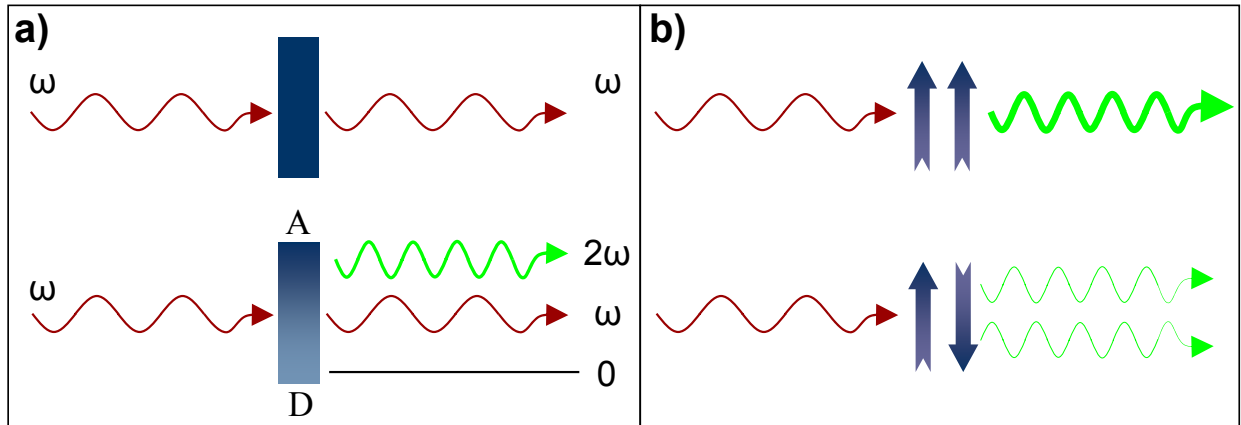


FIG. 1.2 – a) (haut) **L'excitation d'une molécule symétrique** par une onde de fréquence ω produit un rayonnement diffusé à la même fréquence, appelé diffusion Rayleigh; (bas) une **molécule non centrosymétrique** crée en plus de la diffusion Rayleigh, un rayonnement à la fréquence 2ω (diffusion harmonique). b) **Diffusions harmoniques de deux molécules** situées à une distance plus petite que la longueur d'onde : (haut) interférences constructives des signaux à 2ω pour des orientations parallèles et (bas) destructives pour des orientations antiparallèles, conduisant à un signal net nul.

rayonnements harmoniques créés ne vont plus être en phase, mais en opposition de phase et vont interférer de façon destructive : par conséquent le signal résultant sera nul. Il faut noter que la dépendance de la phase avec l'orientation moléculaire est une caractéristique de la diffusion harmonique de la lumière, qu'on ne retrouve pas dans l'émission de fluorescence.

c) N molécules non centrosymétriques Pour la plupart des applications de la microscopie SHG on ne cherche pas à visualiser une molécule unique, mais une population de molécules se trouvant dans le volume focal et dont l'organisation jouera un rôle très important dans la génération de seconde harmonique. Si la répartition de ces molécules est totalement aléatoire et fluctue au cours du temps, comme dans le cas d'un liquide, alors les signaux harmoniques seront diffusés de manière incohérente et la puissance totale rayonnée à 2ω dépendra du nombre de molécules rayonnantes (N) : $P_{2\omega} \propto N$, comme pour l'émission de fluorescence.

Pour des organisations moléculaires parfaitement définies, les signaux harmoniques seront diffusés de manière cohérente : les effets d'interférence jouent alors un rôle majeur, car dans la construction du signal, il faut tenir compte du déphasage du rayonnement à 2ω émis par chacun des dipôles. **Quand l'émission harmonique de la lumière est produite de façon cohérente par des molécules bien organisées, on parle de génération de seconde**

harmonique (SHG). La puissance totale rayonnée à 2ω dépend alors du carré du nombre des molécules rayonnantes : $P_{SHG} \propto N^2$ pour un milieu homogène.

La nature cohérente de la SHG est à l'origine d'une émission anisotrope de ce signal, qui pour un faisceau laser collimaté, est aussi collimatée dans la même direction (Fig. 1.3a). Cette

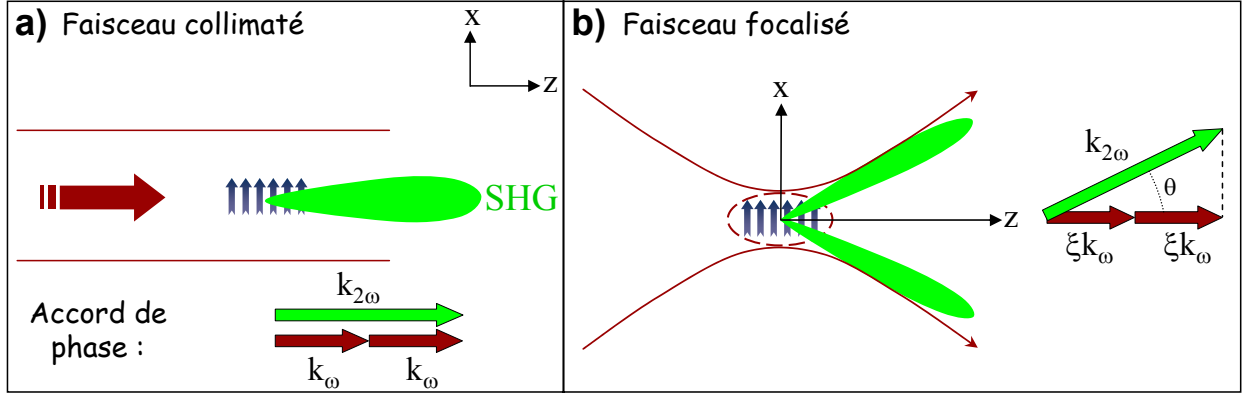


FIG. 1.3 – a) Pour une **excitation avec un faisceau laser collimaté**, la propagation de la SHG se fait dans la même direction que celle du faisceau excitateur, définie par les conditions d'accord de phase ; b) Pour une **excitation avec un faisceau laser focalisé**, la propagation de la SHG se fait selon deux lobes symétriques, dont la direction est aussi définie par les conditions d'accord de phase ; k_ω est le vecteur d'onde du faisceau incident collimaté, ξk_ω le vecteur d'onde du faisceau incident focalisé et $k_{2\omega}$ le vecteur d'onde de l'onde de fréquence double.

géométrie n'est pas celle qui est habituellement utilisée en microscopie à balayage laser, car pour visualiser un tissu avec une résolution 3D micrométrique, le faisceau laser doit être fortement focalisé : plus on focalise, plus le volume d'excitation sera petit. Toutefois, en SHG la phase joue un rôle important, d'autant que pour un faisceau focalisé celle-ci subit un déphasage de π lors du passage par le foyer de l'onde excitatrice (phase de Gouy) [Born and Wolf, 1980]. Ceci a des conséquences importantes pour la distribution du signal SHG, car les conditions d'accord de phase "obligent" la SHG à se propager avec un angle θ par rapport à la direction du faisceau incident (voir Fig. 1.3b), selon deux lobes symétriques et bien définis [Mertz and Moreaux, 2001] : $\theta \approx \pm \arccos(\xi)$, où ξ est un facteur plus petit que 1. La directionnalité de l'émission SHG permet une très bonne efficacité de collecte dont on peut tirer parti pour les applications en imagerie.

Il faut souligner que cette émission vers l'avant du signal SHG est spécifique d'une densité fixe de molécules bien alignées et distribuées le long de l'axe optique (généralisation aussi à 2D et 3D). Dans ces conditions, la puissance totale SHG rayonnée dépend du carré du nombre de molécules qui se trouvent dans le volume d'excitation : N^2 . Au contraire, pour un nombre N fixe de molécules, la puissance rayonnée dépend de la façon dont les molécules sont réparties dans le volume d'excitation. Ainsi, il a été démontré [Freund and Deutsch, 1986, Mertz and Moreaux, 2001] que s'il existe des inhomogénéités axiales dans la distribution des molécules (par exemple,

molécules alignées et localisées au niveau du point focal) la génération de seconde harmonique peut également se produire vers l'arrière. Si la distribution moléculaire possède, par exemple, une périodicité axiale de l'ordre de $\lambda/4$, où λ est la longueur d'onde dans le milieu, presque 25 % de la puissance totale SHG est rayonnée vers l'arrière.

De même, la taille du diffuseur (ensemble de molécules diffusantes) joue aussi un rôle important dans la distribution du signal SHG : si la taille du diffuseur le long de l'axe optique est supérieure à la longueur d'onde d'excitation, alors l'émission SHG se fait vers l'avant, et vers l'avant et l'arrière dans le cas contraire. La Fig. 1.4, extraite de la référence [Zipfel et al.,

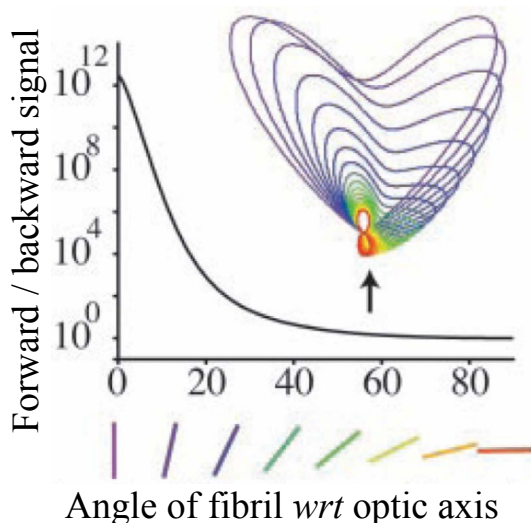


FIG. 1.4 – **Variation théorique du rapport F/B** entre le signal SHG émis vers l'avant et celui émis vers l'arrière en fonction de l'angle d'orientation du diffuseur, donc de la taille du diffuseur, par rapport à l'axe optique. À droite, est représenté le profil théorique d'émission du signal SHG pour différents angles d'orientation du diffuseur. Cette figure est extraite de la référence [Zipfel et al., 2003a].

2003a], illustre la variation théorique du rapport entre le signal SHG émis vers l'avant et le signal SHG émis vers l'arrière en fonction de l'extension du diffuseur le long de l'axe optique¹. La variation de l'angle d'orientation du diffuseur par rapport à l'axe optique implique une variation de son extension le long de l'axe optique. Plus cette taille diminue, plus le rapport F/B (forward SHG/backward SHG) se rapproche de 1. L'existence d'un signal SHG émis intrinsèquement vers l'arrière est d'une grande importance pour l'imagerie *in vivo*, car la collecte du signal en transmission est souvent difficile et peu pratique.

Enfin, compte tenu de la dépendance quadratique du signal avec l'intensité d'excitation, la microscopie SHG offre le même volume d'excitation confiné, et par conséquent la même résolution 3D micrométrique que la microscopie 2PEF. Ainsi, on peut de façon très simple combiner les

¹L'axe des molécules est perpendiculaire à la direction longitudinale du diffuseur.

deux techniques et faire une imagerie SHG/2PEF simultanée dans un même microscope. Ces

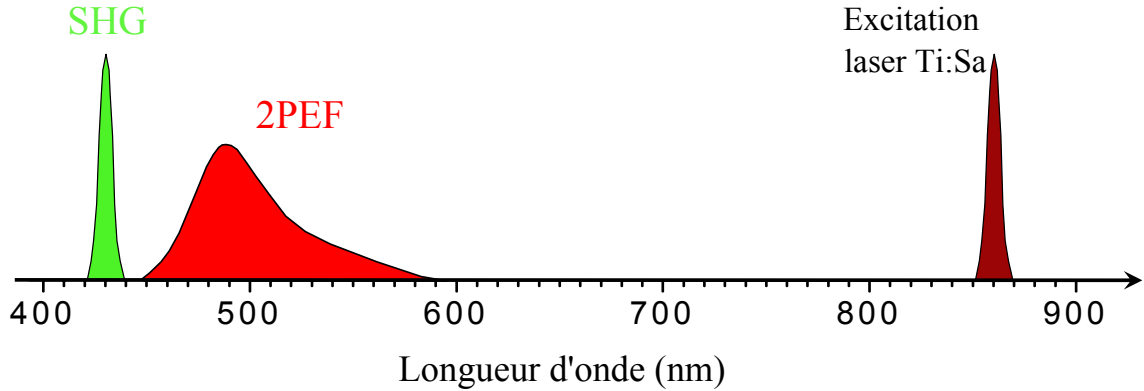


FIG. 1.5 – **Microscopie combinée SHG/2PEF** : La SHG est toujours émise à $\lambda_{excitation}/2$, alors que la fluorescence (2PEF) est décalée spectralement vers le rouge.

signaux sont de plus facilement séparables compte tenu de leurs différences spectrales (voir la Fig. 1.5) : la SHG est toujours émise à $\lambda_{exc.}/2$ (430 nm pour une excitation à 860 nm), alors que la fluorescence est décalée spectralement vers le rouge (> 430 nm).

Nous allons présenter dans la section suivante le microscope multiphoton utilisé dans les expériences présentées dans cette thèse.

1.2 Dispositif expérimental

a) Microscope multiphoton L'imagerie combinée SHG/2PEF a été effectuée à l'aide d'un microscope à balayage laser conçu au laboratoire. Il s'agit d'un microscope droit dont le schéma est représenté dans la Fig. 1.6. Il comprend un laser femtoseconde Titane-Saphir (MIRA, Coherent) accordable dans la gamme de longueurs d'onde 700 nm - 990 nm fournissant des impulsions de l'ordre de 130 fs à un taux de répétition de 76 MHz, des miroirs galvanométriques et des photomultiplicateurs en comptage de photons. En sortie, le faisceau laser est polarisé linéairement. Une fraction du faisceau prélevée à l'aide d'une lame est envoyée dans un spectromètre à fibre optique pour l'analyse du faisceau. Il est possible d'atténuer la puissance du laser en utilisant une lame demi-onde, dont la rotation est assurée par un moteur pas à pas, suivie d'un prisme de Glan. Ensuite, à l'aide d'une lame quart-d'onde (isolateur optique) la polarisation peut être changée en circulaire ou elliptique.

Le faisceau exciteur est balayé angulairement par deux miroirs galvanométriques (GSI Lumonics) et il est redimensionné à l'aide d'un télescope permettant de modifier sa taille et sa divergence afin qu'il remplisse complètement la pupille arrière de l'objectif. Ensuite, il passe à travers un miroir dichroïque (miroir dichroïque 1 dans la Fig. 1.6) et il est focalisé sur l'échantillon

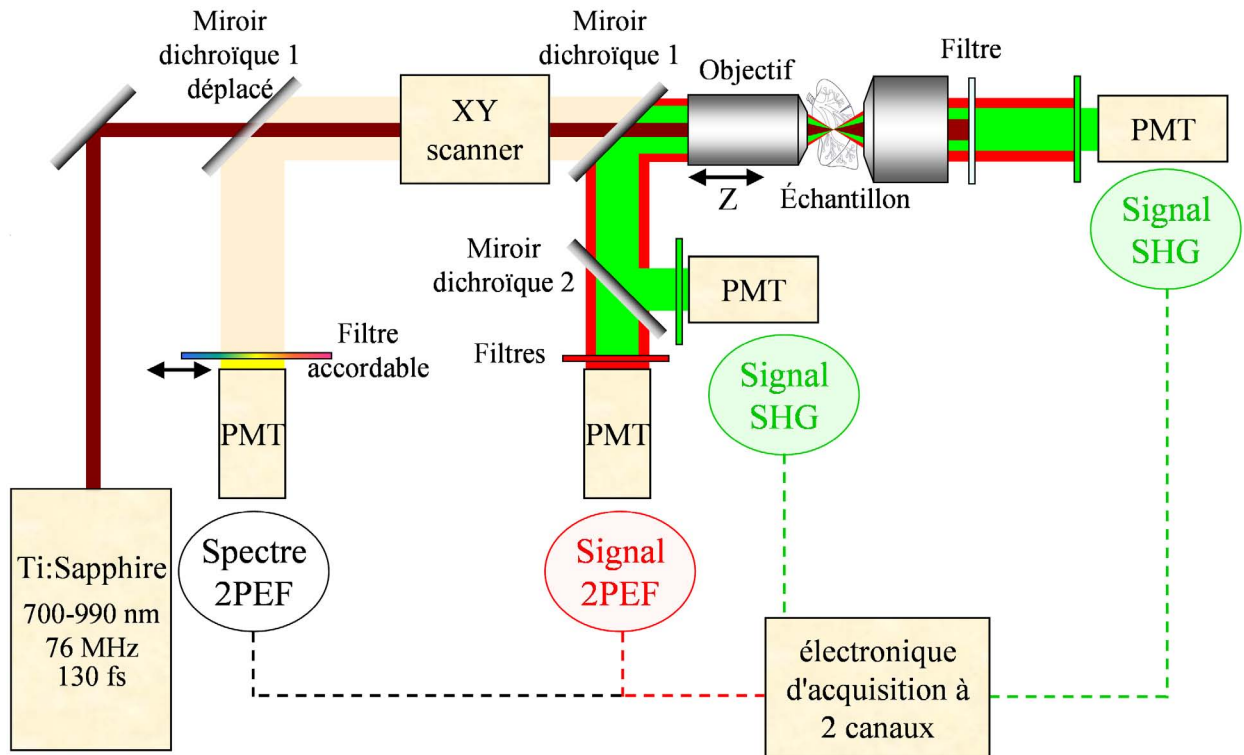


FIG. 1.6 – **Microscope multiphoton à balayage laser** : l'échantillon à étudier est excité avec un faisceau laser fs (marron) puis le signal de fluorescence 2PEF (rouge) est détecté en réflexion et le signal SHG (vert) en transmission pour des échantillons minces. Dans le cas d'une imagerie sur échantillon épais, ces signaux peuvent être collectés en réflexion et un deuxième miroir dichroïque est utilisé pour les séparer. Pour des mesures de spectres de fluorescence à l'aide d'un filtre accordable, le miroir dichroïque 1 est déplacé et installé sur la voie descannée du microscope.

à l'aide de l'objectif. Ainsi les deux miroirs galvanométriques permettent un balayage du point de focalisation dans le plan (x, y) perpendiculaire à la direction de propagation du faisceau (axe z). Une platine de translation verticale motorisée permet de traduire l'objectif et de changer ainsi le plan de focalisation dans l'échantillon. Le signal créé au point focal peut alors être détecté soit en transmission à travers un condenseur, soit en épiscollection à travers l'objectif d'excitation. Dans tous les cas le signal passe au travers de filtres spectraux et arrive sur les tubes photomultiplicateurs (Electron Tubes) de comptage de photons permettant de cette façon de faire une image combinée, par exemple SHG/2PEF.

Pour des échantillons épais les signaux seront détectés en épiscollection et dans ce cas on peut également faire une image en deux couleurs en utilisant un deuxième miroir dichroïque (miroir dichroïque 2 dans la Fig. 1.6) qui va permettre de séparer la SHG de la fluorescence. La

fluorescence est émise de façon isotrope et celle-ci peut aisément être détectée vers l'arrière. En ce qui concerne la SHG, l'épidétection est aussi possible, car ce signal est créé intrinsèquement vers l'arrière dans certaines conditions (voir section 1.1) et de plus, les propriétés diffusives de l'échantillon font qu'une partie du signal émis vers l'avant sera rétrodiffusé, contribuant ainsi au signal total détecté vers l'arrière. Enfin, l'échantillon peut être éclairé à travers le condenseur à l'aide d'une source de lumière blanche, et son image plein champ est enregistrée avec une caméra vidéo.

Nous pouvons également mesurer les spectres de fluorescence de l'échantillon. Pour cela on enlève le premier miroir dichroïque que l'on place sur une voie descannée du microscope. Le signal de fluorescence passe à travers un filtre interférentiel accordable (S-60, Schott) monté sur une platine de translation horizontale et arrive sur un autre tube photomultiplicateur. De cette façon nous acquérons une image pour chaque longueur d'onde et à partir de la pile d'images nous pouvons mesurer le spectre de fluorescence émis à différents endroits de l'échantillon. Nous avons déterminé les caractéristiques du filtre interférentiel accordable dans notre montage : il présente une résolution de 20 nm à mi-hauteur (donnée par la largeur à mi-hauteur du pic SHG du collagène), une transmission qui varie entre 20 et 50 % et une variation de la longueur d'onde par unité de déplacement du filtre de 6.6 nm/mm. La réponse spectrale du système a été calibrée avec une solution de rétinol dilué dans l'éthanol, en utilisant les données publiées dans la référence [Zipfel et al., 2003a]. Avec ce système nous pouvons acquérir des spectres dans la gamme de longueurs d'onde 380 - 630 nm.

Une interface électronique commandée par le programme d'acquisition, synchronise l'ouverture d'un obturateur laser, l'acquisition des images, le balayage du faisceau en x , y et le déplacement de l'objectif en z . Les tubes photomultiplicateurs que nous utilisons incluent un module de comptage de photons. Le temps de conversion d'un photon en une impulsion logique par le tube photomultiplicateur ainsi que l'électronique externe au tube photomultiplicateur permettent de travailler à une fréquence de comptage de 100 MHz, supérieure au taux de répétition du laser (76 MHz). Ceci permet donc de compter tous les photons disponibles, dans la limite cependant d'un taux de comptage de typiquement 1 photons/10 tirs lasers au maximum pour rester dans le domaine de comptage de photons. Ensuite, l'électronique d'acquisition compte les impulsions logiques obtenues pour chaque pixel à une fréquence typique de 100 kHz, soit 0.1 pixel/ μ s. La fréquence de 100 kHz représente un bon compromis pour nos expériences et peut être ajustée en fonction du rapport signal sur bruit et de la rapidité d'acquisition nécessaire.

b) Résolution Dans les expériences présentées dans cette thèse, nous utilisons des objectifs à immersion à eau ayant une grande distance de travail d'environ 2 mm, adaptés pour une imagerie en profondeur, permettant aussi de réduire l'encombrement au niveau de l'échantillon. La résolution du microscope multiphoton est définie comme la largeur à mi-hauteur (FWHM) du carré de la fonction de réponse impulsionnelle optique du microscope IPSF² (illumination point spread function). D'après [Zipfel et al., 2003b] la résolution peut théoriquement s'exprimer selon

les formules suivantes :

$$r_{xy} = \begin{cases} \frac{0.320 \lambda \sqrt{2 \ln 2}}{ON} ; ON \leq 0.7 \\ \frac{0.325 \lambda \sqrt{2 \ln 2}}{ON^{0.91}} ; ON \geq 0.7 \end{cases} \quad r_z = 0.532 \lambda \left[\frac{\sqrt{2 \ln 2}}{n - \sqrt{n^2 - ON^2}} \right] \quad (1.1)$$

ou r_{xy} est la résolution latérale, r_z la résolution axiale, λ la longueur d'onde d'excitation, n l'indice de réfraction du milieu et ON l'ouverture numérique de l'objectif. Ensuite, l'intégrale volumique de la IPSF² permet de calculer le volume d'excitation à deux photons :

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

La résolution du microscope multiphoton est généralement mesurée à partir de billes fluorescentes dont le diamètre est inférieur à la limite de résolution du microscope. On fait l'acquisition d'un ensemble d'images 2D en déplaçant l'objectif en z jusqu'à ce que l'on ait traversé toute la bille. A partir de cette pile d'images on peut tracer la variation de l'intensité du signal de fluorescence de la bille dans les trois directions : x , y et z , et déterminer la résolution.

Comme la résolution dépend de l'ouverture numérique, le choix de l'objectif en imagerie est très importante. Si on veut visualiser des cellules, il faut utiliser un objectif à fort grandissement qui permettra d'avoir une bonne résolution. Par contre pour l'imagerie des tissus épais, le choix se dirige vers un objectif qui offre à la fois une bonne résolution, un grand champ de vue pour améliorer la collecte du signal en milieu diffusant [Oheim et al., 2001] et en même temps pour avoir une vue d'ensemble du tissu, et une grande distance de travail. C'est le cas de l'objectif à immersion à eau Olympus 20× [Oheim et al., 2001], d'ouverture numérique 0.95, de champ de vue de 1 mm et de distance de travail 2 mm qui présente un bon compromis entre les trois paramètres. Compte tenu de ses caractéristiques nous l'avons choisi pour la majorité de nos expériences. Il faut noter que dans nos conditions expérimentales la pupille arrière de cet objectif était sous-remplie, ceci impliquant une ouverture numérique effective de 0.8. Ainsi pour une longueur d'onde d'excitation de 860 nm, cet objectif présente une résolution, déterminée expérimentalement, de 0.45 μm en latéral et de 2 μm en axial.

c) Traitement des images Nous allons maintenant brièvement présenter les logiciels permettant d'analyser les images. Comme nous l'avons déjà précisé, le microscope développé au laboratoire permet de faire une image combinée par exemple SHG/2PEF. Ces images peuvent être acquises soit en réflexion soit en transmission en fonction de l'épaisseur de l'échantillon. Il est possible ensuite de changer la longueur d'onde et d'exciter d'autres fluorophores qui vont nous apporter des informations complémentaires. De cette façon, nous aurons à combiner trois images acquises à un même endroit de l'échantillon. Le logiciel ImageJ (W. Rasband, National Institute of Health) permet de faire cette combinaison et d'attribuer un code couleur à chaque image. Il est aussi possible de combiner plusieurs piles d'images acquises à différentes profondeurs dans l'échantillon et les visualiser sous la forme d'un film. Pour la reconstruction tridimensionnelle d'un volume de l'objet à partir d'une pile d'images, le logiciel Amira (Mercury Computer

Systems) est le plus adapté. Celui-ci permet de faire différentes animations comme, par exemple, visualiser la reconstruction 3D d'un objet sous différents angles de vue.

Chapitre 2

Signaux optiques non-linéaires endogènes

La microscopie multiphoton a été initialement basée sur l'utilisation de sources de contraste exogènes, telles que les marqueurs fluorescents organiques ou les constructions GFP (green fluorescent protein). Depuis quelques années, plusieurs groupes s'intéressent à l'utilisation des fluorophores endogènes comme sources de contraste en microscopie 2PEF, ce qui permet une imagerie très peu invasive car il n'est pas nécessaire de fixer, ni de marquer les échantillons. L'utilisation des contrastes endogènes ouvre de nombreuses perspectives pour l'imagerie 3D en profondeur des tissus *in vivo* ou *ex vivo*. Il est possible notamment d'obtenir des informations morphologiques, structurales ou fonctionnelles au niveau d'une cellule ou d'un tissu entier. De plus, les expériences combinées de microscopie multiphoton et de spectroscopie non-linéaire de fluorescence permettent de lier certaines modifications spectroscopiques ou structurales à un processus pathologique. Nous allons tout d'abord présenter les principales sources de contraste endogène des cellules et de la matrice extracellulaire. Dans la deuxième et la troisième partie seront brièvement présentées quelques applications pour l'étude des artères et de la peau, afin d'illustrer les potentialités de cette technique. Enfin, une étude plus approfondie de la kératine, protéine fluorescente de l'épiderme humain, sera décrite.

2.1 Origine des signaux endogènes non-linéaires

En ce qui concerne la fluorescence, les sources de contraste endogène sont principalement des dérivés d'acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine), présentant une émission dans l'UV, ou des dérivés de vitamines qui émettent plutôt dans la gamme de longueurs d'onde 400 - 600 nm [Zipfel et al., 2003a]. Une liste plus détaillée de tous les fluorophores endogènes, ainsi que des constructions GFP, peut être trouvée dans la référence [Billinton and Knight, 2001].

a) Signaux endogènes cellulaires Au niveau cellulaire, les principaux fluorophores endogènes sont le NAD(P)H, le rétinol, les flavines, ainsi que le tryptophane et ses dérivées indoléamines (sérotonine, mélatonine).

Le NAD(P)H, dérivé de la vitamine PP, est un cofacteur qui se trouve dans le cytoplasme et les mitochondries des cellules. On utilise souvent le terme NAD(P)H pour se référer en même temps à la forme réduite de la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NAD(P)H). Ce fluorophore intracellulaire peut être utilisé comme indicateur de l'état métabolique de la cellule [Chance et al., 1962, Mironov and Richter, 2001, Huang et al., 2002], car les formes oxydées $\text{NADP}^+/\text{NAD}^+$ ne fluorescent pas. Par exemple, dans la thérapie photodynamique, qui est un traitement du cancer par photoactivation d'un sensibilisateur, l'intensité de fluorescence du NADH est utilisée pour suivre les dommages cellulaires induits au cours du traitement [Pogue et al., 2001]. Le spectre de fluorescence du NAD(P)H libre présente un maximum autour de 460 nm pour une excitation optimale à 360 nm. Ce maximum se décale vers le bleu, autour de 440 nm, quand le NAD(P)H est lié à une protéine. La Fig. 2.1 montre les spectres d'excitation à 2 photons ainsi que les spectres de fluorescence de quelques fluorophores intracellulaires, parmi lesquels se trouve le NAD(P)H et la riboflavine.

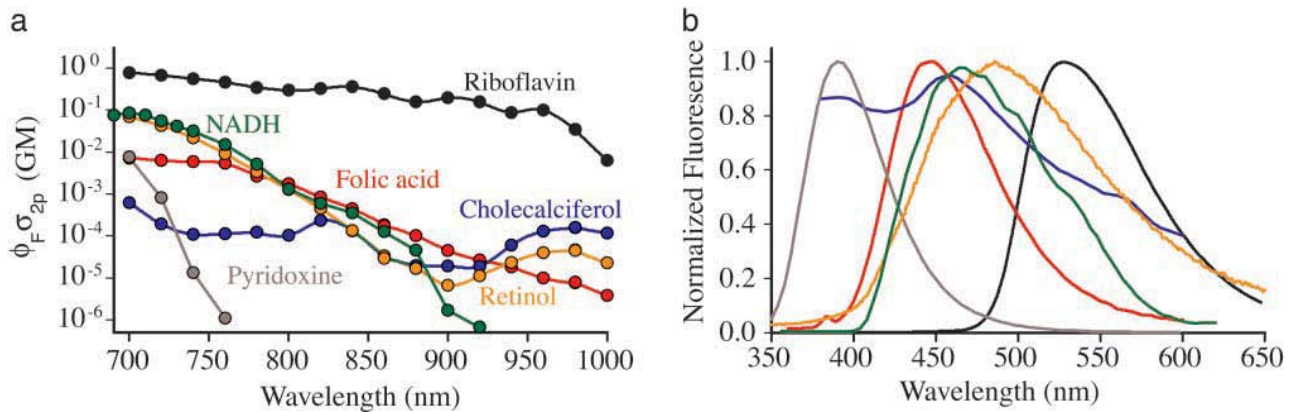


FIG. 2.1 – a) **Spectres d'excitation à 2 photons de six molécules biologiques** contribuant majoritairement à la fluorescence endogène intracellulaire. Les mesures ont été effectuées dans l'éthanol pour le rétinol et le cholécalficérol (vitamine D), et dans une solution saline à pH=7.2 pour les autres molécules ; b) **Spectres de fluorescence 2PEF** de ces molécules mesurés dans les mêmes conditions. Cette figure est tirée de [Zipfel et al., 2003a].

La riboflavine (vitamine B₂), ainsi que ses deux dérivés, les cofacteurs FMN (flavine mononucléotide) et FAD (flavine adénine dinucléotide) sont parmi les flavines les plus connues. Elles sont majoritairement situées dans les mitochondries [Scholz et al., 1969]. La FMN, ainsi que la riboflavine, présentent un spectre de fluorescence 10 fois plus intense que celui de la FAD, avec une émission maximale autour de 530 nm. Parce que seuls les flavines oxydées et le NAD(P)H réduit fluorescent, ces deux signaux répondent de façon opposée à des changements métaboliques. De

ce fait, [Huang et al., 2002] suggèrent que le couple FAD/NAD(P)H pourrait être utilisé comme indicateur du métabolisme cellulaire dans certains tissus. Les deux molécules sont excitables simultanément et on peut détecter séparément le signal de fluorescence émis par la FAD du signal émis par le NAD(P)H.

En dehors des principaux fluorophores cellulaires présentés ci-dessus, d'autres sources de contraste endogènes cellulaires existent pour la microscopie multiphoton. Le tableau 2.1 montre ces différentes sources qui produisent un signal 2PEF, 3PEF (fluorescence excitée à 3 photons) ou SHG, ainsi que leur section efficace de fluorescence à 2 ou 3 photons. Les sources cellulaires de signal SHG sont les microtubules [Campagnola et al., 2002, Dombeck et al., 2003] et l'amidon dans les plantes [Cox et al., 2005, Débarre et al., 2006].

Molécule	Process	λ_{ex} 50% max, nm*	Cross section
Tyrosine	3PE	<700	1×10^{-84}
Tryptophan	3PE	700–740	1×10^{-84}
Serotonin	3PE	700–720	4×10^{-84}
Melatonin	3PE	700–720	7×10^{-84}
5-HIAA	3PE	700–720	2×10^{-84}
5-HTOL	3PE	700–720	5×10^{-84}
Retinol	2PE	700–830	7×10^{-52}
Flavins	2PE	700–730	$1-8 \times 10^{-51}$
NADH	2PE	690–730	9×10^{-52}
Pyridoxine	2PE	690–710	8×10^{-53}
Folic acid	2PE	700–770	7×10^{-53}
Cholecalciferol	2PE	<700	6×10^{-54}
Elastin	2PE	700–740	—
NFTs	2PE	700–780	—
Lipofuscin	2PE	700–850	High [‡]
Collagen	SHG	700–740	—
Microtubules	SHG	—	—
Skel. muscle	SHG	—	—

TAB. 2.1 – **Caractéristiques des sources endogènes de contraste pour la microscopie multiphoton** : les sections efficaces de fluorescence à 2 photons (2PE) exprimées en cm^4s sont données pour une excitation à 700 nm, et celles à 3 photons (3PE) exprimées en cm^6s^2 sont données pour une excitation à 720 nm. *La gamme de longueurs d'onde du laser Ti :Sa pour laquelle la section efficace de fluorescence est >50 % de la valeur maximale. ‡ Varie selon le type. Tiré de [Zipfel et al., 2003a].

Une autre source intracellulaire de signal 2PEF est la kératine. Celle-ci est une protéine fibreuse qui forme des filaments intermédiaires et qui est présente dans les tissus épithéliaux. Ses

propriétés de fluorescence seront présentées dans la section 2.4.

D'après le tableau 2.1 et la Fig. 2.1a, tous les fluorophores endogènes intracellulaires sont excitables de manière efficace entre 700 et 750 nm. Pour cette raison, l'imagerie intracellulaire s'effectue dans cette gamme de longueurs d'onde. Par contre, la discrimination entre les différents fluorophores est parfois très difficile, car la plupart d'entre eux fluorescent entre 440 et 500 nm (Fig. 2.1b). Pour identifier l'origine d'un signal de fluorescence, la connaissance de la longueur d'onde d'absorption ou d'émission n'est pas suffisante. Ceci nécessite d'autres informations complémentaires comme la connaissance de la composition biochimique du tissu, la colocalisation par colorations habituelles ou par immunohistochimie.

b) Signaux endogènes tissulaires L'élastine, les filaments de myosine et le collagène sont les principales sources de contraste endogène en microscopie 2PEF/SHG de la matrice extracellulaire.

L'élastine est le principal constituant des fibres ou des lames élastiques qui confèrent élasticité à différents tissus comme la peau, les parois de vaisseaux ou le poumon. Elle présente un fort signal de fluorescence, dont l'origine n'est pas très bien connue [Richards-Kortum and Sevick-Muraca, 1996]. Plusieurs travaux ont été menés à ce sujet : initialement il a été envisagé que cette fluorescence était due aux acides aminés desmosine et isodesmosine spécifiques de l'élastine [Eyre et al., 1984] ; pourtant [Thornhill, 1975] avait montré que la desmosine pouvait être séparée du matériel fluorescent de l'élastine. Un autre travail effectué par [Deyl et al., 1980] indique que la fluorescence est due à un dérivé pyridinoline avec un maximum de fluorescence situé autour de 400 nm pour une excitation dans l'UV. Par ailleurs, le spectre de fluorescence de l'élastine semble beaucoup dépendre du mode d'extraction de l'élastine pour les mesures *in vitro*, et du type de tissu pour les mesures *in vivo*. Par exemple, le spectre de fluorescence de l'élastine mesuré à partir des fibres élastiques de la peau présente un maximum d'émission à 480 nm avec un pic de plus faible intensité autour de 400 nm [Zipfel et al., 2003a]. Mais [Buehler et al., 2005] avaient obtenu un maximum de fluorescence situé à 490 nm. Nous avons mesuré le spectre de fluorescence de l'élastine solide, extraite à partir de l'aorte humaine. Le maximum d'émission que nous avons obtenu est centré autour de 445 nm pour une excitation à 760 nm [Boulesteix, 2004].

En ce qui concerne la génération de seconde harmonique au niveau tissulaire, une des sources de contraste endogène se trouve dans le tissu musculaire (muscle squelettique et cardiaque). Plus précisément il s'agit des filaments de myosine qui font partie de la structure du sarcomère, unité contractile élémentaire du muscle. L'efficacité de génération de seconde harmonique au niveau du sarcomère est due à l'arrangement très dense et quasi-cristallin des filaments de myosine [Campagnola et al., 2002, Both et al., 2004, Boulesteix et al., 2004, Plotnikov et al., 2006].

Une des plus importantes sources tissulaires de signal SHG est le collagène, protéine majoritaire de la matrice extracellulaire. L'existence d'un signal SHG du collagène (type I) a été mise en évidence dès 1986 sur des tendons de queue de rat [Roth and Freund, 1979, Freund and Deutsch, 1986, Freund et al., 1986], mais ce contraste endogène a véritablement été exploité seulement de-

puis quelques années, dans le cadre du développement de la microscopie non-linéaire à balayage laser. Ce signal SHG a été observé pour différents types de collagènes fibrillaires [Zoumi et al., 2002, Campagnola et al., 2002, Zipfel et al., 2003a], mais pas pour le collagène non fibrillaire de type IV qui se trouve dans les membranes basales [Zipfel et al., 2003a, Brown et al., 2003].

c) Autres signaux optiques non-linéaires dans les tissus Ces autres sources de signal sont données par les constructions de protéines fluorescentes - GFP (green fluorescent protein), CFP (cyan), YFP (yellow), DsRed et plus récemment RFP (red). Celles-ci sont toutes des protéines intrinsèquement fluorescentes issues de différents organismes (méduse, corail,...)(voir Fig. 2.2 bas). Le gène d'une telle protéine peut être fusionné *in vitro* au gène d'une protéine que l'on sou-

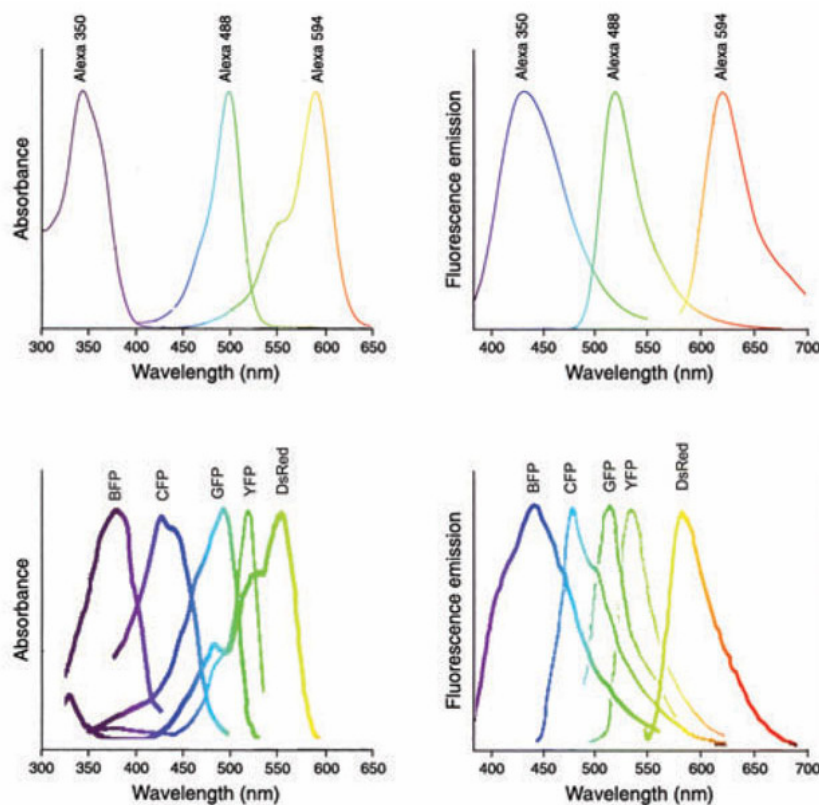


FIG. 2.2 – Spectres d'absorption et de fluorescence de quelques molécules fluorescentes Alexa Fluor (Invitrogen's Molecular Probes) et des constructions de protéines fluorescentes (Clontech Laboratories). Cette figure est tirée de [Lichtman and Conchello, 2005]

haite étudier. Le gène recombinant est ensuite réintroduit dans des cellules ou dans un embryon, qui va alors synthétiser la protéine fluorescente. Cette méthode permet d'étudier les protéines dans leur environnement naturel : la cellule vivante. Ces protéines fluorescentes sont à la fois des

sources de contraste endogène et exogène, car elles sont exprimées dans des cellules et des tissus, bien que cela ne se produise pas de façon naturelle.

d) Comparaison avec les techniques conventionnelles Comme il a été discuté précédemment, pour déterminer l'origine d'un signal de fluorescence ou de SHG on compare l'image multiphoton à :

- *des colorations histologiques* - telles que l'hématoxyline-phloxine-safran (HPS), l'orcéine, le picrosirius, le trichrome de Masson, . . . , qui se font en général sur des coupes minces de tissu fixé. Le HPS est une coloration standard des coupes histologiques, les noyaux apparaissent en bleu (hématoxyline), le cytoplasme en rose, les fibres musculaires et les hématies en rouge vif (phloxine) et le collagène, le mucus, la substance fondamentale du cartilage ou de l'os sont colorés en jaune (safran). L'orcéine est un colorant du tissu élastique, qu'elle révèle en rouge. Le picrosirius est une solution saturée de rouge Sirius dans de l'acide picrique qui permet de visualiser les fibres de collagène de type I, III, V, . . . en rouge. Le trichrome de Masson est un colorant trichromique des noyaux en bleu, du cytoplasme en rose et du collagène (tous les types de collagène) soit en bleu, soit en vert.
- *des techniques d'immunofluorescence* - se font sur des coupes minces et sont souvent utilisées pour localiser les protéines. Les fluorophores habituels sont la fluorescéine, la rhodamine, mais d'autres fluorophores tels que la RPE (R-phycoerythrine), DAPI, Hoechst, les colorants Alexa Fluor (Fig. 2.2 haut), les nanoparticules fluorescentes [Larson et al., 2003, Stroh et al., 2005], . . . peuvent être aussi choisis en fonction de leur longueur d'onde d'émission. Celle-ci doit être décalée par rapport à la fluorescence endogène de la biomolécule. Ces colorants ont une affinité non spécifique peu élevée pour les biomolécules, mais il est possible de les coupler chimiquement à des anticorps. L'anticorps va se fixer aux antigènes qui permettront ainsi la localisation de la biomolécule. En principe, on utilise des complexes anticorps primaire/anticorps secondaire lié à un fluorophore, car la production des anticorps est plus facile si les deux fonctions de reconnaissance spécifique et de signalisation sont séparées. Ainsi, le premier anticorps identifie spécifiquement la protéine d'intérêt, et le deuxième anticorps identifie spécifiquement le premier anticorps.

Ces techniques conventionnelles ont un caractère invasif car elles se font en général sur des coupes minces de tissu qui doivent être fixées, coupées et colorées ou marquées. Au contraire en microscopie multiphoton les tissus peuvent être visualisés grâce aux contrastes endogènes ou aux constructions de protéines fluorescentes, sans aucune préparation préalable du tissu. Ceci réduit les artefacts et donne la possibilité de faire, par exemple, des études pharmacologiques *in vivo* ou *ex vivo*.

L'ensemble de ces sources de contraste endogène ou exogène permet une imagerie simultanée d'un certain nombre de composants cellulaires, subcellulaires ou moléculaires. Nous allons présenter dans les sections suivantes deux tissus que nous avons étudiés, les artères et la peau, visualisés par microscopie multiphoton grâce aux signaux endogènes de fluorescence et de

génération de seconde harmonique.

2.2 Imagerie multiphoton des artères

Les artères sont des vaisseaux qui jouent un rôle essentiel dans le maintien de la pression sanguine optimale permettant une irrigation de tous les points du corps même les plus éloignés. Dotées d'une musculature qui leur est propre (les cellules musculaires lisses), elles peuvent faire varier l'état de tension de leur paroi et réguler de ce fait la pression artérielle. Une artère est constituée de plusieurs couches concentriques : l'intima, au contact direct du flux sanguin, la média et l'adventice en périphérie (Fig. 2.3) [Tortora and Grabowski, 2004].

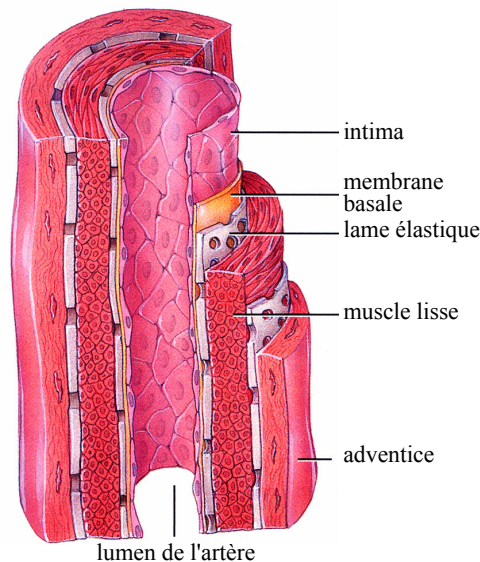


FIG. 2.3 – **Structure de la paroi d'une artère** : l'intima, la média et l'adventice.

Notre travail a porté sur l'étude des artères élastiques comme l'artère aorte et la carotide. La média de ces artères est constituée de plusieurs lames élastiques (contenant de l'élastine) concentriques entre lesquelles on retrouve des cellules musculaires lisses. L'adventice est constituée de fibres de collagène, essentiellement du collagène de type I et III. Celles-ci confèrent à la paroi artérielle sa résistance, tandis que les lames élastiques assurent son élasticité. Donc, la paroi artérielle contient de l'élastine et du collagène, deux sources majeures de contraste endogène qui permettent de faire une image combinée SHG/2PEF sans marquage des vaisseaux.

Nous avons mené deux types d'expériences *ex vivo* sur des artères aorte et carotide, prélevées chez le rat (race Sprague Dawley) :

- mise en évidence et caractérisation des signaux endogènes et des propriétés optiques du tissu artériel
- mise en évidence des effets indirects du lindane (pesticide) sur les artères

Pour cela, les échantillons ont été placés dans une solution physiologique directement après leur prélèvement et fixés sur un gel transparent de Sylgard, au fond de boîtes de Pétri en plastique transparent. La structure de la paroi artérielle a été étudiée soit sur des coupes transversales, soit sur des coupes ouvertes longitudinalement et visualisées sur la face interne. Nous avons choisi de travailler à une longueur d'onde d'excitation de 860 nm et une puissance moyenne comprise entre 10 et 30 mW. Ces conditions représentent un bon compromis entre la profondeur de pénétration, le rapport signal sur bruit et les dommages optiques dus à l'absorption de l'excitation. Le signal de fluorescence 2PEF a été acquis en réflexion à travers l'objectif et le signal SHG en transmission à travers la boîte de Pétri et le condenseur.

Mise en évidence et caractérisation des signaux endogènes et des propriétés optiques du tissu artériel Pour cette mise en évidence des signaux endogènes, nous avons acquis des images combinées SHG/2PEF des artères normales non colorées. La Fig. 2.4a montre une image 2PEF typique d'une artère élastique. Les différentes lames élastiques présentes dans la média de l'artère sont très bien mises en évidence par microscopie multiphoton, grâce au signal de fluorescence de l'élastine. Nous avons confirmé expérimentalement cette attribution du signal 2PEF à l'élastine. Pour cela, des coupes d'aorte ont été fixées, marquées avec la (+)cathéchine-fuschine, un colorant spécifique des fibres élastiques [Godeau et al., 1986], et visualisées par microscopie optique en lumière directe.

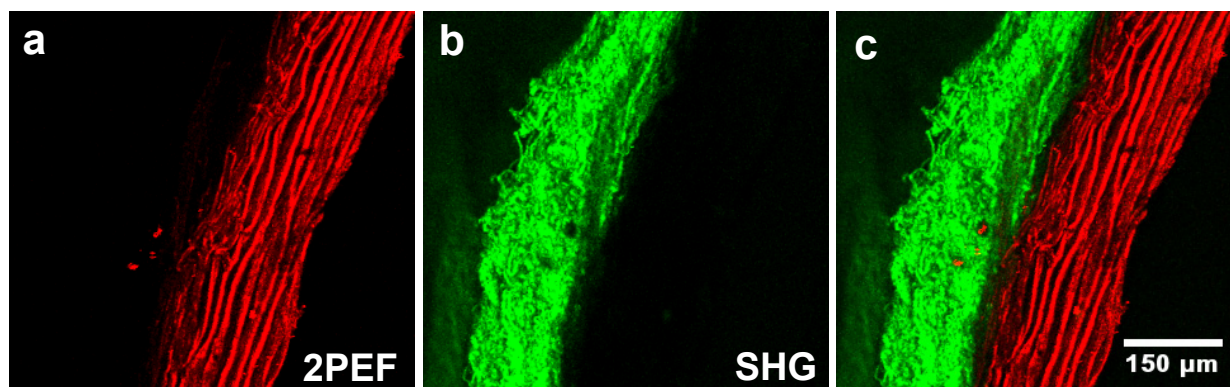


FIG. 2.4 – Microscopie multiphoton d'une artère aorte normale de rat (artère aorte) : a) image 2PEF (rouge) des lames élastiques présentes dans la média, b) image SHG (vert) des fibres de collagène de l'adventice et c) image combinée SHG/2PEF. Projection d'une pile de 15 images acquises tous les 5 μm , objectif 10 $\times$ (O.N.=0.3), puissance d'excitation 30 mW à 860 nm. Temps d'acquisition : 1.4 s.

Il faut noter que la structure lamellaire de la média est visualisée avec un très bon contraste et une très bonne spécificité à 860 nm. En particulier, à cette longueur d'onde excitation, les autres composants de la paroi artérielle, comme les cellules musculaires lisses, ne fluorescent pas du fait

d'une excitation peu efficace du NAD(P)H à 860 nm. Nous avons ainsi pu visualiser de façon plus détaillée la structure de la paroi artérielle : une structure en assemblage croisé au niveau des lames élastiques, essentielle pour assurer les propriétés d'élasticité, avec des structures rondes non fluorescentes, qui correspondent à des trous (fenêtres) dans la lame élastique, permettant aux cellules de communiquer entre elles ¹.

Les fibres de collagène présentes dans l'adventice du vaisseau sont révélées par génération de seconde harmonique du collagène fibrillaire (Fig. 2.4b). Ce point a été vérifié expérimentalement par un marquage des fibres de collagène (I et III) au rouge sirius [Junqueira et al., 1979]. La Fig. 2.4c combine les images SHG et 2PEF de l'artère. La structure de la paroi artérielle est révélée sans aucune préparation ni marquage du fait de la grande spécificité des sources de contraste endogène de la matrice extracellulaire : l'élastine et le collagène. La reconstruction tridimensionnelle à partir d'une pile d'images SHG/2PEF permet de mieux visualiser cette structure. Un exemple d'une reconstruction 3D d'une artère carotide est donné dans la Fig. 2.5.

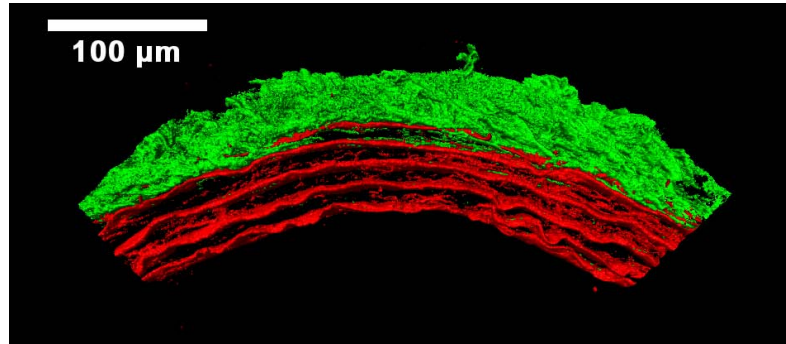


FIG. 2.5 – **Reconstruction 3D d'une section longitudinale d'artère carotide.** Pile de 25 images ($493 \times 213 \mu\text{m}^2$) acquises tous les $2 \mu\text{m}$, objectif $20\times$ (O.N.=0.8), puissance d'excitation 15 mW à 860 nm.

Un paramètre critique pour l'imagerie multiphoton des tissus en profondeur est le libre parcours moyen de diffusion de l'excitation $l_S^{(ex)}$. Ce paramètre indique l'opacité du tissu pour la microscopie multiphoton et nous donne des informations sur l'ajustement de la puissance incidente nécessaire pour pouvoir compenser l'atténuation du signal détecté. En négligeant les aberrations, pour un processus quadratique le signal émis (2PEF ou SHG) varie avec le nombre de photons balistiques de l'excitation [Oheim et al., 2001] :

$$S_{SHG,2PEF} \propto \left(\exp \left(-z/l_S^{(ex)} \right) \right)^2 \quad (2.1)$$

En pratique, le signal émis décroît exponentiellement avec la profondeur du tissu [Dunn et al., 2000], pour une puissance d'excitation donnée :

$$S_{SHG,2PEF} \propto \exp \left(-z/l_E^{(ex)} \right) \quad (2.2)$$

¹Ces images sont montrées dans la référence [Boulesteix et al., 2006]

où z est la profondeur du tissu et $l_E^{(ex)}$ la longueur caractéristique de l'extinction du signal. Par conséquent, la longueur caractéristique de l'extinction du signal est égale à la moitié du libre parcours moyen de diffusion de l'excitation $l_E^{(ex)} = l_S^{(ex)}/2$. Mais en pratique, l'absorption du signal, l'efficacité de collecte de la fluorescence qui change avec la profondeur du tissu et les aberrations liées notamment à la différence d'indice de réfraction entre le tissu et le milieu physiologique font que $l_E^{(ex)} \leq l_S^{(ex)}/2$.

Nous avons estimé ce paramètre pour la média et l'adventice des artères pour une excitation à 860 nm (voir la Fig. 2.6). Pour cela, nous avons extrait la variation du signal avec la profon-

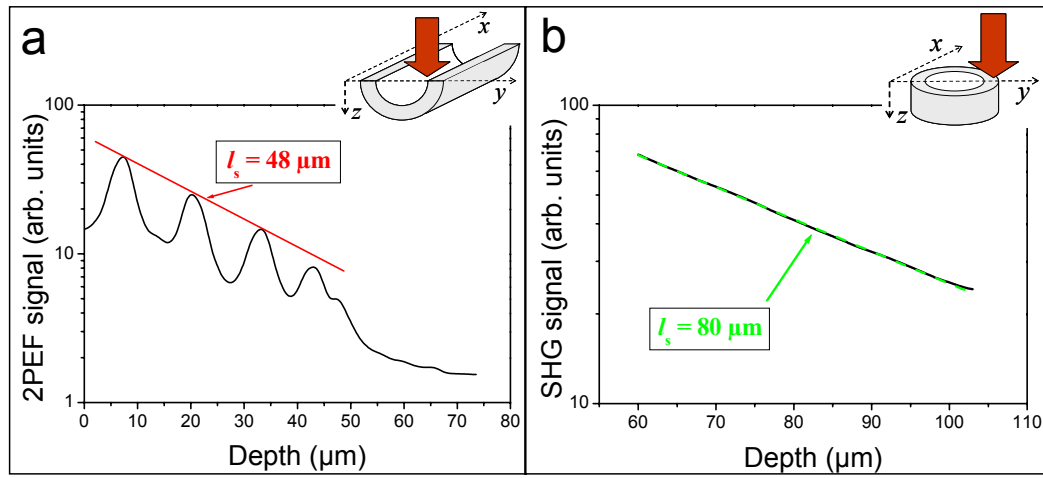


FIG. 2.6 – **Variation du signal SHG/2PEF avec la profondeur de la paroi artérielle pour une excitation à 860 nm** : a) profil en z du signal 2PEF extrait à partir d'une pile d'images xy acquises tous les 5 μm dans la média de l'artère. Objectif 60 $\times$ (O.N.=0.9), puissance d'excitation 10 mW ; b) profil en z du signal SHG extrait à partir d'une pile d'images xy acquises tous les 2 μm dans l'adventice de l'artère. Objectif 10 $\times$ (O.N.=0.3), puissance d'excitation 115 mW. Le signal 2PEF ou SHG est une moyenne sur une aire de rayon de 10 μm .

deur du tissu à partir de piles d'images SHG/2PEF. Puis, en ajustant les profils obtenus par des exponentielles, nous avons déterminé la longueur caractéristique de l'extinction de l'excitation. L'estimation de ce paramètre au niveau de la média de l'artère a été faite sur des coupes transversales ouvertes longitudinalement et sur des coupes transversales pour l'adventice (voir les schémas insérés dans la Fig. 2.6 en haut). Le profil de variation du signal 2PEF avec la profondeur, dans la média de l'artère, présente des pics successifs qui correspondent aux différentes lames élastiques constituant la média. Ainsi, nous avons estimé un libre parcours moyen de diffusion de l'excitation de 48 μm pour la média et de 80 μm pour l'adventice. Ces valeurs montrent que l'adventice des artères est beaucoup plus transparente que la média pour une excitation à 860 nm et nous donnent une estimation des propriétés optiques des artères élastiques.

Compte tenu de ces résultats, nous avons vérifié qu'il est possible de visualiser par microscopie

multiphoton la lumière (lumen) d'une petite artère intacte à travers la paroi artérielle. La Fig. 2.7 montre une image SHG acquise à une profondeur intermédiaire dans une artère coronaire (ce type d'artère contient seulement quelques fibres élastiques et nous l'avons visualisé ici seulement par SHG des fibres de collagène). L'ensemble de ces données montre que la microscopie multiphoton est un outil adapté pour la visualisation de la structure 3D du tissu artériel. Cette technique

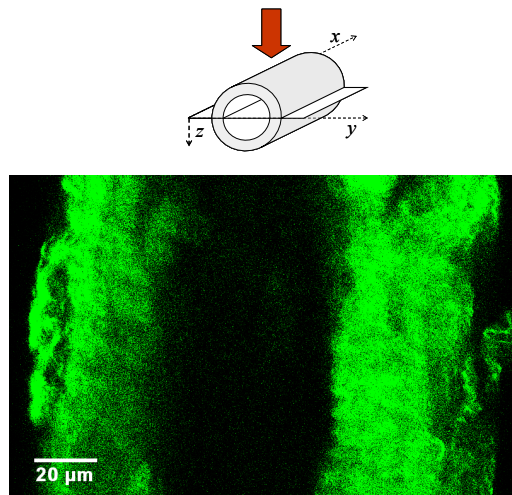


FIG. 2.7 – Image SHG (vert) des fibres de collagène de l’adventice d’une artère coronaire acquise à travers la paroi artérielle de 40 μm d’épaisseur. Temps d’acquisition 6 s, objectif 60 $\times$ (O.N.=0.9), puissance d’excitation 26 mW à 860 nm.

donne la possibilité d’étudier des changements morphologiques causés par différents facteurs comme, par exemple, un médicament. Nous allons démontrer dans le paragraphe suivant qu’il est possible de mettre en évidence des changements de structure artérielle dus à un pesticide, le lindane.

Mise en évidence des effets indirects du lindane sur les artères Le lindane est un pesticide qui a été utilisé avant les années 70 en agriculture. Parce qu’il est très toxique, il a peu à peu cessé d’être utilisé pour la majorité des applications. Mais il est toujours présent dans l’environnement du fait de son grand temps de vie [Wauchope et al., 1992] et aussi parce qu’il est encore utilisé dans certains pays. Nos collègues électrophysiologistes ont récemment mis en évidence les effets indirects du lindane sur le tissu artériel [Sauviat et al., 2002, Sauviat et al., 2005] et nous avons utilisé la microscopie combinée SHG/2PEF pour caractériser ces effets. Cette étude a été menée chez des rats n’ayant pas reçu du lindane, mais descendant de mâles ayant ingéré du lindane. Nous allons utiliser le terme “rat traités” pour définir les rats faisant partie de cette étude. Plusieurs prélèvements d’aorte et de carotide ont été réalisés pour chaque animal, et comparés à des artères normales dans les mêmes conditions expérimentales. Par conséquent, tout changement de structure au niveau de la paroi artérielle a été attribué à l’administration du lindane.

La Fig. 2.8 montre des images typiques de coupes transversales de carotide prélevées chez des rats a) normaux et b) traités. Comme l'illustrent sur les Fig. 2.8c et d, nous avons systématiquement observé que les lames élastiques étaient plus ondulées, espacées irrégulièrement et la majorité de celles-ci présentaient des ruptures.

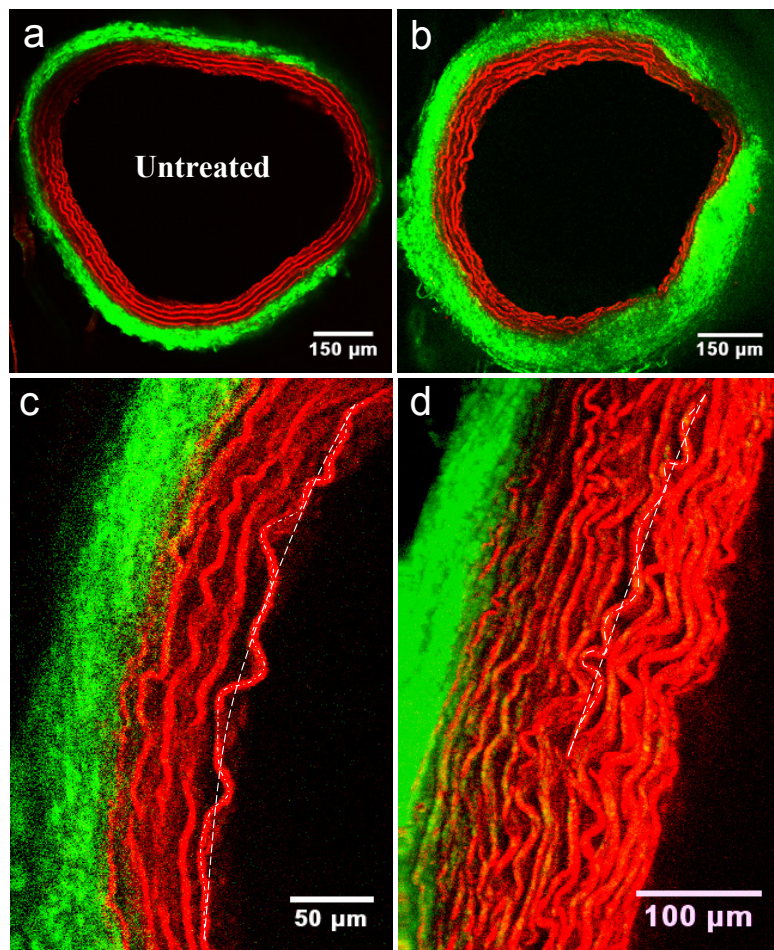


FIG. 2.8 – Images multiphoton des coupes transversales des artères. a) carotide de rat normal et (b-d) de descendant de rat traité, excitation à 860 nm, objectif 10× (O.N.=0.3); (a,b) Projection d'une pile d'images acquises sur 65 μm (40 mW) d'épaisseur; (c) image de carotide (20 mW) et d) image d'artère aorte (30 mW). Temps par pixel : 10 μs /pixel.

Nous avons caractérisé ces altérations au niveau de la paroi artérielle, en mesurant l'ondulation des lames élastiques pour des échantillons normaux et traités. Pour cela, nous avons calculé le rapport entre la longueur de chaque lame élastique (courbe pointillée) et la longueur de l'arc (tiret) le long de la paroi (Fig. 2.8 c et d). La courbure de l'arc est déterminée par la forme de l'adventice. Les résultats obtenus (tableau 2.2) montrent que l'ondulation des lames élastiques chez les rat traités est augmentée de typiquement 10 % par comparaison avec les témoins. Cette

Artère	Contrôle	Traité	Rapport
Aorte	1.02±0.02	1.15±0.03	113 %
Carotide	1.04±0.01	1.12±0.02	108 %

TAB. 2.2 – Longueurs de lames élastiques individuelles rapportées aux longueurs d’arcs au long de la paroi artérielle (voir Fig. 2.8). Dans la dernière colonne sont affichés les rapports entre les longueurs relatives pour les rats traités et les rat normaux. Les erreurs correspondent à l’erreur standard de la moyenne pour 9 échantillons.

analyse met ainsi en évidence les effets délétères du lindane au niveau de la structure de la paroi artérielle chez les rats traités. Ces résultats sont en accord avec une souplesse anormale des artères observée systématiquement chez les rats traités. Celle-ci est expliquée par une absence d’élasticité de la paroi artérielle due aux altérations des lames élastiques.

Conclusions Nos résultats montrent que l’imagerie combinée SHG/2PEF permet une visualisation microscopique de l’architecture du tissu artériel frais sans aucune coloration. Nous avons démontré le potentiel de cette technique pour la mise en évidence des effets pathogènes d’un pesticide sur la structure de la paroi artérielle, en s’affranchissant des artefacts rencontrés en histologie classique. La microscopie multiphoton apparaît ainsi comme un outil particulièrement intéressant pour des études pharmacologiques sur les artères et au niveau d’autres tissus. Ces travaux ont donné lieu à une publication dans le journal Cytometry [Boulesteix et al., 2006].

2.3 Imagerie multiphoton de la peau

La peau est constituée de deux couches (voir Fig. 2.9) : l’épiderme - une couche fine, superficielle, composée de tissu épithélial et le derme - une couche épaisse, profonde, composée de tissu conjonctif.

L’épiderme est composé de cinq couches cellulaires (cornée, claire, granuleuse, de Malpighi et basale), la première étant formée de cellules mortes kératinisées. Environ 90 % des cellules épidermiques sont représentées par les kératinocytes, qui synthétisent la kératine. Celle-ci est une protéine fibreuse, qui assure à la peau sa propriété d’impermeabilité et de protection extérieure. Nous allons voir dans la section 2.4 que la kératine est une protéine fluorescente qui permet une imagerie sans marquage de l’épiderme. La couche basale de l’épiderme est la zone de jonction entre l’épiderme et le derme. Elle est séparée du derme par la membrane basale (contenant du collagène de type IV et VII). Celle-ci est accrochée au derme papillaire par des fibrilles d’ancrage (collagène de type VII) [Keene et al., 1987, Rousselle et al., 1997], qui peuvent ancrer un grand nombre de fibres élastiques et de fibres de collagène présentes dans le derme.

Le derme est un tissu conjonctif, composé majoritairement de fibres élastiques et de fibres de

collagène donnant à la peau élasticité, extensibilité et soutien. La partie superficielle du derme, nommée derme papillaire, représente 1/5 de son épaisseur et elle est formée de tissu conjonctif aréolaire, contenant des fines fibres élastiques et de collagène. La partie profonde du derme est formée d'un tissu conjonctif plus dense, où les fibres élastiques et de collagène s'entrecroisent dans toutes les directions, dans des plans grossièrement parallèles à la surface cutanée.

Nous avons réalisé des images multiphoton de biopsies de peau humaine d'épaisseur $6\ \mu\text{m}$ (fixées avec du paraformaldéhyde à 4 % en volume puis incluses dans la paraffine). Tous les échantillons proviennent de patients sains qui n'ont pas de maladies cutanées, ni de maladies systémiques. La Fig. 2.10 montre une image multiphoton typique de biopsie de peau humaine.

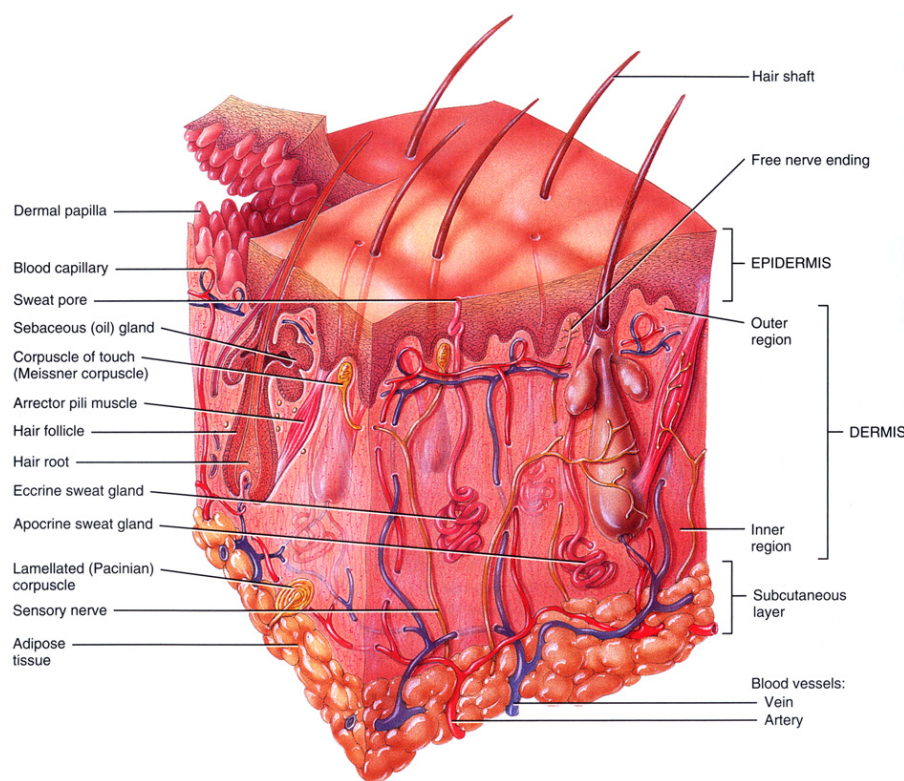


FIG. 2.9 – **Structure de la peau** : l'épiderme - couche mince, superficielle et le derme - couche épaisse située en dessous de l'épiderme. Plus en profondeur dans la peau se trouve le substrat sous-cutané qui attache le derme aux différents organes et tissus. Cette figure est tirée de [Tortora and Grabowski, 2004].

En rouge est représenté le signal de fluorescence et en vert le signal SHG, pour une excitation à 860 nm. Nous avons attribué ces signaux aux différentes sources de contraste endogène de la peau, sur des considérations morphologiques. Ces images révèlent clairement la structure de la peau : épiderme (1, 2) et derme (3, 4). Le signal de fluorescence de l'épiderme est majoritairement dû aux différents types de kératine présents dans les couches de l'épiderme. Le NAD(P)H, ainsi que

les flavines, semblent moins contribuer à cette fluorescence, sûrement à cause de la méthode de fixation du tissu (voir section 4.3.2.1). La kératine, le NAD(P)H et les flavines constituent donc les principaux fluorophores de l'épiderme. Les zones noires rondes ou un peu allongées correspondent aux noyaux des cellules qui ne fluorescent pas. Dans la partie supérieure de l'épiderme on distingue la couche cornée, formée de cellules mortes, complètement kératinisées et qui n'ont plus des noyaux. Ces cellules accolées les unes aux autres forment des lamelles souples et résistantes qui se desquament (Fig. 2.10-1) peu à peu au cours du temps. La membrane basale de la peau est fortement ondulée et donne aussi cet aspect ondulé à l'épiderme (voir aussi Fig. 2.9 en haut à gauche). Au niveau du derme (Fig. 2.10-3, 4), le signal de fluorescence est dû à l'élastine,

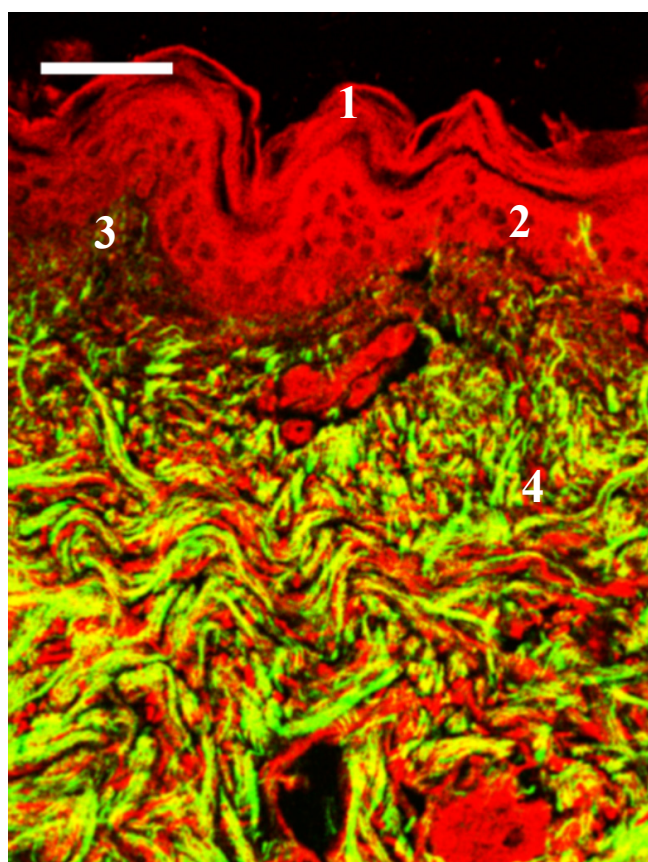


FIG. 2.10 – Image combinée SHG (vert)/2PEF (rouge) de biopsie de peau humaine (45 ans) d'épaisseur 6 μm . Les numéros indiquent : 1 - couche cornée, 2 - épiderme, 3 - papille dermique et 4 - derme. Objectif 20 $\times$ (O.N.=0.8), puissance d'excitation 25 mW à 860 nm, temps d'acquisition 7 s. Échelle 50 μm .

composante des fibres élastiques. En ce qui concerne le signal SHG, celui-ci est probablement dû aux différents collagènes fibrillaires (III et V) présents dans le derme, voire aux fibrilles d'ancrage au niveau du derme papillaire (Fig. 2.10-3). Mais la source majoritaire du signal SHG dans la peau est représentée par le collagène fibrillaire de type I. Donc, le derme peut être visualisé en

microscopie multiphoton grâce aux signaux de fluorescence de l'élastine et de SHG du collagène fibrillaire (voir section 2.1).

Au cours du vieillissement, la peau subit des modifications progressives : le nombre de fibres de collagène diminue, elles deviennent plus rigides et se désorganisent, les fibres élastiques s'épaississent et perdent leur élasticité. La microscopie multiphoton permet de suivre ces modifications au cours du temps. Des images combinées SHG/2PEF de biopsies de peau humaine de différents âges (15, 30, 45 et 70 ans) sont montrées dans la Fig. 2.11. Ces images présentent des différences qualitatives au niveau de la structure de la peau, notamment le derme, que nous avons attribué au vieillissement cutané. Une différence significative entre ces biopsies est ob-

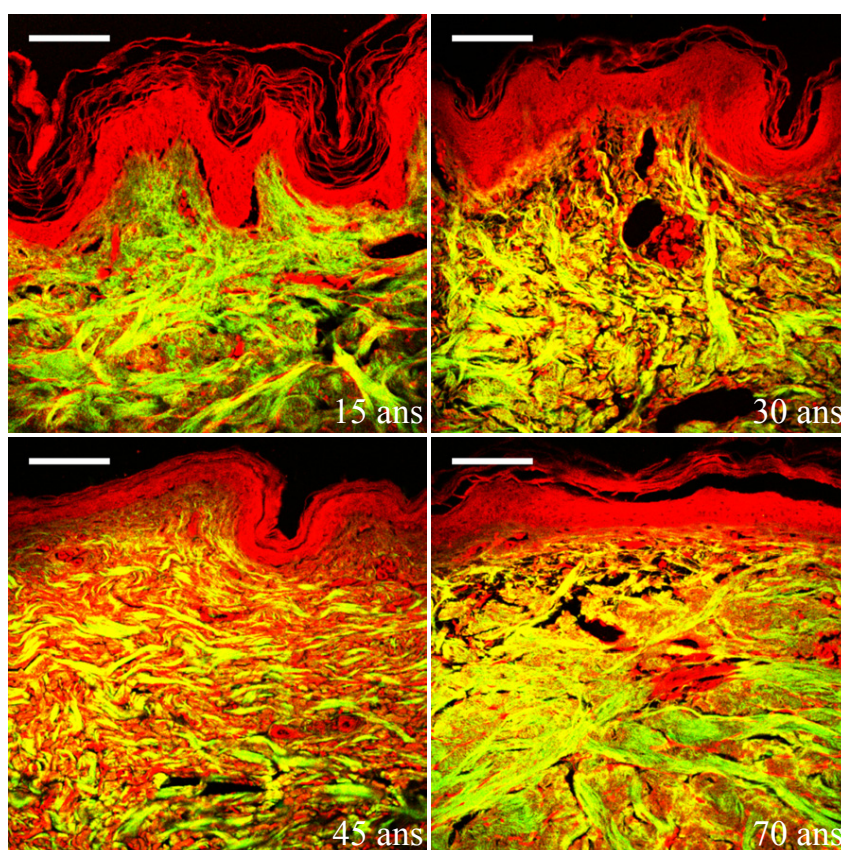


FIG. 2.11 – Images combinées SHG (vert)/2PEF (rouge) de biopsies de **peau humaine** d'épaisseur $6\ \mu\text{m}$. Objectif $20\times$ (O.N.=0.8), puissance d'excitation $30\ \text{mW}$ à $860\ \text{nm}$, temps d'acquisition $15\ \text{s}$. Échelle $100\ \mu\text{m}$.

servée pour la jonction dermo-épidermique (membrane basale). Celle-ci est fortement ondulée pour les peau jeunes et s'aplanit de plus en plus au cours du vieillissement. Ces images montrent que la microscopie multiphoton est une technique adaptée pour visualiser et évaluer des modifications encourues durant le vieillissement cutané, ou des changements dus à des processus physiopathologiques au niveau de la peau ou de la matrice extracellulaire en général.

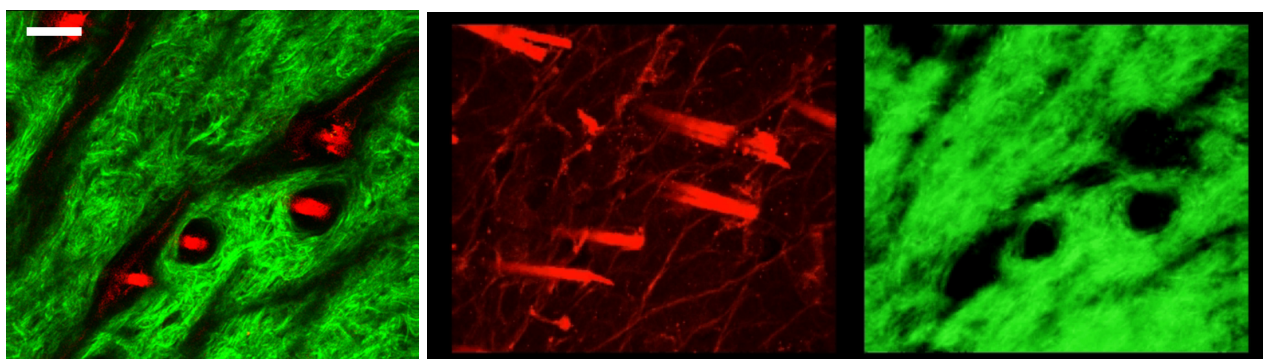


FIG. 2.12 – Images combinées SHG (vert)/2PEF (rouge) de biopsies de peau du dos de souris : a) visualisation sous forme de film ; b) reconstruction 3D de la même zone. Objectif 20 $\times$ (O.N.=0.8), puissance d'excitation 18 mW à 860 nm, temps d'acquisition 6.7 s. Pile de 50 images ($372 \times 320 \mu\text{m}^2$) espacées de 2 μm . Barre d'échelle : 50 μm .

L'architecture tridimensionnelle de la peau peut être visualisée facilement en microscopie multiphoton. Pour cela, il suffit d'acquérir une pile d'images SHG/2PEF et les visionner sous la forme d'un film ou faire une reconstruction 3D. Un exemple de ce type est montré dans la Fig. 2.12. Celle-ci présente des images *ex vivo* de biopsie de peau du dos de souris (C57black6) acquises en épiscopie pour une excitation à 860 nm. On distingue l'épiderme, ainsi que les poils en 2PEF et le collagène fibrillaire du derme en SHG.

Une application prometteuse de l'imagerie multiphoton de la peau est la possibilité de suivre des modifications spectroscopiques et/ou morphologiques dues à diverses pathologies cutanées. Pour cela, la connaissance de la signature spectroscopique de la peau humaine saine est essentielle. Nous allons présenter dans la section suivante une caractérisation spectroscopique de la kératine.

2.4 Étude de la kératine - protéine de l'épiderme humain

Plusieurs études sur la peau ont été menées jusqu'à présent en microscopie multiphoton [Masters et al., 1997, König and Riemann, 2003, Cox et al., 2003, Sun et al., 2003]. Mais celles-ci manquent d'une caractérisation complète des sources de contraste endogène de la peau, plus précisément de la kératine. Les signaux de fluorescence de l'épiderme ont été attribués à cette protéine sur des considérations histologiques [König and Riemann, 2003, Wu et al., 2004]. En revanche, aucune donnée n'existait dans la littérature sur les propriétés de fluorescence de la kératine, et notamment sur son spectre d'excitation 2PEF. Dans la suite, nous présenterons les expériences de spectroscopie de fluorescence excitée à 1 ou 2 photons *in vitro* sur kératine purifiée à partir de l'épiderme humain et *in situ* sur des biopsies de peau humaine.

2.4.1 Théorie et principe de l'expérience

Analyse théorique Considérons le cas d'une molécule, vue comme un simple dipôle électrique. Sous l'action d'un champ électrique extérieur, les déplacements en sens inverse des charges positives et négatives se traduisent par l'apparition d'un dipôle électrique induit, que l'on caractérise par son moment dipolaire $\boldsymbol{\mu}$ [Shen, 1984, Boyd, 2003]. Celui-ci est décrit par l'expression :

$$\boldsymbol{\mu} = \boldsymbol{\mu}_0 + \boldsymbol{\alpha} \cdot \mathbf{E} + \frac{1}{2} \cdot \boldsymbol{\beta} \cdot \mathbf{E} \cdot \mathbf{E} + \frac{1}{6} \cdot \boldsymbol{\gamma} \cdot \mathbf{E} \cdot \mathbf{E} \cdot \mathbf{E} + \dots \quad (2.3)$$

où $\boldsymbol{\alpha}$ désigne la polarisabilité linéaire, et $\boldsymbol{\beta}$, $\boldsymbol{\gamma}$ les hyperpolarisabilités du second et du troisième ordres de la molécule². Le terme $\boldsymbol{\mu}_0$ représente le moment dipolaire permanent de la molécule, et il est non nul seulement pour des molécules non centrosymétriques. Pour un ensemble de molécules, la polarisation macroscopique résulte de la somme vectorielle de tous les moments dipolaires contenus dans un volume V :

$$\mathbf{P} = \frac{1}{V} \sum_i \boldsymbol{\mu}_i \quad (2.4)$$

et elle s'écrit en fonction du champ électrique sous la forme :

$$\mathbf{P} = \mathbf{P}_0 + \epsilon_0 \cdot (\boldsymbol{\chi}^{(1)} \cdot \mathbf{E} + \boldsymbol{\chi}^{(2)} \cdot \mathbf{E} \cdot \mathbf{E} + \boldsymbol{\chi}^{(3)} \cdot \mathbf{E} \cdot \mathbf{E} \cdot \mathbf{E} + \dots) \quad (2.5)$$

où ϵ_0 désigne la permittivité du vide, $\boldsymbol{\chi}^{(1)}$ la susceptibilité linéaire du milieu, et $\boldsymbol{\chi}^{(2)}$, $\boldsymbol{\chi}^{(3)}$ les susceptibilités non-linéaires du second, respectivement du troisième ordre du milieu. De nouveau, une polarisation macroscopique permanente $\mathbf{P}_0$ du milieu peut être introduite dans l'expression du $\mathbf{P}$, pour des distributions anisotropes de dipôles permanents.

La partie imaginaire de l'hyperpolarisabilité du troisième ordre, $Im(\gamma)$ intervient lors des processus se produisant avec échange d'énergie, comme l'absorption à deux photons. Celle-ci est caractérisée par une section efficace d'absorption à deux photons, donnée par l'expression :

$$\sigma_2 = \frac{4\pi^2 \hbar \omega^2}{n^2 c^2} Im(\gamma) \quad (2.6)$$

avec n indice de réfraction du milieu, c la célérité de la lumière et $\hbar \omega$ l'énergie des photons incidents. La section d'absorption à deux photons s'exprime en $cm^4 s/photon$ ou GM (Göppert-Mayer) : $1GM = 10^{-50} cm^4 s/photon$.

Comme il a été discuté dans la section 1.1, la fluorescence créée par l'absorption à deux photons est appelée fluorescence excitée à deux photons (2PEF). Puisque la génération d'un photon de fluorescence nécessite l'absorption de deux photons d'excitation, le nombre total de photons de fluorescence émis par unité de temps F , varie avec le carré de l'intensité incidente I :

$$F = \frac{1}{2} N \eta \sigma_2 I^2 \quad (2.7)$$

²Il existe dans la littérature, une ambiguïté au niveau de l'appellation des paramètres $\boldsymbol{\beta}$, $\boldsymbol{\gamma}$. Nous avons choisi d'utiliser la terminologie utilisée dans la référence [Boyd, 2003]

où N désigne le nombre de molécules fluorescentes et η le rendement quantique de fluorescence. Celui-ci caractérise l'efficacité du processus de fluorescence à deux photons et il est défini comme le rapport entre le nombre de molécules fluorescentes et le nombre total de molécules excitées. Le facteur $1/2$ est inséré par convention quand F est exprimé en unité de *photons/s*, donc I en unité de *photon/s/cm²*.

Le produit $\eta\sigma_2$ est appelé section efficace de fluorescence à deux photons (two photon action cross section), que nous allons désigner par σ_{2PEF} . Le nombre total de photons émis par unité de temps est alors :

$$F = \frac{1}{2}N\sigma_{2PEF}I^2 \quad (2.8)$$

La section efficace de fluorescence à deux photons d'une molécule peut donc être calculée à partir de cette expression, connaissant les paramètres N et I .

Principe des expériences - échantillons, dispositifs expérimentaux Nous allons décrire maintenant les expériences de spectroscopie linéaire et non-linéaire, effectuées *in vitro* sur kératine purifiée à partir de l'épiderme humain [Eichner and Kahn, 1990], et *in situ* sur des biopsies de peau humaine. La kératine a été achetée chez Sigma-Aldrich (référence K0253, en solution dans 8 M urée, 50 mM Tris, 0.1 M β -mercapto-éthanol et 0.1 % azide de sodium) et dissoute dans l'urée à une concentration de 30 mg/ml. Cette solution est un mélange de différents types de kératine (cytokératines) présents dans les couches de l'épiderme. Les cytokératines ont des masses moléculaires comprises entre 45 et 60 kDa.³ Pour la détermination du spectre d'excitation 2PEF de la kératine nous avons utilisé une valeur moyenne de 53 kDa pour la masse moléculaire. Les mesures spectroscopiques de la solution de kératine ont été effectuées dans une cuve de quartz de chemin optique de 100 μ m (QS-106 Hellma). Les mesures spectroscopiques *in situ* ont été effectuées sur des biopsies de peau humaine d'épaisseur 6 μ m (fixées avec du paraformaldéhyde à 4 % en volume puis incluses dans la paraffine). Tous les échantillons proviennent de patients sains, âgés de 30 ans et qui n'ont pas de maladies cutanées, ni de maladies systémiques.

a) Spectroscopie linéaire Les spectres d'absorption de la kératine en solution ont été mesurés à l'aide d'un spectrophotomètre CARY500 (Varian) et les spectres de fluorescence excitée à 1 photon, à l'aide d'un spectrofluorimètre Hitachi F-4500.

b) Spectroscopie non-linéaire Les mesures des spectres de fluorescence excitée à deux photons, ainsi que les mesures du spectre d'excitation 2PEF de la kératine (détermination de sa section efficace de fluorescence σ_{2PEF}) ont été faites à l'aide d'un spectrofluorimètre à deux photons construit au laboratoire (voir Fig 2.13). La source d'excitation est un laser Titane-Saphir (Tsunami, Spectra-Physics), accordable dans la gamme de longueurs d'onde 700 nm - 990 nm avec des impulsions de l'ordre de 100 fs à un taux de répétition de 82 MHz. On change la

³1 Da= $1,66 \cdot 10^{-27}$ kg.

puissance du faisceau exciteur en utilisant une lame demi-onde (lame $\lambda/2$ sur la figure), suivie d'un prisme de Glan. Ensuite, le faisceau est redimensionné à l'aide d'un télescope (lentilles L_1 et L_2), afin qu'il remplisse entièrement la pupille arrière de l'objectif (Olympus, 20 $\times$, O.N.=0.4., air). Puis, il est focalisé à l'intérieur de la cuve de quartz dans la solution de kératine.

Le signal de fluorescence créé est détecté en épiscollection à travers l'objectif focalisant. Il se réfléchit sur le miroir dichroïque (700DCXRU, Chroma) et il est focalisé soit directement sur le tube photomultiplicateur (H5783P, Hamamatsu), soit sur la fente d'entrée d'un spectromètre (H10 Jobin Yvon). Dans le premier cas, on détecte tout le signal de fluorescence à travers des

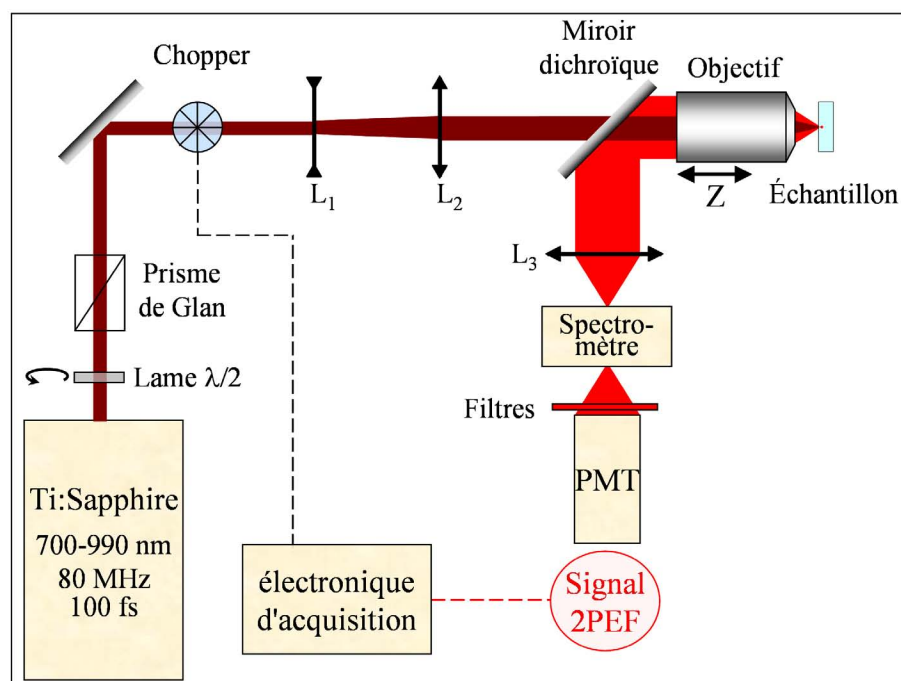


FIG. 2.13 – **Spectrofluorimètre à deux photons** : l'échantillon à étudier est excité avec un faisceau laser fs (marron), puis le signal de fluorescence 2PEF (rouge) est détecté en réflexion à travers l'objectif. Ensuite, il est séparé du faisceau exciteur par un miroir dichroïque et focalisé avec la lentille L_3 sur le tube photomultiplicateur (PMT), permettant ainsi une mesure du spectre d'excitation 2PEF de l'échantillon. Un spectromètre peut être inséré devant le PMT pour des mesures de spectres de fluorescence.

filtres appropriés qui permettent d'éliminer les éventuelles réflexions du faisceau exciteur par le miroir dichroïque. Ensuite, en faisant varier la longueur d'onde d'excitation, nous pouvons étudier la variation de l'intensité du signal de fluorescence avec la longueur d'onde. Cela permet d'accéder au spectre d'excitation 2PEF de la kératine.

Deuxièmement, nous pouvons insérer un spectromètre motorisé devant le tube photomultiplicateur et déterminer le spectre de fluorescence émis par la kératine. Ce dispositif expérimental

permet d'obtenir des spectres de fluorescence dans la gamme de longueurs d'onde 350 - 700 nm avec une résolution de typiquement 1 nm à 500 nm pour des fentes de 0.1 mm.

Pour l'acquisition du signal, nous avons utilisé une détection synchrone à 160 Hz (chopper). Celle-ci permet durant une demi-période de modulation de mesurer le bruit, et de le séparer du signal d'intérêt acquis durant l'autre demi-période. Nous faisons une moyenne sur un nombre variable des mesures, par exemple 20, et l'écart quadratique moyen fournit l'incertitude de la mesure. La réponse spectrale du système a été calibrée avec une solution de fluorescéine à pH=11 et à une concentration de $5.5 \mu\text{mol/l}$, en utilisant les données publiées dans la référence [Xu and Webb, 1996].

c) Microscopie multiphoton Pour l'imagerie combinée SHG/2PEF de biopsies de peau humaine, nous avons utilisé le microscope multiphoton décrit dans la section 1.2. Les mesures de spectres de fluorescence ont été faites à l'aide d'un filtre interférentiel accordable (voir Fig. 1.4). Ce dispositif permet d'acquérir une image pour chaque longueur d'onde et à partir de la pile d'images de mesurer le spectre de fluorescence émis à différents endroits de la peau.

2.4.2 Résultats expérimentaux

a) Spectroscopie linéaire - 1PA, 1PEF *in vitro* Nous avons tout d'abord déterminé les spectres d'absorption et de fluorescence excitée à 1 photon (1PEF) de la kératine. Les résultats sont résumés sur la Fig. 2.14. La kératine présente un premier pic d'absorption autour de 277

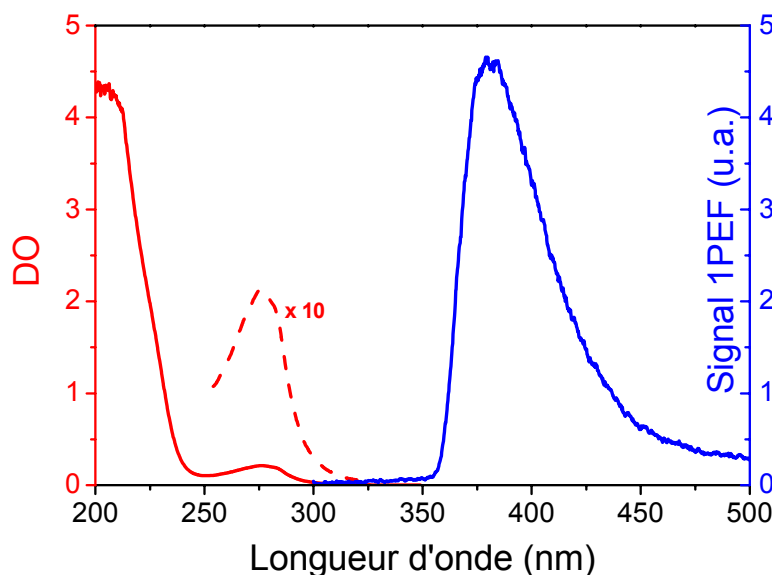


FIG. 2.14 – Spectres d'absorption (en rouge) et de fluorescence 1PEF (en bleu) d'une solution de kératine mesurés dans une cuve de quartz de chemin optique de $100 \mu\text{m}$. Concentration kératine = 30 mg/ml.

nm avec une largeur à mi-hauteur de 30 nm et un deuxième pic d'absorption autour de 210 nm. Le premier pic, caractéristique des acides aminés aromatiques (tyrosine, tryptophane), est de faible intensité, montrant que la kératine est constituée principalement d'acides aminés non aromatiques. Le deuxième pic correspond à l'absorption de la chaîne polypeptidique. Ensuite, nous avons excité la kératine à 277 nm et mesuré son spectre de fluorescence excitée à 1 photon. Ce spectre présente un maximum autour de 382 nm (qui est probablement attribuable au tryptophane). Nous n'avons pas observé de fluorescence pour une excitation 1PEF à 210 nm.

b) Spectroscopie non-linéaire - 2PEF *in vitro* Nous avons cherché à caractériser la fluorescence de la kératine dans la gamme de longueurs d'onde (laser Titane-Saphir) utilisées en microscopie multiphoton. A l'aide du spectrofluorimètre à 2 photons nous avons déterminé les spectres de fluorescence de la kératine pour des excitations entre 750 - 900 nm. Nous n'avons pas observé de fluorescence de la solution d'urée dans laquelle la kératine a été dissoute. Si on regarde le pic d'absorption de la kératine à 277 nm, celui-ci correspond à une absorption à deux photons (2PA) vers 554 nm, c'est-à-dire en dehors de la gamme du laser Titane-Saphir, et à une absorption à 3 photons (3PA) vers 831 nm. Pour vérifier de quel type d'excitation il s'agit, nous avons déterminé la variation de l'intensité du signal de fluorescence de la kératine avec la puissance incidente pour une excitation à 800 nm. Ces résultats sont représentés en échelle

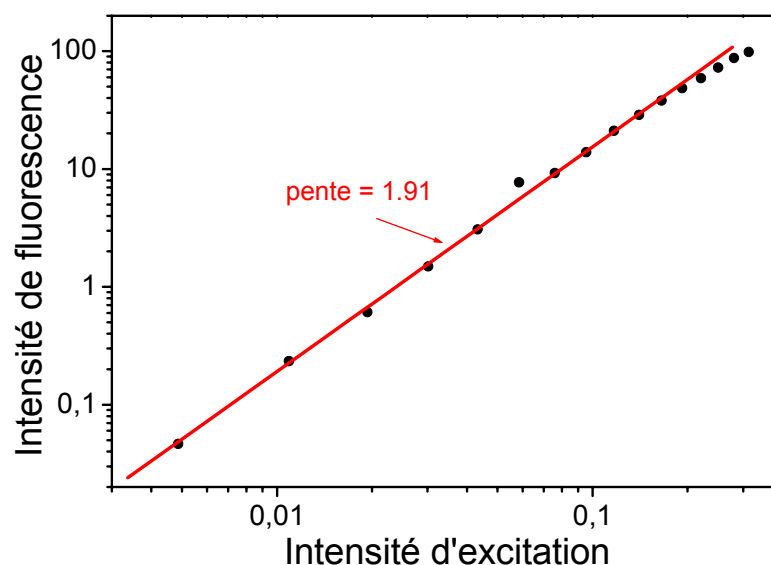


FIG. 2.15 – Variation de l'intensité du signal de fluorescence de la kératine avec la puissance incidente pour une excitation à 800 nm.

logarithmique sur la Fig. 2.15. La pente de la droite obtenue par ajustement linéaire des données expérimentales est de 1.91 ± 0.06 . Ce résultat est en bon accord avec une dépendance quadratique de l'intensité de fluorescence avec la puissance d'excitation si l'on tient compte l'incertitude sur la mesure de la puissance. Ceci montre qu'il s'agit bien d'une excitation à deux photons de la

kératine dans la gamme de longueurs d'onde du laser. Cependant, il faut noter que cette gamme n'est pas adaptée à une excitation optimale de la kératine, comme il est illustré sur la Fig. 2.16. Le pic de fluorescence se décale vers l'UV quand on diminue la longueur d'onde d'excitation et même pour une excitation à 750 nm, le maximum de fluorescence reste décalé par rapport au maximum de fluorescence 1PEF à 382 nm.

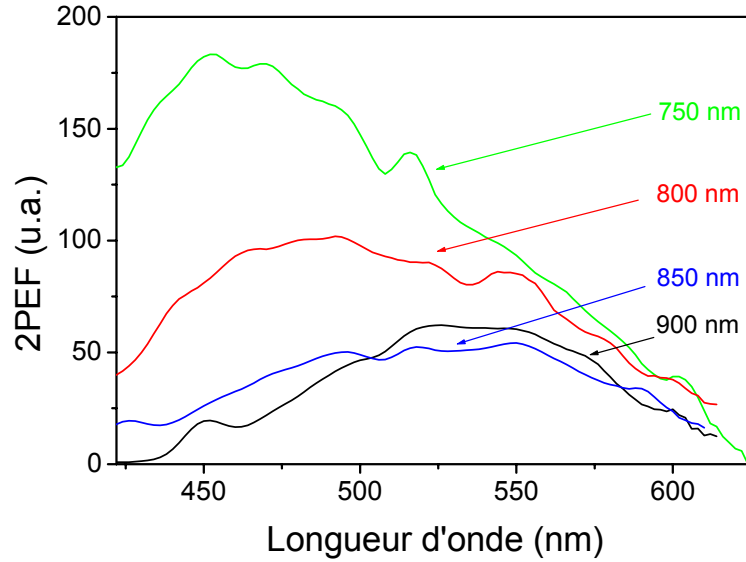


FIG. 2.16 – **Spectres 2PEF de la kératine** obtenus pour différentes longueurs d'onde d'excitation, normalisés par rapport à la puissance d'excitation.

La Fig. 2.17 illustre le spectre d'excitation 2PEF de la kératine. Ce spectre a été déterminé par comparaison avec un étalon, la fluorescéine, dont on connaît la section efficace d'absorption à 2 photons (σ_2) [Xu and Webb, 1996]. Nous avons utilisé une valeur de 0.9 pour le rendement quantique de fluorescence η de la fluorescéine sur tout le spectre d'excitation. Pour ces expériences la solution de fluorescéine était à pH=11, comme dans les mesures de Xu, et à une concentration molaire $5.5 \mu\text{mol/l}$. Pour la détermination de la section efficace de fluorescence de la kératine nous avons utilisé une valeur de 53 kDa pour la masse moléculaire de la kératine. Cette valeur est en effet la moyenne des masses moléculaires des différents types de kératine présents dans la solution. Par conséquent, la section efficace 2PEF de la kératine doit être considérée comme une valeur moyenne de ces kératines.

Le principe est le suivant : pour chaque longueur d'onde d'excitation nous mesurons l'intensité du signal de fluorescence de la kératine S_k et de la fluorescéine S_f dans les mêmes conditions expérimentales. A partir de ces signaux, et connaissant les concentrations molaires des solutions C_f , C_k ainsi que la section efficace 2PEF de la fluorescéine σ_{2PEFf} , nous pouvons calculer la section efficace 2PEF de la kératine σ_{2PEFk} :

$$\frac{S_k}{S_f} = \frac{\sigma_{2PEFk} \cdot N_A \cdot V_{exc} \cdot C_k \cdot I_k}{\sigma_{2PEFf} \cdot N_A \cdot V_{exc} \cdot C_f \cdot I_f} \quad (2.9)$$

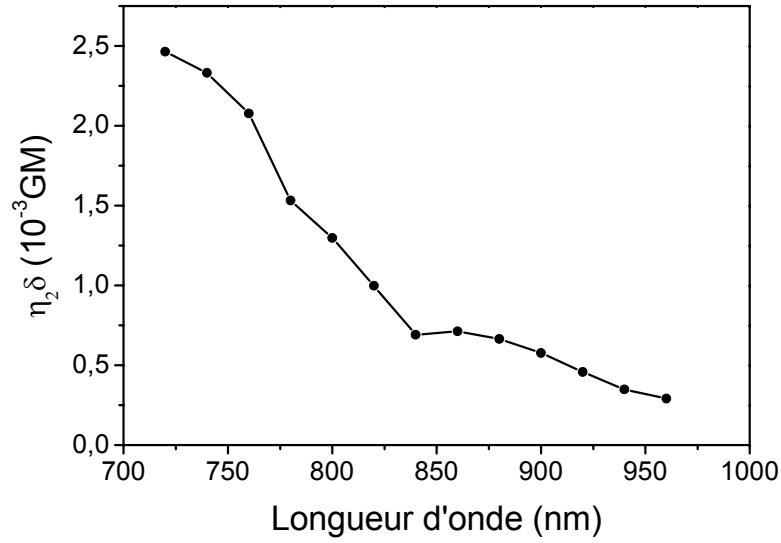


FIG. 2.17 – **Spectre d'excitation 2PEF de la kératine** (émission large bande).
La barre d'erreur est de ± 20 % et l'incertitude relative est de 37 %.

où N_A est le numéro d'Avogadro, V_{exc} le volume d'excitation et I_k , I_f les intensités d'excitation pour chaque solution.

Comme l'illustre la Fig. 2.17, la section efficace 2PEF de la kératine augmente pour les petites longueurs d'onde et compte tenu du pic d'absorption à 1 photon vers 277 nm, son maximum se situe probablement en dessous de 700 nm. La valeur mesurée est de l'ordre de 10^{-3} GM, déterminée avec une incertitude relative de ± 42 % qui comprend l'incertitude sur la concentration molaire de la solution de kératine et l'incertitude de mesure du σ_2 pour la fluorescéine (donnée dans la référence [Xu and Webb, 1996]). Il faut souligner que la kératine a une section efficace 2PEF de même ordre de grandeur que d'autres fluorophores endogènes comme, par exemple, le NAD(P)H, mais beaucoup plus petite que la section efficace 2PEF de la fluorescéine.

c) Microscopie multiphoton - 2PEF *in situ* Dans les paragraphes précédents nous avons montré les expériences de spectroscopie linéaire et non-linéaire *in vitro* de la kératine. Compte tenu de ces résultats nous avons voulu comparer le spectre de fluorescence de la kératine purifiée à celui mesuré *in situ* sur des biopsies de peau humaine saine.

La Fig. 2.18a montre une image multiphoton de biopsie humaine excitée à 860 nm. Comme nous l'avons déjà présenté dans la section 2.3, nous avons attribué le signal de fluorescence des couches supérieures de l'épiderme à la kératine, sur des considérations morphologiques. Dans le derme le signal de fluorescence correspond aux fibres élastiques et le signal SHG au collagène fibrillaire, essentiellement du collagène de type I. Du fait que la couche cornée de l'épiderme est formée de cellules mortes complètement kératinisées, le spectre de fluorescence mesuré dans cette zone sera majoritairement dû à la kératine.

Nous avons déterminé ces spectres pour des excitations à 760 nm et 860 nm, à l'aide du filtre interférentiel accordable. Les résultats obtenus sont montrés dans la Fig. 2.18b pour une excitation à 860 nm. En effet, nous avons représenté la moyenne de l'intensité du signal acquis dans les zones illustrées sur la Fig. 2.18a. Durant l'acquisition des spectres de fluorescence de la

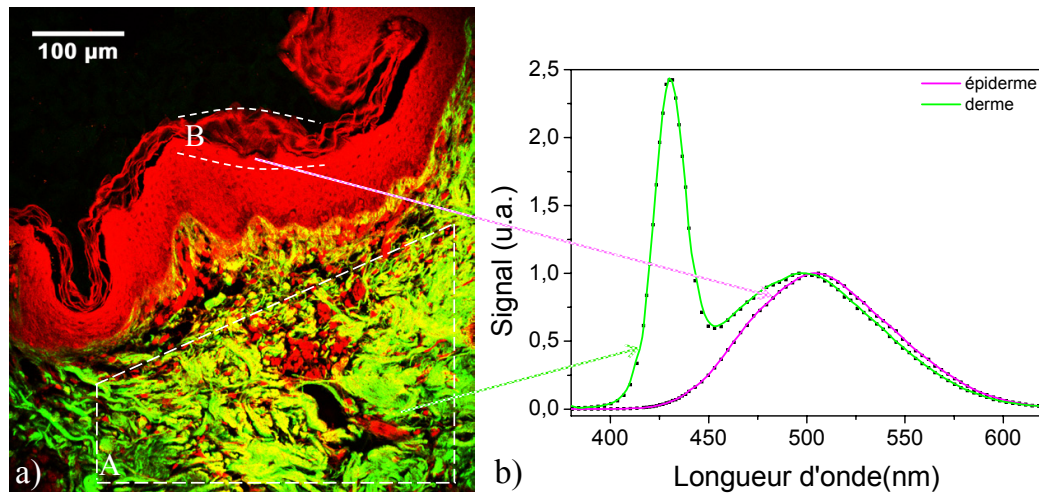


FIG. 2.18 – Microscopie multiphoton et analyse spectroscopique de la peau. a) Image combinée SHG (vert)/2PEF(rouge) de biopsie de peau humaine saine (30 ans) ; b) spectres de fluorescence et de génération de seconde harmonique de la peau (voir Tab. 2.3). Excitation à 860 nm.

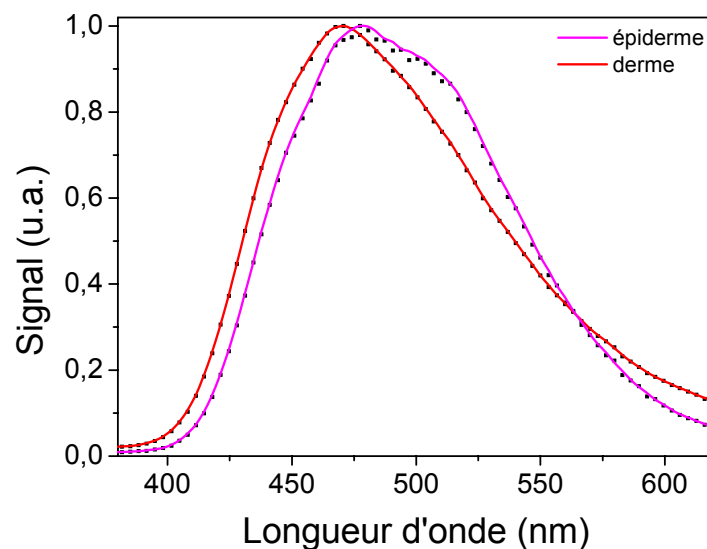


FIG. 2.19 – Spectres de fluorescence de la peau acquis dans les zones illustrées sur la Fig. 2.18a, pour une excitation à 760 nm.

peau, nous avons observé une décroissance du signal de l'ordre de 15 %, après 8 min et pour une puissance d'excitation de 25 mW. Pour corriger le signal de cette décroissance durant l'acquisition de la pile d'images, le signal total de fluorescence a simultanément été acquis en transmission sur la deuxième voie du microscope afin de normaliser le signal résolu spectralement.

Le spectre acquis dans le derme (zone A) présente un pic étroit à 430 nm, dû à la SHG du collagène fibrillaire, suivi d'un second pic plus large que nous avons attribué au signal 2PEF de l'élastine. Au contraire, le spectre acquis dans la couche cornée (zone B) présente un seul pic caractéristique de la fluorescence. Les spectres acquis dans les mêmes zones pour une excitation à 760 nm sont donnés dans la Fig. 2.19.

L'ensemble de ces résultats, ainsi que les mesures *in vitro* sur kératine purifiée effectuées pour les mêmes longueurs d'onde d'excitation sont récapitulés dans le Tab. 2.3. Nous remarquons que la position des maxima de fluorescence mesurés *in situ* se décale vers le bleu quand la longueur d'onde d'excitation diminue. Ceci est un bon accord avec les mesures en solution et cela montre de nouveau que la gamme de longueurs d'onde utilisées n'est pas optimale pour exciter la kératine. Cependant, dans ces conditions d'excitation, la kératine présente un signal de fluorescence du

$\lambda_{excitation}$	760 nm	860 nm	Attribution
Zone A	471±3 nm	496±3 nm	Elastine (et SHG collagène)
Zone B	477±3 nm	503±3 nm	Kératine
Kératine en solution	475±5 nm	515±5 nm	

TAB. 2.3 – **Positions des maxima de fluorescence 2PEF** mesurés dans les zones indiquées sur la Fig. 2.18a.

même ordre de grandeur que le signal de l'élastine. Ce signal est donc suffisamment important pour permettre la visualisation des couches épidermiques en microscopie multiphoton.

Les positions des maxima de fluorescence obtenus pour les fibres élastiques du derme sont en bon accord avec les données trouvées dans la littérature pour la peau [Zipfel et al., 2003a, Buehler et al., 2005]. Le pic à 471 nm obtenu pour une excitation à 760 nm est un peu décalé par rapport au maximum d'émission à 445 nm que nous avons mesuré auparavant au laboratoire pour l'élastine en poudre (protéine non soluble), extraite à partir de l'aorte humaine (référence E6777, Sigma-Aldrich). Tout de même, il faut rappeler que les spectres de fluorescence de l'élastine semble beaucoup dépendre du type de tissu et du mode d'extraction de l'élastine pour les expériences *in vitro*.

En ce qui concerne la kératine, les spectres de fluorescence mesurés *in situ* et *in vitro* se ressemblent. Les petites différences sont probablement dues au mode d'extraction de la kératine, voire à la dénaturation de celle-ci dans la solution d'urée. Par conséquent, le signal de fluorescence observé dans les couches supérieures de l'épiderme est attribué à la kératine. Nous avons aussi observé que les autres fluorophores endogènes de la peau, comme le NAD(P)H, les flavoprotéines ou la mélanine, semblent moins contribuer au signal de fluorescence de l'épiderme, ceci étant

probablement dû à la méthode de préparation des biopsies. Nous avons confirmé cette observation dans le cadre de l'imagerie du poumon (voir section 4.3.2.1, page 93).

Conclusions Nous avons fait une analyse spectroscopique linéaire et non-linéaire du signal de fluorescence de la kératine *in vitro*. Plus précisément, nous avons mesuré ses spectres de fluorescence 1PEF et 2PEF et nous avons déterminé sa section efficace de fluorescence 2PEF. Ensuite, nous avons visualisé par microscopie multiphoton des biopsies de peau humaine et, compte tenu des résultats obtenus *in vitro*, nous avons attribué le signal de fluorescence des couches supérieures de l'épiderme à la kératine. Ainsi, cette étude fournit une caractérisation complète du signal de fluorescence des kératines de l'épiderme humain sain et il sera d'intérêt pratique pour étudier les pathologies de la peau. Ces travaux ont donné lieu à une publication dans le journal Optics Express [Pena et al., 2005b].

2.5 Conclusion

Nous avons présenté dans ce chapitre les principales sources de contraste endogène cellulaires et tissulaires pour la microscopie multiphoton. Ensuite, nous avons démontré les potentialités de cette nouvelle technique, liées à sa résolution micrométrique, à sa faible invasivité et à la grande spécificité des signaux de sources différentes à l'intérieur du même échantillon, pour l'imagerie des artères et de la peau. Dans la dernière partie, une étude de caractérisation spectroscopique de la kératine de l'épiderme humain a été présentée, absolument nécessaire pour la compréhension des signaux observés en imagerie multiphoton. Nous avons aussi montré que la microscopie multiphoton combinée à une analyse spectroscopique des sources de contraste est un outil prometteur pour l'imagerie des tissus. Soulignons enfin qu'il est très prometteur d'utiliser cette technique pour une problématique médicale, car cela permet de pousser les expériences dans la bonne direction pour répondre aux différentes questions soulevées dans ce contexte. C'est le cas des expériences présentées dans les chapitres suivants qui abordent l'étude du collagène au niveau moléculaire et à l'échelle macroscopique dans le cadre de l'imagerie de la fibrose.

Chapitre 3

Génération de seconde harmonique par le collagène

Motivations Les collagènes constituent la classe protéique majoritaire de la matrice extracellulaire et jouent un rôle central dans la formation des structures fibrillaires et microfibrillaires, des membranes basales, ainsi que d'autres structures du tissu conjonctif [Bateman et al., 1996]. Comme il a été présenté dans le deuxième chapitre, page 18, l'existence d'un signal SHG du collagène (type I) a été mise en évidence dès 1986 sur des tendons de queue de rat [Roth and Freund, 1979, Freund and Deutsch, 1986, Freund et al., 1986]. Suite au développement de la microscopie optique non-linéaire, une grande variété de tissus, tels que le tendon, le muscle, les artères, la peau, les tumeurs, la cornée, la sclère (enveloppe fibreuse externe du globe oculaire), tous contenant du collagène, a pu être visualisée par microscopie SHG [Guo et al., 1997, Campagnola et al., 2002, Zipfel et al., 2003a, König and Riemann, 2003, Stoller et al., 2003, Han et al., 2005]. Il a ainsi été observé que seuls les collagènes fibrillaires, tels que le collagène de type I, génèrent un signal SHG et que les collagènes non fibrillaires, comme le collagène de type IV, ne présentent pas de signal SHG [Zipfel et al., 2003a, Brown et al., 2003]. Dans la mesure où le collagène de type I produit un fort signal SHG, ce qui est assez étonnant pour un signal endogène, il a été proposé [Campagnola et al., 2002] que son efficacité de génération de seconde harmonique soit liée à sa structure chirale en triple hélice.

Dans ce chapitre nous allons répondre à la question “Quel est le rôle du type de collagène et de la chiralité dans la génération de seconde harmonique par le collagène?”. Pour cela, nous avons étudié deux types de collagènes, le collagène I et le collagène IV, parce qu'ils n'ont pas le même comportement en microscopie SHG. Nous allons présenter une étude exhaustive de leurs propriétés chiroptiques déterminées par des expériences de génération de seconde harmonique en surface résolue en polarisation et des expériences de dichroïsme circulaire conventionnel (CD). Seront aussi présentées les principales caractéristiques de ces collagènes, ainsi que les différents types d'expériences (absorption, spectroscopie de fluorescence à 1 et 2 photons, microscopie TEM) qui ont permis la caractérisation des échantillons.

3.1 Structure et assemblage des collagènes I et IV

Les collagènes représentent la plus grande famille de protéines avec plus de 30 % du contenu total du corps humain en protéines. On connaît jusqu'à présent 27 types distincts de collagène, chacun ayant une structure, une fonction et une distribution différente dans les tissus. Le Tab. 3.1, créé d'après [Bateman et al., 1996] et [Gelse et al., 2003], regroupe les différents types des collagènes faisant partie de 8 grandes familles. On peut classer les collagènes d'après leur organisation en collagènes fibrillaires (forment des fibrilles, fibres,...) et collagènes non fibrillaires. Les collagènes fibrillaires confèrent leur résistance à des tissus comme le tendon, l'os (collagène I) et en association avec d'autres composantes de la matrice extracellulaire tels que l'élastine, ils apportent à la fois résistance et élasticité à des tissus comme la peau et les parois vasculaires. Les collagènes non fibrillaires forment des réseaux dans les membranes basales (collagène IV), ils sont impliqués dans l'organisation tridimensionnelle des fibres collagéniques (collagènes IX, XII, XIV,...) ou dans l'ancrage des tissus de recouvrement aux tissus conjonctifs sous-jacents (collagènes VII, XVII). Les collagènes non fibrillaires s'organisent en plusieurs familles : i) les collagènes formant des réseaux, ii) les collagènes FACIT (Fibril associated collagens with interrupted triple helix), iii) les collagènes microfibrillaires, iv) les collagènes formant des fibrilles d'ancrage, v) les collagènes transmembranaires ou MACIT (Membrane associated collagens with interrupted triple helix) et vi) les collagènes de la famille des multiplexines (multiple triple helix domain and interruption).

La molécule de collagène a une structure caractéristique en triple hélice droite, formée de 3 chaînes polypeptidiques, nommées chaînes α . Le domaine hélicoïdal des chaînes α présente une glycine tous les trois résidus. Cet acide aminé fait ainsi partie d'une unité tripeptidique répétitive $(GlyXY)_n$, essentielle pour la conformation en hélice gauche de chaque chaîne α . Dans 20 à 30 % des cas X est la proline et Y l'hydroxyproline. Le nombre de répétitions n varie avec le type de collagène. Dans le cas des collagènes fibrillaires ce domaine hélicoïdal est continu, il comporte environ 1000 acides aminés, alors que dans le cas des collagènes non fibrillaires il est souvent interrompu par de plus ou moins longues séquences non collagéniques¹. Étant le plus petit acide aminé, avec seulement un atome d'hydrogène dans sa chaîne latérale, la glycine occupe une position centrale dans l'hélice, tandis que les autres acides aminés X et Y ont leurs chaînes latérales dirigées vers l'extérieur. Ceci permet un assemblage compact de 3 chaînes α pour former une triple hélice droite nommée molécule de procollagène (Fig. 3.1).

La plus grande famille de collagènes, avec plus de 90 % du contenu total de collagène, est constituée par les collagènes fibrillaires : collagène I, II, III, V et XI. Parmi les collagènes fibrillaires, le collagène de type I, dont la triple hélice est un hétérotrimère formé de deux chaînes $\alpha 1(I)$ identiques et une chaîne $\alpha 2(I)$, est le plus abondant ; il se trouve dans une grande variété de tissus tels que l'os, le derme, le tendon, les ligaments, les artères, le poumon, la cornée et d'autres organes internes. Après la sécrétion de la molécule de procollagène dans la matrice extracellulaire, les

¹Un domaine collagénique est un domaine hélicoïdal continu, non interrompu par des séquences non hélicoïdales.

3.1 - Structure et assemblage des collagènes I et IV

Type et Structure	Distribution dans les tissus	Caractéristiques
<i>Collagènes fibrillaires</i>		
I, $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	os, derme, tendon, ligaments, cornée,...	le type le plus abondant
$[\alpha 1(I)]_3$	derme, dentine	forme mineure
II, $[\alpha 1(II)]_3$	cartilage, humeur vitrée, nucleus pulposus	majoritaire dans le cartilage
III, $[\alpha 1(III)]_3$	derme, paroi des vaisseaux, intestin,...	souvent associé avec le type I
V, $\alpha 1(V), \alpha 2(V), \alpha 3(V)$	poumon, cornée, os,...	peut s'associer avec le type I
XI, $\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$	cartilage, corps vitré, nucleus pulposus	associé avec le type II
<i>Coll. des membr. basales</i>		
IV, $[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV), \alpha 1 - \alpha 6$	membranes basales	forme des réseaux 2D
<i>Collagène microfibrillaire</i>		
VI, $\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI)$	derme, cartilage, placenta, poumon, paroi des vaisseaux, nucleus pulposus	s'organise en fibrilles formant un collier de perles
<i>Fibrilles d'ancrage</i>		
VII, $[\alpha 1(VII)]_3$	peau, jonctions dermo-épidermiques, muqueuse orale, cervix	
<i>Réseaux hexagonaux</i>		
VIII, $[\alpha 1(VIII)]_2\alpha 2(VIII)$	cellules endothéliales, membr. de Descemet	
X, $[\alpha 3(X)]_3$	cartilage hypertrophique	
<i>Collagènes FACIT</i>		
IX, $\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$	cartilage, corps vitré, cornée	associé avec le type II
XII, $[\alpha 1(XII)]_3$	ligament, tendon, périchondre	associé avec le type I
XIV, $[\alpha 1(XIV)]_3$	derme, tendon, placenta, poumon, paroi des vaisseaux, foie	associé avec le type I
XIX, $[\alpha 1(XIX)]_3$	rhabdomyosarcome humain	
XX, $[\alpha 1(XX)]_3$	épithélium cornéen, tendon, peau au stade embryonnaire, cartilage costal	
XXI, $[\alpha 1(XXI)]_3$	paroi des vaisseaux sanguins	
<i>Coll. transmembranaires</i>		
XIII, $[\alpha 1(XIII)]_3$	épiderme, follicule de cheveux, poumon, foie, chondrocytes, endomysium, intestin	
XVII, $[\alpha 1(XVII)]_3$	jonctions dermo-épidermiques	
<i>Multiplexines</i>		
XV, $[\alpha 1(XV)]_3$	fibroblastes, cellules musculaires lisses, rein, pancréas	
XVI, $[\alpha 1(XVI)]_3$	fibroblastes, amnios, kératinocytes	
XVIII, $[\alpha 1(XVIII)]_3$	poumon, foie	

TAB. 3.1 – Différents types de collagène et leur distribution dans les tissus.

domaines globulaires à chaque extrémité de la molécule sont clivés par des peptidases spécifiques, donnant la molécule de collagène (qui peut alors s'assembler en fibrilles). La molécule de collagène, ainsi formée, est constituée d'un domaine en triple hélice ou domaine collagénique et des courts domaines non hélicoïdaux à chaque extrémité de la triple hélice, nommées télépeptides. Ces molécules de collagène vont s'assembler pour former des fibrilles de collagène.

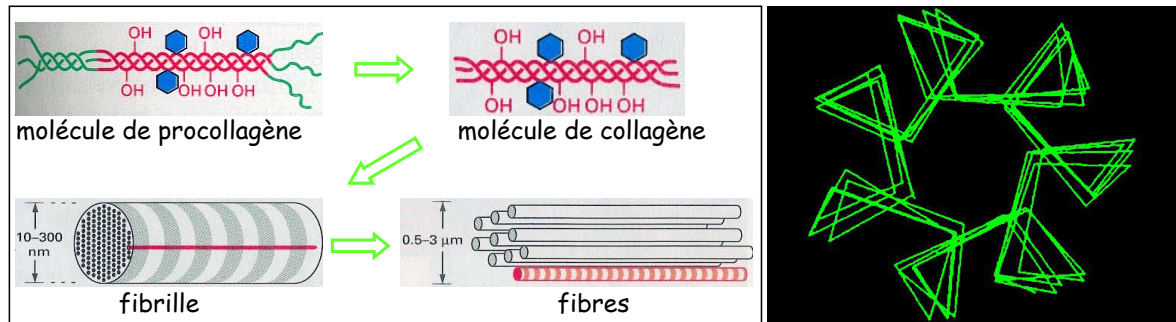


FIG. 3.1 – gauche - **Représentation schématique de l'assemblage du collagène** (tirée de [Alberts et al., 1994]); droite - **Structure conformationnelle d'une peptide de type collagène**, $(\text{Pro-Hyp-Gly})_4\text{-Glu-Lys-Gly-(Pro-Hyp-Gly)}_5$, obtenue par diffraction des rayons X (Protein Data Bank).

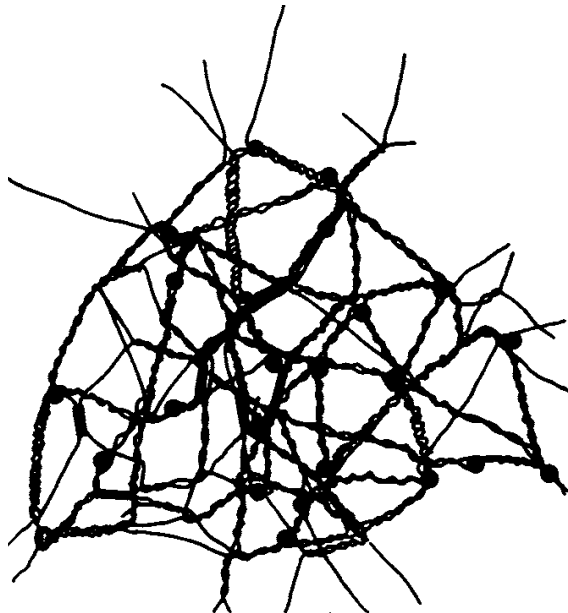


FIG. 3.2 – **Réseau bidimensionnel formé de molécules de collagène de type IV** (tirée de [Yurchenco and Schittny, 1990]).

Les fibrilles ont des diamètres compris entre 10 et 300 nm et des longueurs qui peuvent

aller jusqu'à quelques centaines de μm en fonction du tissu. Elles peuvent avoir des orientations différentes qui dépendent du type de tissu [Hulmes, 2002]. Par exemple, dans le tendon les fibrilles de collagène de type I s'alignent parallèlement et forment une fibre de collagène (Fig. 3.1), alors que dans la peau les orientations des fibrilles sont différentes et celles-ci s'entrecroisent pour former des réseaux complexes. Une fibre de collagène a un diamètre moyen compris entre 0.5 et 3 μm .

L'organisation des collagènes non fibrillaires tels que le collagène de type IV est très différente de l'organisation des collagènes fibrillaires : les molécules ne s'assemblent pas en fibrilles, mais elles forment des réseaux complexes en fonction du type de tissu. La molécule de collagène de type IV, qui fait l'objet de notre étude, est constituée de trois domaines : le domaine N-terminal, la triple hélice qui contient de nombreuses interruptions des domaines collagéniques *GlyXY*, et le domaine C-terminal. Le collagène de type IV existe majoritairement sous forme d'un hétérotrimère $[\alpha 1(IV)_2]\alpha 2(IV)$. Les nombreuses interruptions au niveau de la triple hélice "empêchent" l'assemblage en fibrilles comme pour les collagènes fibrillaires et favorisent plutôt un assemblage en réseaux. La Fig. 3.2 illustre l'organisation des molécules de collagène de type IV en réseaux bidimensionnels dans les membranes basales [Yurchenco and Schittny, 1990, Hudson et al., 1993].

3.2 Aspects théoriques de la SHG en surface

On va s'intéresser dans cette partie à la description phénoménologique de l'activité optique dans le domaine linéaire pour introduire ensuite les effets non-linéaires d'ordre deux et la génération de seconde harmonique en surface par un film mince de molécules chirales.

3.2.1 Rappels sur l'activité optique et les effets non-linéaires

Une molécule est dite chirale si elle n'est pas superposable à son image dans un miroir [Barron, 1982]. Par exemple, les molécules possédant un carbone asymétrique, c'est-à-dire un carbone relié

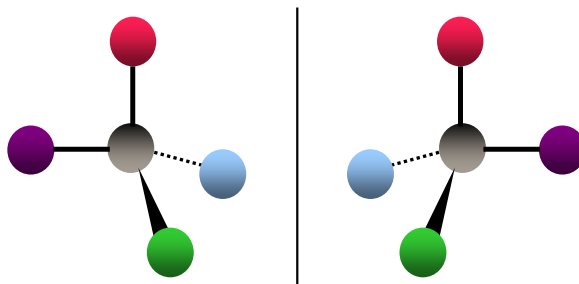


FIG. 3.3 – Illustration de deux énantiomères.

à quatre substituants différents (voir la Fig. 3.3), ainsi que l'ADN ou le collagène en forme d'hélice sont chirales. Les molécules chirales possèdent deux formes énantiomères, images l'une de l'autre dans un miroir mais non superposables, nommées lévogyre ("qui tourne vers la gauche") et dextrogyre ("qui tourne vers la droite"). Ces énantiomères ont les mêmes propriétés physiques et chimiques sauf lorsqu'il s'agit d'une interaction avec un autre objet chiral, par exemple la lumière en polarisation circulaire ou la liaison à une autre molécule chirale.

Les deux énantiomères d'une molécule chirale interagissent donc différemment avec la lumière polarisée et on parle alors d'activité optique. Cette activité optique se manifeste lors de la propagation d'un faisceau lumineux à travers une solution non racémique : par la rotation de la direction de polarisation d'une onde polarisée linéairement, ce qu'on nomme rotation optique, et par la différence d'absorption selon le sens de polarisation (circulaire droite ou gauche) de la lumière, nommée dichroïsme circulaire.

3.2.1.1 Activité optique linéaire

Dans l'approximation dipolaire électrique, lorsqu'une onde monochromatique de champ électrique $\mathbf{E}$ interagit avec une molécule chirale la réponse de celle-ci est considérée de façon **locale**, c'est-à-dire en négligeant les variations du champ électrique sur les dimensions d de la molécule. Cette approximation suppose que le paramètre d reste petit devant la longueur d'onde λ . Mais la seule différence entre les deux énantiomères d'une molécule chirale se situe au niveau de l'arrangement spatial tridimensionnel de ses atomes. Pour rendre compte de l'activité optique, il est nécessaire d'introduire une sensibilité du champ électrique à cet arrangement spatial, donc utiliser un développement spatial du champ électrique. Dans ce cas le champ vu par chaque atome sera différent. Cette approximation dite **non locale** [Akhmanov and Zharikov, 1967, Svirko and Zheludev, 1998] consiste en un développement au premier ordre en d/λ du champ électrique :

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}(0) + \mathbf{r} \cdot \nabla \mathbf{E} \quad (3.1)$$

Au premier ordre en d/λ , la réponse linéaire du milieu est constituée d'un terme de polarisation dipolaire électrique $\mathbf{P}$, mais aussi d'un terme dipolaire magnétique $\mathbf{M}$ et d'un terme quadrupolaire électrique $\mathbf{Q}$. La polarisation, l'aimantation et la quadrupolarisation rayonnent un champ électrique $\mathbf{E}(\Omega)$ qui peut être calculé à partir de l'expression [Jackson, 1975] :

$$\mathbf{E}(\Omega) \propto \left[(\mathbf{n} \times \mathbf{P}) \times \mathbf{n} - \frac{1}{c} \mathbf{n} \times \mathbf{M} - \frac{ik}{2} (\mathbf{n} \times \mathbf{Q}(\mathbf{n})) \times \mathbf{n} \right] \quad (3.2)$$

où $\mathbf{n}$ est un vecteur unitaire dans la direction d'observation et $\mathbf{Q}(\mathbf{n})$ est le tenseur de contraction de $\mathbf{Q}$ et $\mathbf{n}$.

La polarisation effective du milieu $\mathbf{P}_{eff}$ s'écrit :

$$\mathbf{P}_{eff}^{(1)}(\omega) = \mathbf{P}^{(1)}(\omega) + \frac{i}{\omega} \nabla \times \mathbf{M}^{(1)}(\omega) - \nabla \mathbf{Q}^{(1)}(\omega) \quad (3.3)$$

La non localité de l'interaction lumière-matière se traduit par une variation de cette polarisation avec le gradient du champ électrique de l'onde :

$$P_{effi}^{(1)}(\omega) = \epsilon_0 \chi_{ij}^{(1)ee}(\omega; \omega) E_j(\omega) + \epsilon_0 \chi_{effijk}^{(1)e\nabla e}(\omega; \omega) \frac{\partial}{\partial x_j} E_k(\omega) \quad (3.4)$$

où $\chi^{(1)ee}$, la susceptibilité dipolaire électrique, est un tenseur local de rang 2 et $\chi^{(1)e\nabla e}$ un tenseur non local de rang 3, comme l'indique le nombre de lettres en indice. Les milieux pour lesquels le tenseur non local est non nul présentent une **activité optique**. Les tenseurs de susceptibilité local et non local n'ont pas les mêmes propriétés, car ils n'ont pas le même ordre. Le type de symétrie du milieu leur impose certaines conditions, et en particulier peut conduire à ce que toutes les composantes du tenseur non local deviennent nulles. Par exemple, dans un liquide, c'est-à-dire un milieu isotrope, tout tenseur de rang 3 s'annule sauf si le milieu est non centrosymétrique. L'activité optique ne peut par conséquent exister dans un liquide que s'il est constitué de molécules chirales.

Les relations constitutives du milieu permettent de caractériser plus précisément le tenseur non local :

$$P_i^{(1)}(\omega) = \epsilon_0 \chi_{ij}^{(1)ee}(\omega; \omega) E_j(\omega) + \epsilon_0 \chi_{ijk}^{(1)e\nabla e}(\omega; \omega) \frac{\partial}{\partial x_j} E_k(\omega) \quad (3.5)$$

$$M_i^{(1)}(\omega) = \epsilon_0 \chi_{ij}^{(1)me}(\omega; \omega) E_j(\omega) \quad (3.6)$$

$$Q_{ij}^{(1)}(\omega) = \epsilon_0 \chi_{ijk}^{(1)qee}(\omega; \omega) E_k(\omega) \quad (3.7)$$

En symétrisant et en antisymétrisant le tenseur $\chi^{(1)e\nabla e}$ on obtient les tenseurs $\chi^{(1)eqe}$ et $\chi^{(1)em}$: la partie antisymétrique du tenseur non local conduit à des effets dipolaires magnétiques et la partie symétrique à des effets quadrupolaires électriques. Ainsi, on réécrit le terme de polarisation dipolaire électrique :

$$P_i^{(1)}(\omega) = \epsilon_0 \chi_{ij}^{(1)ee}(\omega; \omega) E_j(\omega) + \epsilon_0 \chi_{ij}^{(1)em}(\omega; \omega) B_j(\omega) + \epsilon_0 \chi_{ijk}^{(1)eqe}(\omega; \omega) \frac{\partial}{\partial x_j} E_k(\omega) \quad (3.8)$$

avec

$$\chi_{ij}^{(1)em} = \frac{1}{2} i \omega e_{jkl} \left(\chi_{ijk}^{(1)e\nabla e} - \chi_{ikj}^{(1)e\nabla e} \right) \text{ et } \chi_{ijk}^{(1)eqe} = \frac{1}{2} \left(\chi_{ijk}^{(1)e\nabla e} + \chi_{ikj}^{(1)e\nabla e} \right) \quad (3.9)$$

Maintenant on peut exprimer la polarisation effective en fonction des tenseurs non locaux :

$$\begin{aligned} \mathbf{P}_{eff}^{(1)}(\omega) = & \epsilon_0 \chi^{(1)ee}(\omega; \omega) \mathbf{E}(\omega) + \epsilon_0 \left(\chi^{(1)em}(\omega; \omega) + \chi^{(1)me}(\omega; \omega) \right) \mathbf{B}(\omega) \\ & + \epsilon_0 \left(\chi^{(1)eqe}(\omega; \omega) + \chi^{(1)qee}(\omega; \omega) \right) \nabla \mathbf{E}(\omega) \end{aligned} \quad (3.10)$$

où $\mathbf{B}$ est le champ magnétique. Il est ainsi possible de relier les tenseurs non locaux $\chi^{(1)me}$ et $\chi^{(1)em}$ aux contributions dipolaires magnétiques et les tenseurs $\chi^{(1)eqe}$ et $\chi^{(1)qee}$ aux contributions quadrupolaires électriques.

Les tenseurs de rang 3 $\chi^{(1)eqe}$ et $\chi^{(1)qee}$ sont symétriques (comme le tenseur quadripolaire $Q^{(1)}$) et les considérations de symétrie pour un liquide, i.e. un milieu isotrope, impose que leurs composantes soient nulles. Par conséquent, il n'y a pas de contributions quadripolaires électriques à l'activité optique d'un liquide chiral : les contributions à l'activité optique dans le domaine linéaire sont uniquement d'origine dipolaire magnétique.

3.2.1.2 Effets non-linéaires d'ordre 2 et activité optique

Par analogie avec le cas linéaire, la réponse dipolaire électrique effective du deuxième ordre du milieu s'écrit :

$$\mathbf{P}_{eff}^{(2)}(\omega) = \mathbf{P}^{(2)}(\omega) + \frac{i}{\omega} \nabla \times \mathbf{M}^{(2)}(\omega) - \nabla \mathbf{Q}^{(2)}(\omega) \quad (3.11)$$

avec

$$\begin{aligned} \mathbf{P}_{eff}^{(2)}(\omega) = & \epsilon_0 \chi^{(2)eee}(\omega; \omega_1, \omega_2) \mathbf{E}(\omega_1) \mathbf{E}(\omega_2) \\ & + \epsilon_0 \chi^{(2)ee\nabla e}(\omega; \omega_1, \omega_2) \mathbf{E}(\omega_1) \nabla \mathbf{E}(\omega_2) \\ & + \epsilon_0 \chi^{(2)e\nabla ee}(\omega; \omega_1, \omega_2) \nabla \mathbf{E}(\omega_1) \mathbf{E}(\omega_2), \end{aligned} \quad (3.12)$$

où $\chi^{(2)ee\nabla e}$ et $\chi^{(2)e\nabla ee}$ sont les tenseurs non locaux d'ordre 2 et de rang 4, et avec

$$\begin{aligned} \mathbf{P}^{(2)} = & \epsilon_0 \chi^{(2)eee} \mathbf{E}_1 \mathbf{E}_2 + \epsilon_0 \chi^{(2)eeqe} \mathbf{E}_1 \nabla \mathbf{E}_2 + \epsilon_0 \chi^{(2)eqee} \nabla \mathbf{E}_1 \mathbf{E}_2 \\ & + \epsilon_0 \chi^{(2)eem} \mathbf{E}_1 \mathbf{B}_2 + \epsilon_0 \chi^{(2)eme} \mathbf{B}_1 \mathbf{E}_2 \end{aligned} \quad (3.13)$$

$$\mathbf{M}^{(2)} = \epsilon_0 \chi^{(2)mee} \mathbf{E}_1 \mathbf{E}_2 \quad (3.14)$$

$$\mathbf{Q}^{(2)} = \epsilon_0 \chi^{(2)qeee} \mathbf{E}_1 \mathbf{E}_2 \quad (3.15)$$

où nous avons omis les notations fréquentielles par simplification. Il est possible de nouveau de relier les tenseurs non locaux aux contributions dipolaires magnétiques et quadripolaires électriques.

Les propriétés des tenseurs locaux et non locaux dans un milieu isotrope sont maintenant inversées par rapport au cas linéaire :

- le tenseur local de susceptibilité $\chi^{(2)eee}$ est un tenseur de rang 3 et il n'est non nul que si le milieu est non centrosymétrique. Par conséquent, dans l'approximation dipolaire électrique, il ne peut y avoir d'effet non-linéaire du second ordre² en milieu isotrope que si le milieu est chiral.
- les tenseurs non locaux de susceptibilité sont des tenseurs de rang 4 et ils sont non nuls même dans un liquide achiral. Ces tenseurs non locaux peuvent être théoriquement isolés des tenseurs locaux dans des expériences de génération de seconde harmonique, mais ces expériences présentent peu d'intérêt car il n'est pas possible d'extraire un signal spécifique de la chiralité des molécules.

²La somme de fréquence non dégénérée, non colinéaire et en polarisations croisées [Giordmaine, 1965] est le seul effet non-linéaire du second ordre possible dans un liquide chiral. Son observation expérimentale très délicate a été réalisée par [Belkin et al., 2001]

Cependant, si on considère un film isotrope de molécules chirales déposées sur une surface, de nouvelles composantes tensorielles d'ordre 2 non nulles apparaissent car il y a une double brisure de symétrie par la surface et par la chiralité des molécules. Il sera donc possible d'effectuer des expériences de **génération de seconde harmonique en surface** [Shen, 1989, Heinz, 1991], qui est une méthode classique d'investigation des surfaces. La double brisure de symétrie par la surface et par la chiralité des molécules induit un mélange de composantes chirales et achirales dans les contributions locales et non locales. Nous allons voir qu'il est possible tout de même de séparer ces contributions en jouant sur les polarisations des faisceaux fondamental et harmonique, donc de mesurer une **activité optique de second ordre**.

3.2.2 Génération de seconde harmonique en surface

La génération de seconde harmonique en surface est un outil très puissant pour l'étude des surfaces. En effet, puisque la SHG est un phénomène non-linéaire du second ordre, elle est interdite en milieu centrosymétrique donc elle est très spécifique de la surface car il y a une brisure de symétrie induite par celle-ci. Elle a aussi l'avantage d'être sensible à des couches très minces de molécules déposées sur la surface. Ce dernier point est très important car la plupart des molécules à étudier sont présentes en faibles quantités.

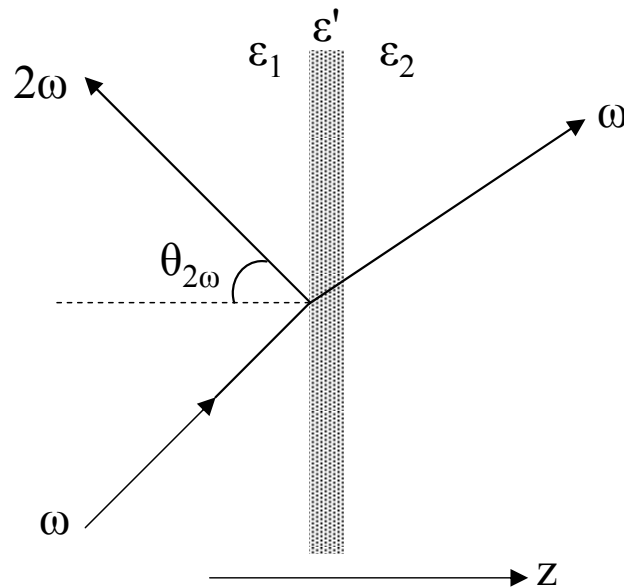


FIG. 3.4 – **Configuration expérimentale de la génération de seconde harmonique en surface.** ω est la fréquence de l'onde incidente et 2ω la fréquence de l'onde réfléchie (SHG). ϵ' est la constante diélectrique du milieu non linéaire et ϵ_1, ϵ_2 les constantes diélectriques des milieux linéaires 1 et 2.

Si on considère une interface non linéaire de permittivité ϵ' située entre deux milieux linéaires

centrosymétriques de permittivités ϵ_1, ϵ_2 (voir Fig. 3.4), l'intensité du signal SHG créé par l'interface est donnée par la relation [Shen, 1989] :

$$I_{(2\omega)} = \frac{32\pi^3\omega^2 \sec^2 \theta_{2\omega}}{c^3 \sqrt{\epsilon_1(2\omega)\epsilon_1(\omega)}} \left| \mathbf{e}'(2\omega) \chi_S^{(2)} \mathbf{e}'(\omega) \mathbf{e}'(\omega) \right|^2 I_1^2(\omega) \quad (3.16)$$

avec $\mathbf{e}'(\Omega) = \mathbf{L}\mathbf{e}(\Omega)$ où $\mathbf{L}$ est la matrice de transmission faisant intervenir les coefficients de Fresnel qui relient les composantes du champ électrique dans le milieu 1 à celles du milieu non linéaire et $\mathbf{e}$ est le vecteur unitaire suivant le champ électrique à la fréquence Ω . $I_1(\omega)$ désigne l'intensité du faisceau excitateur et $\chi_S^{(2)}$ la susceptibilité non linéaire d'ordre 2 du milieu non linéaire (interface ou film).

Le deuxième milieu peut aussi être non-linéaire donc avoir une susceptibilité non linéaire d'ordre 2 volumique $\chi_{vol}^{(2)}$. Mais en général, ce deuxième milieu est centrosymétrique et par conséquent $\chi_{vol}^{(2)}$ s'annule dans l'approximation dipolaire électrique. Par contre, ce milieu possède une susceptibilité non linéaire d'ordre 2 d'origine quadrupolaire électrique qui est toujours non nulle et contribue sur une épaisseur d'environ $\lambda/2\pi$.

Pour un film mince de molécules déposées sur une surface, la susceptibilité non linéaire de la surface peut s'écrire comme :

$$\chi_S^{(2)} = \chi_{SS}^{(2)} + \chi_m^{(2)} + \chi_i^{(2)} \quad (3.17)$$

Ici $\chi_{SS}^{(2)}$ représente la contribution du substrat nu, $\chi_m^{(2)}$ la contribution du film de molécules isolé du substrat et $\chi_i^{(2)}$ provient de l'interaction entre les molécules et le substrat. Les différents termes contribuent plus ou moins au $\chi_S^{(2)}$ en fonction des milieux. Le terme $\chi_{SS}^{(2)}$ peut être identifié en mesurant le signal SHG obtenu pour le substrat nu tout seul. Ce terme peut ensuite être soustrait, mais en général on vérifie qu'il est négligeable par rapport à la contribution du film moléculaire. Pour des molécules asymétriques possédant une grande hyperpolarisabilité du second ordre, le terme $\chi_S^{(2)}$ sera beaucoup plus important si les molécules sont alignées sur la surface. Par contre si on s'intéresse aux effets liés à une non centrosymétrie à l'échelle moléculaire, il faut que les molécules soient déposées sur la surface de façon isotrope pour éviter les contributions liées à un arrangement macroscopique de ces molécules. Cela peut être vérifié en analysant le signal SHG obtenu pour différents angles de rotation de l'échantillon par rapport à la normale à la surface. Le signal SHG ne doit pas varier avec la rotation de l'échantillon.

Pour un film mince de molécules déposées sur la surface, lorsque le tenseur de susceptibilité non linéaire $\chi_S^{(2)}$ possède seulement quelques composantes non nulles, il est possible à partir du rapport de différentes composantes indépendantes de déterminer l'angle moyen d'orientation des molécules sur la surface [Heinz et al., 1983]. La génération de seconde harmonique en surface a d'autres applications intéressantes telles que l'étude de la reconstruction d'une surface cristalline [Heinz et al., 1985], la spectroscopie non linéaire des molécules adsorbées [Heinz et al., 1982], l'étude de la morphologie d'une couche mince de molécules déposées sur une surface solide ou à une interface liquide [Boyd et al., 1986, Hunt et al., 1987], etc. . .

Dans la partie suivante nous allons décrire la théorie de la génération de seconde harmonique en surface résolue en polarisation et une nouvelle application de cette technique pour l'étude des

effets chiroptiques dans la SHG des collagènes I et IV. Les premières expériences de génération de seconde harmonique en surface sur des molécules chirales avaient été menées sur du binaphthol dans le groupe de J. Hicks [Petralli-Mallow et al., 1993, Byers et al., 1994] et sur un poly-isocyanide chiral dans le groupe d'A. Persoons [Kauranen et al., 1994, Maki et al., 1996].

3.2.3 Génération de seconde harmonique en surface résolue en polarisation

L'utilisation de cette technique pour l'étude d'un film isotrope de molécules chirales déposées sur une surface utilise la brisure de symétrie induite par la chiralité des molécules. Pour la génération de seconde harmonique ($\mathbf{E}_1 = \mathbf{E}_2$) la polarisation $\mathbf{P}^{(2)}$, l'aimantation $\mathbf{M}^{(2)}$ et la quadripolarisation $\mathbf{Q}^{(2)}$ s'écrivent :

$$\mathbf{P}^{(2)} = \epsilon_0 \chi^{(2)eee} \mathbf{E}\mathbf{E} + \epsilon_0 \chi^{(2)eem} \mathbf{E}\mathbf{B} + \epsilon_0 \chi^{(2)eeqe} \mathbf{E}\nabla\mathbf{E} \quad (3.18)$$

$$\mathbf{M}^{(2)} = \epsilon_0 \chi^{(2)mee} \mathbf{E}\mathbf{E} \quad (3.19)$$

$$\mathbf{Q}^{(2)} = \epsilon_0 \chi^{(2)qeee} \mathbf{E}\mathbf{E} \quad (3.20)$$

et rayonnent un champ harmonique $\mathbf{E}(2\omega)$ qui peut être calculé à partir de l'expression 3.2.

Composantes chirales C_∞	Composantes achirales $C_{\infty v}$
$\chi_{xyz}^{(2)eee} = \chi_{xzy}^{(2)eee} = -\chi_{yxz}^{(2)eee} = -\chi_{yzx}^{(2)eee}$	$\chi_{zzz}^{(2)eee}, \chi_{zxx}^{(2)eee} = \chi_{zyy}^{(2)eee}$ $\chi_{xxz}^{(2)eee} = \chi_{yyz}^{(2)eee} = \chi_{xzx}^{(2)eee} = \chi_{yzy}^{(2)eee}$
$\chi_{zzz}^{(2)eem}, \chi_{zxx}^{(2)eem} = \chi_{zyy}^{(2)eem}$ $\chi_{xxz}^{(2)eem} = \chi_{yyz}^{(2)eem}, \chi_{xzx}^{(2)eem} = \chi_{yzy}^{(2)eem}$	$\chi_{xyz}^{(2)eem} = -\chi_{yxz}^{(2)eem}, \chi_{zxy}^{(2)eem} = -\chi_{zyx}^{(2)eem}$ $\chi_{xzy}^{(2)eem} = -\chi_{yzx}^{(2)eem}$
$\chi_{zzz}^{(2)mee}, \chi_{zxx}^{(2)mee} = \chi_{zyy}^{(2)mee}$ $\chi_{xxz}^{(2)mee} = \chi_{yyz}^{(2)mee} = \chi_{xzx}^{(2)mee} = \chi_{yzy}^{(2)mee}$	$\chi_{xyz}^{(2)mee} = \chi_{xzy}^{(2)mee} = -\chi_{yxz}^{(2)mee} = -\chi_{yzx}^{(2)mee}$

TAB. 3.2 – Composantes non nulles des susceptibilités non linéaires d'ordre 2 pour des surfaces invariantes par symétries C_∞ et $C_{\infty v}$.

Nous remarquons que dans l'expression de $\mathbf{P}^{(2)}$, $\mathbf{M}^{(2)}$ et $\mathbf{Q}^{(2)}$ interviennent 5 tenseurs de susceptibilité. Le nombre des composantes non nulles se réduit pour une surface isotrope, c'est-à-dire de symétrie C_∞ . Dans le cas où les molécules déposées sur la surface sont achirales, la symétrie est $C_{\infty v}$: tous les plans perpendiculaires à la surface deviennent plans de symétrie. Les composantes non nulles dans ce cas sont appelées composantes "achirales". Si les molécules déposées sur la surface sont chirales, c'est à dire de symétrie C_∞ , les composantes non nulles uniquement pour une surface chirale sont appelées composantes "chirales" [Giordmaine, 1965].

Ainsi, si on considère une surface (x, y) perpendiculaire à la direction z , les seules composantes non nulles des tenseurs $\chi^{(2)eee}$, $\chi^{(2)eem}$ et $\chi^{(2)mee}$ sont données dans le Tab. 3.2.

Hors résonance, les composantes du tenseur d'origine dipolaire électrique sont réelles et celles des tenseurs d'origine dipolaire magnétique et quadrupolaire électrique sont imaginaires. Par conséquent, dans ces conditions, il est possible de séparer les contributions dipolaires électriques des contributions dipolaires magnétiques et quadrupolaires électriques. Puisqu'il a été démontré qu'il n'est pas possible de séparer expérimentalement les contributions dipolaires magnétiques de contributions quadrupolaires électriques [Kauranen et al., 1994, Hache et al., 2001] dans la suite de ce chapitre nous allons utiliser le terme "magnétiques" pour se référer en même temps aux deux types de contributions.

SHG résolue en polarisation

Expérimentalement on mesure deux composantes du champ électrique rayonné à 2ω : $E_s(2\omega)$ (perpendiculaire au plan d'incidence) et $E_p(2\omega)$ (parallèle au plan d'incidence) qui s'écrivent en fonction des composantes $E_s(\omega)$ et $E_p(\omega)$ du champ électrique fondamental :

$$E_{s,p} \propto f_{s,p} E_p^2(\omega) + g_{s,p} E_s^2(\omega) + h_{s,p} E_p(\omega) E_s(\omega) \quad (3.21)$$

où les paramètres $f_{s,p}$, $g_{s,p}$, $h_{s,p}$ ont été initialement introduits par [Kauranen et al., 1994, Maki et al., 1995]. Ces paramètres peuvent être déterminés à partir des expressions 3.18, 3.19, 3.20, 3.2 et des composantes chirales et achirales données dans le Tab. 3.2. Leur expression (sans les coefficients de Fresnel) est la suivante [Schanne-Klein et al., 1998] :

$$\begin{aligned} f_s &= 2\chi_{xyz}^{eee} \sin \alpha \cos \alpha + 2\chi_{xxz}^{eem} \sin \alpha + 2\chi_{xxz}^{mee} \cos^2 \alpha \sin \alpha - 2\chi_{zzx}^{mee} \cos^2 \alpha \sin \alpha - \chi_{zzz}^{mee} \sin^3 \alpha \\ g_s &= -(2\chi_{xxz}^{eem} + \chi_{zzx}^{mee}) \sin \alpha \\ h_s &= 2\chi_{xxz}^{eee} \sin \alpha - 2(\chi_{xyz}^{mee} + \chi_{xzy}^{eem} + \chi_{xyx}^{eem}) \sin \alpha \cos \alpha \\ f_p &= -2\chi_{xxz}^{eee} \sin \alpha \cos^2 \alpha + \chi_{zzx}^{eee} \sin \alpha \cos^2 \alpha + \chi_{zzz}^{eee} \sin^3 \alpha + 2(\chi_{xzy}^{eem} - \chi_{zxy}^{eem} - \chi_{xyx}^{mee}) \sin \alpha \cos \alpha \\ g_p &= 2\chi_{xxz}^{eee} \sin \alpha - 2(\chi_{xyz}^{eem} + \chi_{zxy}^{eem}) \sin \alpha \cos \alpha \\ h_p &= 2\chi_{xyz}^{eee} \cos \alpha \sin \alpha + 2(\chi_{xxz}^{eem} + \chi_{xzy}^{eem}) \sin \alpha \cos^2 \alpha + 2(\chi_{zzx}^{eem} - \chi_{zzz}^{eem}) \sin^3 \alpha + 2\chi_{xxz}^{mee} \sin \alpha \end{aligned} \quad (3.22)$$

où α est l'angle d'incidence du faisceau fondamental, formé entre la direction de propagation du faisceau et la normale à la surface. Ils contiennent tous des termes locaux et non locaux, sauf g_s qui contient seulement des termes non locaux. Les paramètres f_s , g_s , h_p ne regroupent que des composantes chirales alors que les paramètres f_p , g_p , h_s ne regroupent que des composantes achirales. Par conséquent, en choisissant le bon ensemble de polarisations d'excitation et de détection, il est possible d'isoler spécifiquement une composante chirale du signal SHG.

En conclusion, la génération de seconde harmonique est très sensible à la chiralité des molécules déposées sur la surface car c'est une technique de mélange à 3 ondes où les polarisations

d'excitation et de détection peuvent être ajustées afin de sonder les 3 directions de l'espace, donc la chiralité.

L'activité optique de SHG

Trois expériences, analogues des mesures d'activité optique en optique linéaire, sont pertinentes pour sonder les effets chiroptiques dans le signal SHG. Ces configurations expérimentales sont illustrées sur la Fig. 3.5.

Premièrement, nous analysons la polarisation de l'harmonique réfléchi pour un faisceau fondamental polarisé linéairement suivant p . Toute rotation du plan de polarisation par rapport à la direction p est spécifique d'une chiralité moléculaire, car toute surface isotrope achirale ne peut réfléchir de seconde harmonique que sur la direction p (voir l'expression 3.24). Cette expérience est nommée ORD-SHG (optical rotation dispersion ou dispersion de la rotation optique en français) et c'est l'analogue de la rotation optique linéaire. L'intensité du signal SHG mesuré à travers un

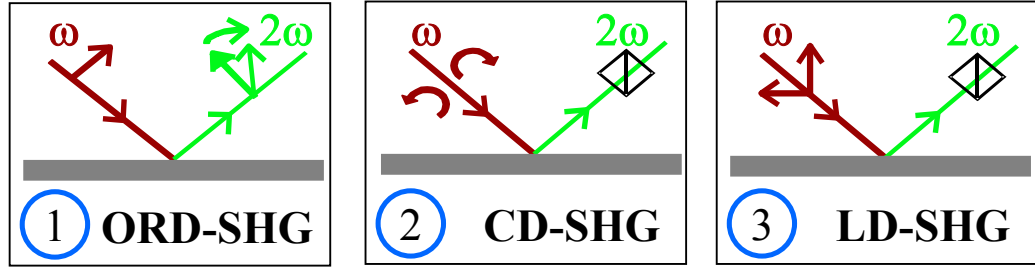


FIG. 3.5 – Configurations expérimentales utilisées dans les expériences SHG en surface.

analyseur faisant un angle φ avec la direction p s'exprime suivant la relation :

$$I \propto |E_p(2\omega) \cos \varphi + E_s(2\omega) \sin \varphi|^2 \quad (3.23)$$

et s'écrit en tenant compte du caractère complexe des paramètres $f_{p,s} = f'_{p,s} + if''_{p,s}$ et de l'équation 3.21 :

$$I_{ORD} \propto \left[|f_p|^2 \cos^2 \varphi + |f_s|^2 \sin^2 \varphi + 2 \left(f'_p f'_s + f''_p f''_s \right) \sin \varphi \cos \varphi \right] |E_p(\omega)|^2 \quad (3.24)$$

Les résultats expérimentaux peuvent être ajustés par cette formule pour déterminer les valeurs des coefficients f et φ . L'angle de rotation, noté Φ est défini comme l'angle de l'analyseur pour lequel le signal SHG est maximum. Il peut être calculé à partir de l'équation [Schanne-Klein et al., 1998] :

$$\tan 2\Phi = \frac{2(f'_p f'_s + f''_p f''_s)}{|f_p|^2 - |f_s|^2} \quad (3.25)$$

Deuxièmement, nous comparons les signaux SHG obtenus pour des polarisations circulaires droite et gauche, respectivement linéaires à $\pm 45^\circ$, du faisceau fondamental. On obtient ces polarisations circulaires et linéaires à $\pm 45^\circ$ avec un compensateur de Babinet-Soleil (voir la description du dispositif expérimental de SHG en surface à la page 59). De nouveau, toute différence circulaire ou CD-SHG, respectivement linéaire ou LD-SHG, est aussi caractéristique de la chiralité moléculaire. La différence circulaire (CD-SHG) peut être considérée comme l'analogue du dichroïsme circulaire en optique linéaire, toutefois il n'y a pas d'absorption car il s'agit d'un phénomène cohérent. Par contre, la différence linéaire, en tant que sonde des effets chiroptiques, n'a pas d'équivalent en optique linéaire.

Les signaux SHG obtenus dans ces expériences peuvent être mesurés avec l'analyseur en position s ou p . Il est ensuite possible d'exprimer l'intensité du signal SHG en fonction de l'angle $\theta_{\lambda/2, \lambda/4}$ formé entre la direction de polarisation du faisceau excitateur, par exemple p , et l'axe rapide de la lame demi-onde ou quart-d'onde qu'il traverse [Maki et al., 1996]. Ceci nous permettra de déterminer les valeurs des coefficients f , g et h en ajustant les données expérimentales avec les formules suivantes :

$$I_{LD}(2\omega) \propto \left[\begin{aligned} & \left(f' + g' + (f' - g') \cos 4\theta_{\lambda/2} + h' \sin 4\theta_{\lambda/2} \right)^2 \\ & + \left(f'' + g'' + (f'' - g'') \cos 4\theta_{\lambda/2} + h'' \sin 4\theta_{\lambda/2} \right)^2 \end{aligned} \right] \quad (3.26)$$

$$I_{CD}(2\omega) \propto \left[\begin{aligned} & \left(f' - g' + 4f'' \cos 2\theta_{\lambda/4} - (f' - g') \cos 4\theta_{\lambda/4} + 2h'' \sin 2\theta_{\lambda/4} - h' \sin 4\theta_{\lambda/4} \right)^2 \\ & + \left(f'' - g'' - 4f' \cos 2\theta_{\lambda/4} - (f'' - g'') \cos 4\theta_{\lambda/4} - 2h' \sin 2\theta_{\lambda/4} - h'' \sin 4\theta_{\lambda/4} \right)^2 \end{aligned} \right] \quad (3.27)$$

Les valeurs de LD-SHG, respectivement CD-SHG, sont ensuite déduites de ces expressions avec $\theta_{\lambda/2} = \pm 22.5^\circ$, respectivement $\theta_{\lambda/4} = \pm 45^\circ$. Ces valeurs sont définies comme le rapport entre la différence des intensités des signaux SHG correspondants et leur moyenne :

$$LD_{SHG}, CD_{SHG} = \frac{I_{-45^\circ, G} - I_{+45^\circ, D}}{\frac{1}{2} (I_{-45^\circ, G} + I_{+45^\circ, D})} \quad (3.28)$$

$$LD_{SHG} = \frac{-4 [(f' + g') h' + (f'' + g'') h'']}{|f|^2 + |g|^2 + |h|^2 + 2(f'g' + f''g'')} \quad (3.29)$$

$$CD_{SHG} = \frac{4 [(f'' - g'') h' - (f' - g') h'']}{|f|^2 + |g|^2 + |h|^2 - 2(f'g' + f''g'')} \quad (3.30)$$

Si on regarde les relations 3.24, 3.26, 3.27, 3.29, 3.30 toutes s'expriment comme des rapports de composantes de susceptibilité. Par conséquent, l'activité optique non-linéaire d'ordre 2 ne dépend pas de la densité de molécules déposées sur la surface.

Les expressions de ORD-SHG et LD-SHG impliquent des produits de coefficients chiraux et achiraux. Ceci implique que l'angle de rotation et la valeur de LD-SHG sont non nuls seulement

dans le cas où les molécules déposées sur la surface sont chirales. De même, le CD-SHG est non nul seulement pour des molécules chirales car son expression implique aussi des produits des coefficients chiraux et achiraux.

D'autre part, les expressions de ORD-SHG et LD-SHG impliquent des produits des coefficients en phase et l'expression de CD-SHG implique des produits des coefficients en quadrature de phase. Puisque, hors résonance, les composantes du tenseur d'origine dipolaire électrique sont réelles et celles des tenseurs d'origine dipolaire "magnétique" sont imaginaires, et que les coefficients achiraux f_p, g_p, h_s (expressions 3.22) sont dominés par les contributions d'origine dipolaire électrique il en résulte que :

- les expériences d'ORD-SHG et LD-SHG seront sensibles aux contributions chirales d'origine locale (dipolaire électrique), effets dominants quand la chiralité moléculaire est due à des mécanismes de couplage excitonique.
- le CD-SHG sera sensible aux contributions chirales d'origine non locale (dipolaire "magnétique"), effets dominants quand la chiralité moléculaire est due à des mécanismes de chiralité à 1 électron.

Nous allons maintenant faire une courte description de ces deux mécanismes de couplage excitonique et de chiralité à 1 électron [Hache et al., 2001, Schanne-Klein et al., 2003]. Le paramètre pertinent pour décrire l'activité optique est la force de rotation introduite par Rosenfeld : $R = \text{Im}\{\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{m}\}$, où $\boldsymbol{\mu}$ est le moment dipolaire électrique et $\mathbf{m}$ le moment dipolaire magnétique [Wagnière, 1993]. L'origine physique de l'activité optique provient de cette expression.

Un premier modèle microscopique de l'activité optique considère que, si une transition a à la fois un caractère électrique et magnétique (avec des moments non orthogonaux), R sera non nulle et il existe une activité optique. C'est le cas des molécules hélicoïdales qui peuvent être décrites simplement par un électron lié harmoniquement sur une hélice. C'est le modèle de Kauzmann ou modèle de chiralité à 1 électron. Dans ce cas, l'activité optique trouve son origine dans le moment dipolaire magnétique induit par un mouvement hélicoïdal des électrons.

Un deuxième modèle microscopique de la chiralité souligne le caractère non local lié à l'activité optique. On considère que la molécule comporte au minimum deux chromophores séparés spatialement. Chacun est intrinsèquement achiral et seul leur arrangement au sein de la molécule est chiral. Le modèle qui décrit ce système est celui de deux oscillateurs harmoniques non coplanaires, séparés spatialement et en interaction électrostatique. C'est le modèle de Kuhn ou modèle des oscillateurs couplés. L'activité optique trouve son origine dans le couplage entre les moments dipolaires électriques non coplanaires : $R \propto \mathbf{r}_{ab} \cdot \boldsymbol{\mu}_a \times \boldsymbol{\mu}_b$, où $\mathbf{r}_{ab}$ représente la distance entre les chromophores A et B et $\boldsymbol{\mu}_a, \boldsymbol{\mu}_b$ leur moments dipolaires électriques. Le modèle des oscillateurs couplés a été utilisé pour décrire le couplage excitonique [Rodger and Nórdén, 1997], c'est pour cela que souvent on utilise le terme de "couplage excitonique" pour se référer à ce modèle.

La combinaison de ces trois expériences, ORD-SHG, LD-SHG et CD-SHG, permet donc de déterminer l'origine physique de l'activité optique non-linéaire.

3.3 Principe des expériences

Dans cette partie nous allons décrire la façon dont nous avons préparé les films minces de collagènes I et IV, les différents dispositifs expérimentaux qui ont permis leur caractérisation, ainsi que le dispositif expérimental de SHG en surface résolue en polarisation.

3.3.1 Préparation des films de collagène

Les poudres de collagène de type I et de collagène de type IV ont été achetées chez Sigma-Aldrich. Le collagène de type I est extrait à partir des tendons de queue de rat (référence C7661) par une méthode qui permet de conserver l'intégrité de la molécule de collagène. De cette façon, il est ensuite possible de former des fibrilles de collagène de type I à partir de ces molécules, dans certaines conditions physiologiques (molécules de collagène I dans l'acide acétique mélangé avec NaCl). La poudre de collagène de type I a été dissoute dans une solution d'acide acétique 0.1 N pour obtenir une concentration finale de 1 mg/ml. De la même façon, la poudre de collagène de type IV, extraite à partir de la membrane basale d'un sarcome de souris (Engelbreth-Horm-Swarm mouse sarcoma, référence C0543), a été dissoute dans une solution d'acide acétique 0.25 % pour obtenir une concentration finale de 1.5 mg/ml.

Nous avons ensuite déposé quelques μl de solution de collagène I ou IV sur des substrats en silice fondue, adaptés pour des expériences de SHG en surface. Ces substrats ont été préalablement rendus hydrophiles par un traitement avec une solution Piranha ($2/3\text{H}_2\text{SO}_4$ et $1/3\text{H}_2\text{O}_2$) pour favoriser la fixation des molécules de collagène sur la surface. Une minute après la déposition des molécules sur la surface, les échantillons ont été rincés à l'eau ultra pure pour enlever toute molécule non fixée et, ensuite, nous les avons laissés sécher à température ambiante. Cette étape de déposition des molécules a été répétée trois fois afin d'obtenir un film mince de molécules de collagène à la surface du substrat.

3.3.2 Dispositifs expérimentaux

Absorption, Fluorescence, Spectres CD et Imagerie TEM

Les mesures de spectres d'absorption des molécules de collagènes en solution ou déposées sur le substrat en silice fondue ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre CARY500 (Varian) et les spectres de fluorescence excitée à 1 photon, à l'aide d'un spectrofluorimètre Hitachi F-4500. Pour les mesures de spectres d'absorption des films minces de collagène, un substrat nu a été utilisé comme référence.

Les spectres de fluorescence excitée à 2 photons ont été mesurés à l'aide du spectrofluorimètre à 2 photons décrit préalablement dans la section 2.4.1, à la page 33.

Les spectres CD des molécules de collagène en solution ont été mesurés dans une cuve de quartz de 100 μm longueur, à l'aide d'un spectromètre CD (CD6 Jobin-Yvon).

Les images TEM ont été acquises avec un microscope électronique en transmission Philips CM12 fonctionnant à 120 kV. Pour cela quelques gouttes de solution de collagène I ou IV ont été déposées sur des grilles, recouvertes d'un film mince de carbone et colorées à l'acétate d'uranyl 1 %. Afin de vérifier les éventuels effets de l'acétate d'uranyl sur l'agrégation des molécules, nous avons aussi déposé les molécules sur des grilles recouvertes d'un film mince de carbone, mais non colorées. Tout de suite après le séchage des échantillons à la température ambiante, ceux-ci ont été visualisés avec le microscope TEM.

Dispositif expérimental de SHG en surface résolue en polarisation

La géométrie d'excitation pour les expériences de génération de seconde harmonique en surface résolue en polarisation est illustrée sur la Fig. 3.6. Nous avons utilisé la même géométrie d'excitation que celle décrite dans les références [Shen, 1989, Schanne-Klein et al., 1998]. La

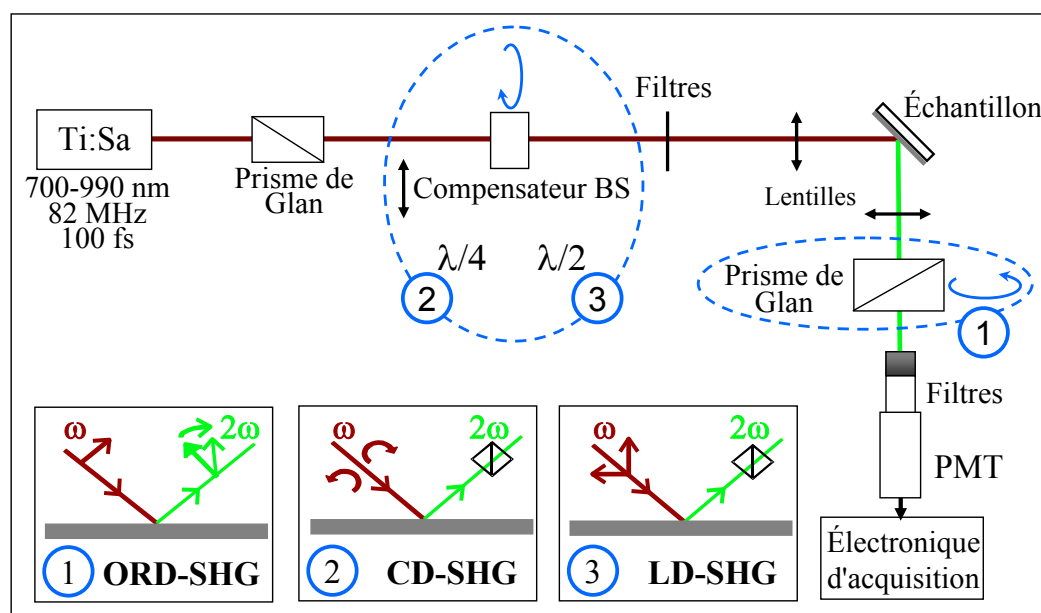


FIG. 3.6 – **Géométrie d'excitation pour les expériences de SHG en surface résolue en polarisation.** Un faisceau laser à la fréquence ω est envoyé sur un substrat sur lequel sont déposées les molécules à étudier et ensuite la SHG à 2ω est détectée avec un tube photomultiplicateur à travers des filtres adaptés (un filtre interférentiel à la fréquence 2ω et un filtre passe-bas en longueur d'onde pour couper le laser). Pour déterminer les contributions chirales à ce signal SHG, nous jouons sur les polarisations incidentes et réfléchies de trois manières différentes illustrées dans le bas de la figure. BS - compensateur Babinet-Soleil, PMT - tube photomultiplicateur.

source d'excitation est un laser Titane-Saphir (Tsunami, Spectra-Physics), accordable dans la gamme de longueurs d'onde 700 nm - 990 nm avec des impulsions de l'ordre de 100 fs à un

taux de répétition de 82 MHz. Pour une excitation à 550 nm nous avons utilisé un amplificateur paramétrique optique non-colinéaire (NOPA) à un taux de répétition de 1 kHz. La polarisation du faisceau laser est contrôlée à l'aide d'un prisme de Glan et elle peut être, ensuite, ajustée avec un compensateur de Babinet-Soleil (BS). Il s'agit d'un système optique qui permet d'obtenir une lame de retard variable. Il est constitué de deux prismes, dont les positions relatives peuvent être changées à l'aide d'une vis micrométrique. La polarisation du faisceau incident peut ainsi être changée en linéaire (BS en position $\lambda/2$) ou circulaire (BS en position $\lambda/4$). A l'aide d'un moteur pas à pas le compensateur peut être tourné autour de l'axe du faisceau qui le traverse. Ceci permet d'obtenir les polarisations linéaires à $\pm 45^\circ$ pour un angle de rotation de $\pm 22.5^\circ$ du compensateur BS et les polarisations circulaires droite ou gauche pour un angle de rotation de $\pm 45^\circ$ du compensateur BS.

Avant d'être focalisé sur l'échantillon, le faisceau excitateur passe à travers un filtre passe-haut en longueur d'onde qui permet de filtrer les longueurs d'onde ne correspondant pas à la gamme de longueurs d'onde du laser. Le reste du montage est placé dans un boîtier hermétique à la lumière. Puis, le faisceau est focalisé sur l'échantillon avec une lentille de distance focale de 50 mm (le waist (pincement du faisceau) est approximativement de $23 \mu\text{m}$ pour une longueur d'onde de 800 nm), à un angle d'incidence de 45° .

Finalement, le signal SHG créé par les molécules déposées sur le substrat passe à travers un deuxième prisme de Glan, dont la rotation est assurée par un moteur pas à pas, il est ensuite filtré spatialement et spectralement avant d'être détecté par le tube photomultiplicateur (PMT). Ce dernier prisme de Glan permet d'analyser la polarisation du signal de seconde harmonique émis par les molécules. En jouant sur les polarisations du faisceau fondamental (BS) et harmonique (deuxième prisme de Glan) il est possible d'effectuer les trois types d'expériences sensibles à la chiralité moléculaire ORD-SHG, LD-SHG et CD-SHG, décrites précédemment (section 3.2.3, page 55) et schématisées de nouveau sur la Fig. 3.6 en bas.

Le filtrage spatial du signal est utilisé pour éliminer le signal SHG réfléchi par la face arrière du substrat de silice et le bruit. Le filtrage spectral regroupe un filtre interférentiel à la longueur d'onde de la SHG et un filtre passe-bas en longueur d'onde pour éliminer le faisceau fondamental.

Pour la détection du signal nous avons utilisé un tube photomultiplicateur en régime de comptage de photons (P25PC Electron Tubes). Il comporte un discriminateur qui lui permet de créer une impulsion logique pour chaque photon détecté au-delà du seuil de discrimination. Ces impulsions sont ensuite détectées par un compteur (CT2 Electron Tubes). Le signal SHG est acquis pendant une durée de 500 ms et nous faisons une moyenne sur un nombre variable de mesures, en général 20, et l'erreur statistique fournit l'incertitude de la mesure. Afin d'éliminer toute source de signal non significatif pour nos mesures, le bruit mesuré en absence du faisceau laser (80 photons/s) est soustrait au signal créé par l'échantillon.

3.4 Résultats expérimentaux

3.4.1 Expériences de caractérisation

Imagerie TEM

Pour vérifier l'homogénéité de nos échantillons de collagène, nous avons visualisé par imagerie TEM deux types de préparations d'échantillons de collagène de type I. Premièrement, nous avons utilisé une solution de collagène de type I dans l'acide acétique et deuxièmement, une solution de collagène de type I dans l'acide acétique mélangé avec du NaCl. Les images obtenues sont montrées sur la Fig. 3.7. L'image à gauche (Fig. 3.7a) présente une distribution homogène des

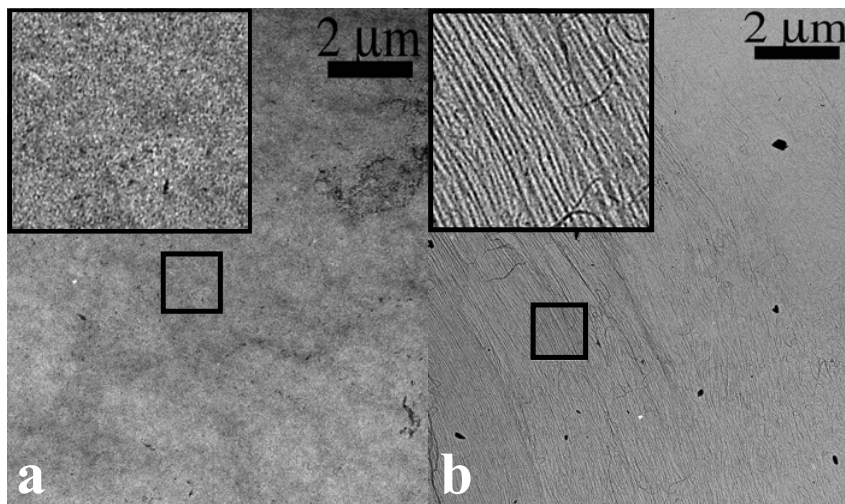


FIG. 3.7 – a) **Image TEM des molécules de collagène I dans l'acide acétique** : cette image montre une distribution homogène de ces molécules. b) **Image TEM des molécules de collagène I dans une solution saline** (acide acétique et NaCl) : nous remarquons une distribution directionnelle caractéristique d'une agrégation fibrillaire du collagène de type I *in vitro*.

molécules de collagène de type I dans l'acide acétique ; cette homogénéité est très bien visualisée dans l'image insérée en haut, à gauche. L'image à droite (Fig. 3.7b) présente des structures fibrillaires avec des largeurs de 280 nm, caractéristiques des fibrilles de collagène de type I. Nous remarquons que ces structures fibrillaires ont une distribution directionnelle donnée par l'écoulement de la solution durant le séchage avec la grille inclinée. Ces structures fibrillaires sont caractéristiques d'une agrégation fibrillaire des molécules de collagène de type I en solution saline *in vitro*. Inversement, il n'y a pas d'agrégation fibrillaire pour les molécules de collagène I dans l'acide acétique et l'image TEM non structurée est caractéristique d'une distribution homogène des triples hélices de collagène I déposée sur la grille.

Compte tenu de ces résultats, pour les expériences de SHG en surface résolue en polarisation, nous avons utilisé des molécules de collagène I dans l'acide acétique afin d'éviter l'agrégation fibrillaire de ces molécules et de pouvoir étudier le signal SHG créé par ces molécules et non par les fibrilles de collagène.

Spectres d'absorption

Les spectres d'absorption des molécules de collagènes I et IV en solution et les spectres d'absorption des films minces des collagènes I et IV sont présentés sur les Fig 3.8a et b. Ces spectres ont la même forme, ce qui montre que les molécules de collagène ont été bien déposées sur le substrat en silice fondue.

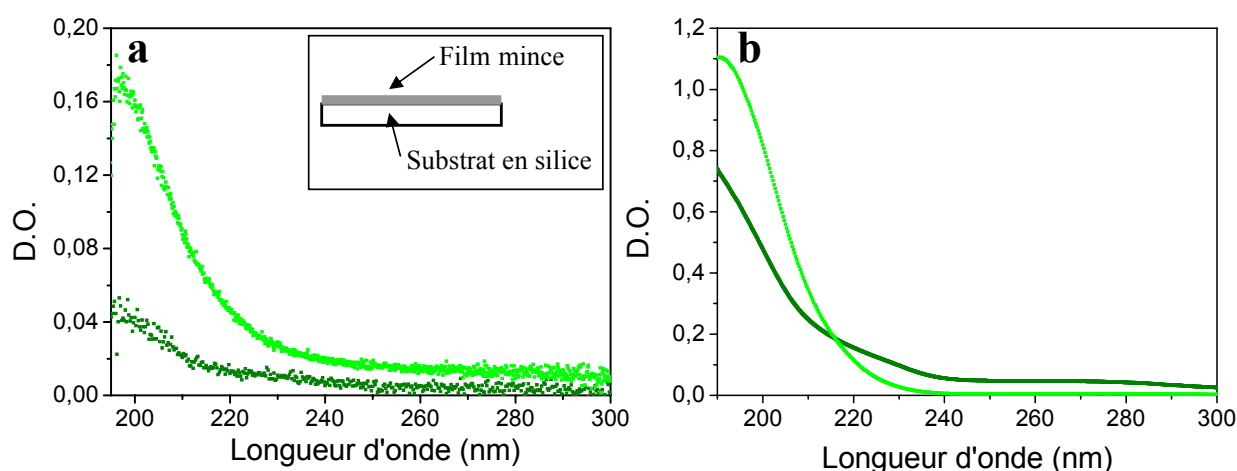


FIG. 3.8 – a) **Densité optique d'un film mince de molécules de collagène I** (vert clair) et collagène IV (vert foncé) mesurée par rapport à la densité optique d'un substrat nu. b) **Densité optique d'une solution de molécules de collagène I** (vert clair) et collagène IV (vert foncé) mesurée pour une concentration de 1.25 mg/ml dans une cuve de quartz de 100 μm longueur. Une cuve de quartz contenant une solution d'acide acétique a été utilisée comme référence.

Tous ces spectres présentent une absorption autour de 200 nm avec une densité optique de 0.15 pour le film mince de collagène I et 0.04 pour le film mince de collagène IV, et une densité optique de 0.8 pour la solution de collagène I et 0.4 pour la solution de collagène IV à une concentration de 1.25 mg/ml. Les pics d'absorption autour de 200 nm sont caractéristiques de la liaison peptidique. Ces spectres ne présentent pas de pics d'absorption autour de 260 - 280 nm, ce qui indique l'absence d'acides aminés aromatiques. Par conséquent, ces spectres sont caractéristiques des peptides composés d'acides aminés non aromatiques et on s'attend à ce que les molécules de collagène I ou IV ne fluorescent pas.

Spectres CD

La Fig. 3.9 montre les spectres de dichroïsme circulaire obtenus pour les solutions de molécules de collagène I et collagène IV, dont les spectres d'absorption sont donnés sur la Fig. 3.8b. Les deux spectres présentent des pics négatifs autour de 200 nm en accord avec les spectres CD du collagène de type I trouvés dans la littérature [Bhatnagar and Gough, 1996, Sreerama and Woody, 2004]. Nous n'avons pas trouvé de spectres CD pour le collagène de type IV dans la littérature. Ce pic négatif est typique pour les spectres CD des structures de type P_2 adoptées par les polypeptides riches en proline, tels que le collagène. La Fig. 3.1 illustre un exemple d'une telle structure conformationnelle.

Nous remarquons que le spectre CD du collagène de type IV est bien moins intense que celui de type I (spectres mesurés dans les mêmes conditions avec une concentration de 1.25 mg/ml) : le minimum est situé à -0.25×10^{-3} pour le collagène IV et à -3.3×10^{-3} pour le collagène I. Ce résultat reflète le fait que la structure en triple hélice du collagène de type IV est moins

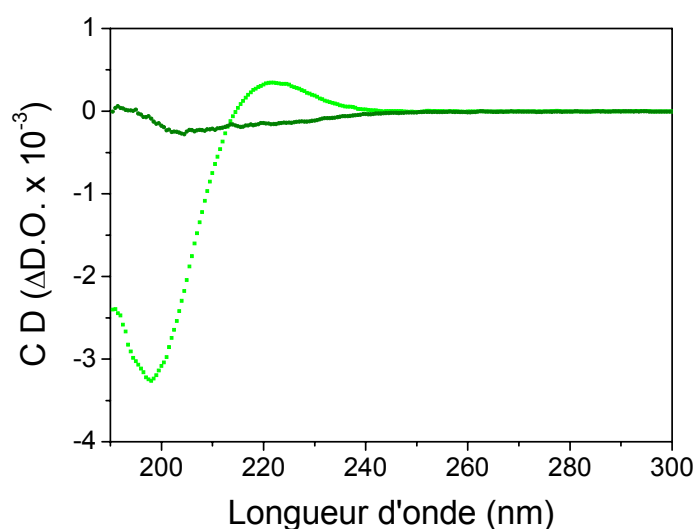


FIG. 3.9 – Spectres CD des molécules de collagène I (vert clair) et IV (vert foncé) en solution, acquises dans les mêmes conditions et pour une concentration de 1.25 mg/ml.

continue que celle du collagène de type I. Ceci est en accord avec la structure de la molécule de collagène de type IV, dont la triple hélice contient des nombreuses interruptions des domaines collagéniques *GlyXY*, par des domaines non collagéniques.

Spectres de fluorescence

Afin de déterminer si les molécules de collagène I présentent de la fluorescence, nous avons acquis les spectres de fluorescence excitée à 1 photon (1PEF) dans la gamme de longueurs

d'onde de 210 - 300 nm et les spectres de fluorescence excitée à 2 photons (2PEF) dans la gamme de longueurs d'onde 750 - 950 nm pour le collagène de type I en solution (concentration 1 mg/ml). Nous avons observé que les molécules de collagène de type I ne présentent aucun signal de fluorescence, en accord avec les mesures de spectres d'absorption. Ceci indique que la fluorescence observée pour le collagène de type I dans les tissus n'est pas due aux molécules de collagène I, mais plutôt aux liaisons intermoléculaires [Richards-Kortum and Sevick-Muraca, 1996] qui assurent l'assemblage de ces molécules en fibrilles de collagène.

3.4.2 Activité optique de SHG des films minces des collagènes I et IV

Nous avons effectué les expériences de génération de seconde harmonique en surface résolue en polarisation décrites précédemment sur des films minces de collagènes I et IV, déposés sur un substrat en silice fondue, pour une excitation à 550 nm et dans la gamme des longueurs d'onde du laser Titane-Saphir (700 - 990 nm). Ces expériences ont été menées hors résonance puisque les deux types de collagènes n'absorbent ni à 1 photon, ni à 2 photons à ces longueurs d'onde. Par conséquent, les dommages optiques des échantillons sont fortement réduits dans ces conditions d'excitation. Par exemple, même pendant une excitation continue des molécules de collagène avec une puissance moyenne de 400 mW à 800 nm, aucun changement d'intensité du signal SHG créé par ces molécules n'a été observé. Toutes les mesures d'activité optique sont reproductibles d'un échantillon à un autre.

Nous rappelons qu'afin d'étudier le rôle de la chiralité dans le signal SHG du collagène, donc de séparer les effets liés à un arrangement macroscopique de ces molécules des effets liés à une non centrosymétrie à l'échelle moléculaire, il est important que les molécules soient déposées de façon isotrope sur la surface. Ainsi, tout effet lié à un arrangement macroscopique de ces molécules pourra être négligé. Nous avons vérifié cela en analysant le signal SHG obtenu pour différents angles de rotation de l'échantillon par rapport à la normale à la surface. Tous les mesures d'activité optique sont reproductibles pour différentes orientations angulaires d'un même échantillon. Ceci indique que les films des molécules de collagène sont isotropes et que l'activité optique mesurée est due à une chiralité moléculaire et non pas à une orientation macroscopique de ces molécules.

Nous allons tout d'abord présenter les résultats obtenus pour les molécules de collagène de type I et ensuite pour le collagène de type IV.

Expériences de SHG en surface sur des films minces des collagènes I

Premièrement, nous avons effectué ces expériences à une longueur d'onde d'excitation de 800 nm. Les résultats obtenus pour l'expérience de rotation optique ORD-SHG sont montrés sur la Fig. 3.10. Nous rappelons que cette expérience consiste à analyser la polarisation du signal SHG créé par le film mince, par rapport à la polarisation p du faisceau fondamental. Pour cela, le signal

SHG a été acquis en fonction de l'angle de analyseur (deuxième prisme de Glan sur la Fig. 3.6). Nous faisons remarquer tout d'abord que les films minces des collagènes de type I produisent un signal SHG détectable même dans ces conditions d'excitation non résonante. Nous avons attribué ce signal aux molécules de collagène, car il était 10 fois plus important que le signal créé par le substrat en silice fondue. Ce signal SHG dû au substrat nu n'a pas été soustrait du signal total obtenu avec la présence des molécules.

La polarisation du signal SHG présente une rotation par rapport à la direction p du faisceau fondamental. Pour déterminer l'angle de rotation de la polarisation, nous avons ajusté les données expérimentales avec un cosinus carré et nous avons obtenu un angle de rotation $\Phi = -40^\circ \pm 5^\circ$. La précision de l'ajustement étant très bonne, l'incertitude de $\pm 5^\circ$ est principalement due à la variabilité des échantillons (déterminée sur 10 mesures).

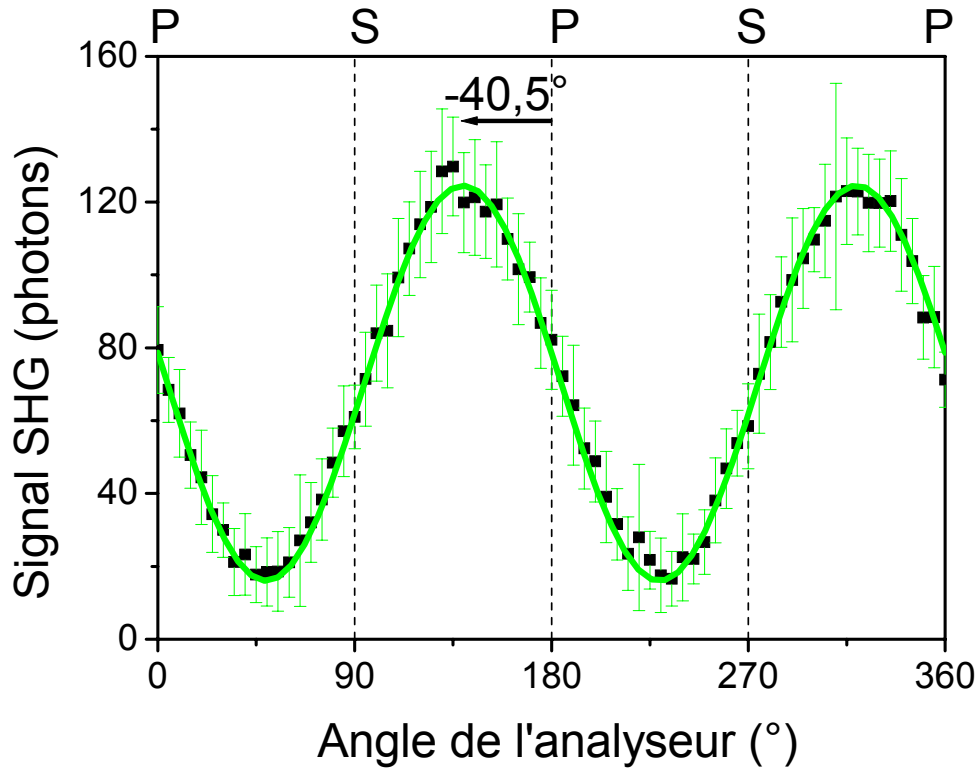


FIG. 3.10 – **Signal SHG créé par le film mince de molécules de collagène de type I** en fonction de l'angle de l'analyseur ($\lambda=800$ nm, $P=400$ mW). Le signal SHG est acquis pendant 500 ms et ensuite la moyenne du signal sur 20 mesures est déterminée pour chaque position angulaire de l'analyseur. Le bruit mesuré en absence du laser a été soustrait. Les barres d'erreurs correspondent aux erreurs statistiques. Le trait plein correspond à l'ajustement des données expérimentales par la formule 3.24.

Si on regarde attentivement la Fig. 3.10, nous observons que le signal SHG créé par les molécules de collagène I ne s'annule jamais. Ceci indique que les paramètres f_p et f_s ne possèdent pas la même phase (voir l'équation 3.24). Afin de déterminer la phase relative de ces paramètres nous avons fixé $f_p = 1$ et nous avons ajusté la courbe expérimentale avec la formule 3.24. Ce choix a été justifié par le fait que ce paramètre achiral est dominé par des contributions locales, donc d'origine dipolaire électrique, et hors résonance les composantes du tenseur d'origine dipolaire électrique sont réelles. Nous avons obtenu ainsi $f_s = 0.66 + 0.60i$ ce qui implique une différence de phase avec le paramètre f_p de -42° .

Les résultats obtenus pour les expériences de différence linéaire LD-SHG sont présentés sur la Fig. 3.11. Le signal SHG a été mesuré pour les deux positions p et s de l'analyseur, en fonction de l'angle de rotation du compensateur BS réglé en $\lambda/2$. Ces mesures de différence linéaire LD-SHG présentent une périodicité de 90° en accord avec les propriétés optiques de la lame demi-onde. A partir de ces données, nous avons pu déterminer les valeurs de LD-SHG obtenues avec l'analyseur en position p et s en utilisant la formule 3.28 : LD-SHG $_p = -67\% \pm 10\%$ et LD-SHG $_s = -76\% \pm 2\%$ (les incertitudes correspondent aux erreurs statistiques).

Les résultats expérimentaux de différence circulaire CD-SHG sont présentés sur la Fig. 3.12. Le signal SHG a été mesuré de la même façon que pour le LD-SHG avec le compensateur BS réglé en position $\lambda/4$. Ces mesures de différence circulaire CD-SHG présentent une périodicité de 180° caractéristique de propriétés optiques de la lame quart-d'onde. Les valeurs de CD-SHG obtenues avec l'analyseur en position p et s en utilisant la formule 3.28 sont : CD-SHG $_p = -22\% \pm 15\%$ et CD-SHG $_s = -16\% \pm 6\%$ (les incertitudes correspondent aux erreurs statistiques).

Nous avons ensuite ajusté ces courbes expérimentales avec les formules 3.26 pour LD-SHG et 3.27 pour CD-SHG afin de déterminer les valeurs relatives des paramètres g et h . Les valeurs obtenues pour les positions s et p de l'analyseur sont données dans le Tab. 3.3.

Expérience	$f'_{s,p}$	$f''_{s,p}$	$g'_{s,p}$	$g''_{s,p}$	$h'_{s,p}$	$h''_{s,p}$
$s - LD$	-0.66^b	0.6^b	-0.58 ± 0.03^b	0.59 ± 0.06^b	4.60 ± 0.14^c	0^c
$s - CD$	-0.66^b	0.6^b	-0.74 ± 0.10^b	0.48 ± 0.03^b	4.43 ± 0.15^c	0^c
$p - LD$	1.00^c	0^c	1.09 ± 0.01^c	0^c	-0.37 ± 0.01^b	0.22 ± 0.18^b
$p - CD$	1.00^c	0^c	1.77 ± 0.05^c	0^c	-0.39 ± 0.02^b	0.15 ± 0.04^b

TAB. 3.3 – Valeurs relatives et incertitudes (erreurs données par l'ajustement) des paramètres g et h obtenues par ajustement des courbes expérimentales de LD-SHG et CD-SHG. La valeur du paramètre f_p est fixée à 1 afin d'avoir une phase et une amplitude de référence et la valeur du paramètre f_s relative à celle du f_p a été déterminé par ajustement de la courbe ORD-SHG. ^b paramètres chiraux et ^c paramètres achiraux.

Pour cela nous avons fixé le paramètre $f_p = 1$ (comme pour l'ajustement de la courbe ORD-SHG) afin d'avoir une phase et une amplitude de référence. De même, nous avons supposé que

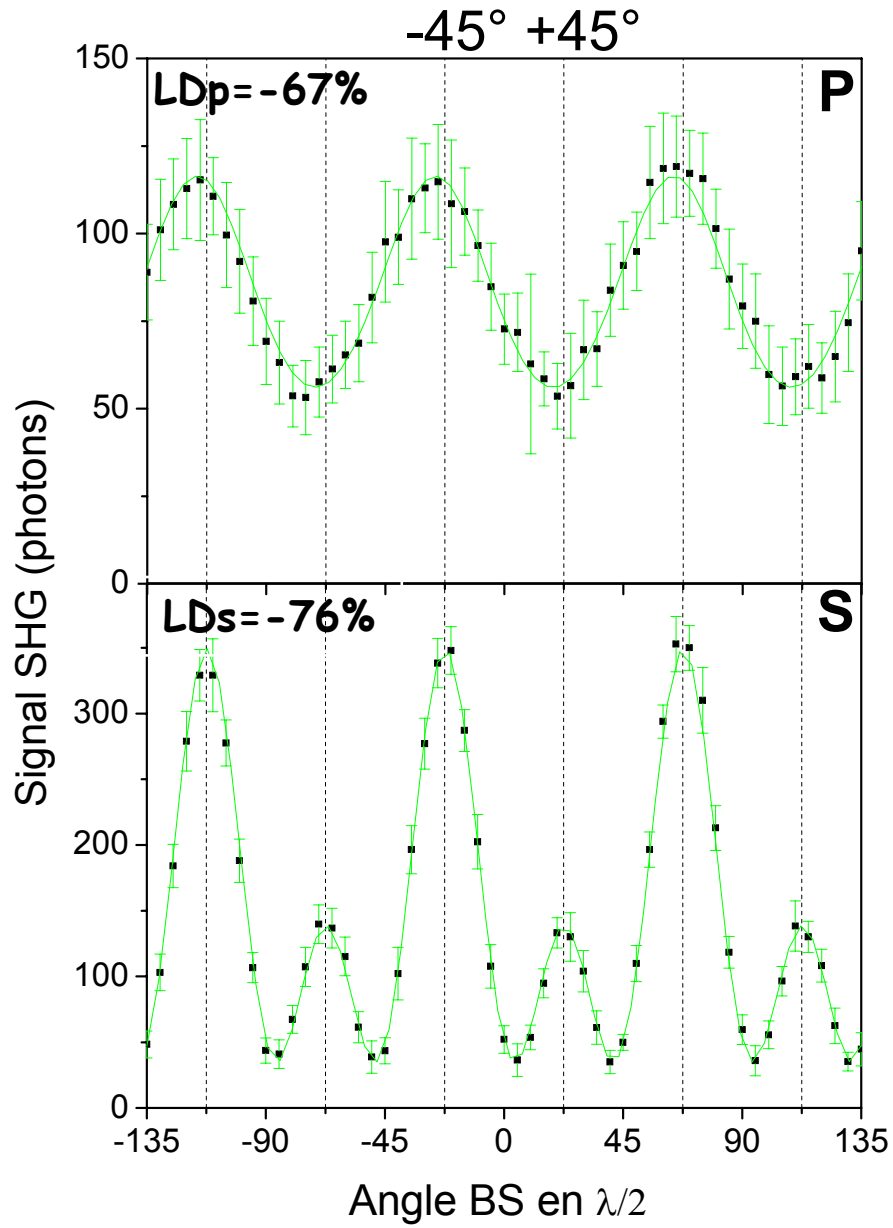


FIG. 3.11 – Composante polarisée p (en haut) et composante polarisée s (en bas) du signal SHG créé par le film mince des molécules de collagène de type I, acquis en fonction de l'angle de la lame demi-onde (compensateur BS en position $\lambda/2$). $\lambda=800$ nm, $P=400$ mW. Le signal SHG est acquis pendant 500 ms et ensuite la moyenne du signal sur 20 mesures est déterminée. Le bruit mesuré en absence du laser a été soustrait. Les barres d'erreurs correspondent aux erreurs statistiques. Le trait plein correspond à l'ajustement des données expérimentales avec la formule 3.26 et les paramètres indiqués dans le Tab. 3.3.

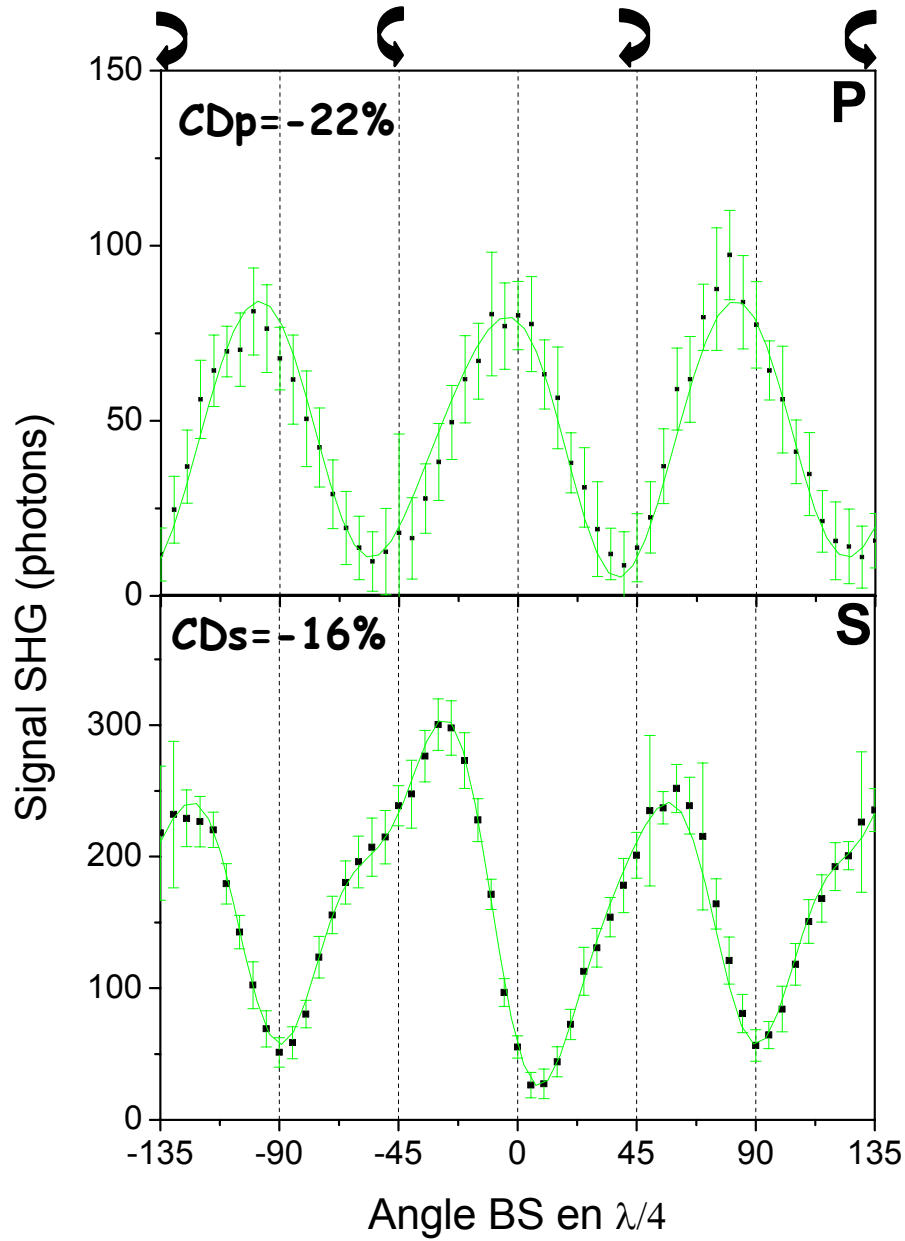


FIG. 3.12 – Composante polarisée p (en haut) et composante polarisée s (en bas) du signal SHG créé par le film mince des molécules de collagène de type I, acquis en fonction de l'angle de la lame quart-d'onde (compensateur BS en position $\lambda/4$). $\lambda=800$ nm, $P=400$ mW. Le signal SHG est acquis pendant 500 ms et ensuite la moyenne du signal sur 20 mesures est déterminée. Le bruit mesuré en absence du laser a été soustrait. Les barres d'erreurs correspondent aux erreurs statistiques. Le trait plein correspond à l'ajustement des données expérimentales avec la formule 3.27 et les paramètres indiqués dans le Tab. 3.3.

les paramètres g_p et h_s sont réels car ils sont achiraux comme f_p . Pour f_s nous avons utilisé la valeur déterminée à partir de l'expérience ORD-SHG.

Remarquons que :

- les formules 3.26 et 3.27 permettent un bon ajustement des courbes expérimentales de LD-SHG et CD-SHG comme l'illustrent les Fig. 3.11 et Fig. 3.12 et les erreurs standard indiquées dans le Tab. 3.3.

- les valeurs relatives des paramètres g et h , déterminées à partir des courbes expérimentales de LD-SHG et CD-SHG, sont en bon accord compte tenu du fait que les expériences LD-SHG sont moins précises que les expériences CD-SHG dans la détermination de ces paramètres [Maki et al., 1997].

- d'après les calculs (formule 3.22), les paramètres chiraux f_s et h_p , multipliés par des facteurs géométriques, sont égaux à la composante chirale du tenseur local de susceptibilité χ_{xyz}^{eee} . Expérimentalement nous avons bien obtenu les mêmes ordres de grandeur pour ces paramètres, bien que quantitativement ils n'aient pas les mêmes valeurs.

- le paramètre g_s possède une partie réelle, bien qu'il soit supposé ne regrouper que des composantes non locales (voir les formules 3.22).

Tous ces points montrent que nos résultats sont en bon accord avec la théorie du point de vue qualitatif, même si quantitativement ils présentent des petites différences. Celles-ci peuvent être expliquées par le fait que i) les barres d'erreur données pour ces paramètres comportent seulement les erreurs données par l'ajustement et ne tiennent pas compte des erreurs expérimentales ii) la référence en phase que nous avons choisie est arbitraire, car le paramètre f_p regroupe aussi des composantes non locales qui peuvent être non nulles, et iii) l'hypothèse que g_p'' , h_s'' et g_s' sont nuls n'est pas non plus parfaitement valide pour la même raison. Tout de même, ces hypothèses nous ont permis de réduire considérablement le nombre des paramètres ajustables afin de déterminer plus facilement l'origine de l'activité optique de SHG du collagène de type I. Dans ces conditions, les résultats donnés dans le Tab. 3.3 montrent que les paramètres chiraux f_s , g_s et h_p comportent tous des contributions locales et non locales. En conclusion, les deux effets locaux et non locaux contribuent aux effets chiroptiques de SHG du collagène I.

Enfin, nous avons déterminé la dépendance en longueur d'onde des effets chiroptiques de SHG. Plus précisément, nous avons mesuré l'angle de rotation Φ dans les expériences de ORD-SHG pour quelques longueurs d'onde du visible. Nous avons obtenu les valeurs suivantes : -34° à $\lambda=874$ nm, -40° à $\lambda=800$ nm, -42° à $\lambda=774$ nm et -60° à $\lambda=550$ nm avec des erreurs de typiquement $\pm 5^\circ$. Remarquons que l'angle de rotation augmente quand la longueur d'onde diminue, mais conserve le même ordre de grandeur.

Expériences de SHG en surface sur des films minces des collagènes IV

Nous avons effectué les mêmes expériences que pour le collagène I, à une longueur d'onde d'excitation de 800 nm. Les résultats obtenus pour l'expérience de rotation optique ORD-SHG sont donnés sur la Fig. 3.13. Cette figure montre que les molécules de collagène de type IV

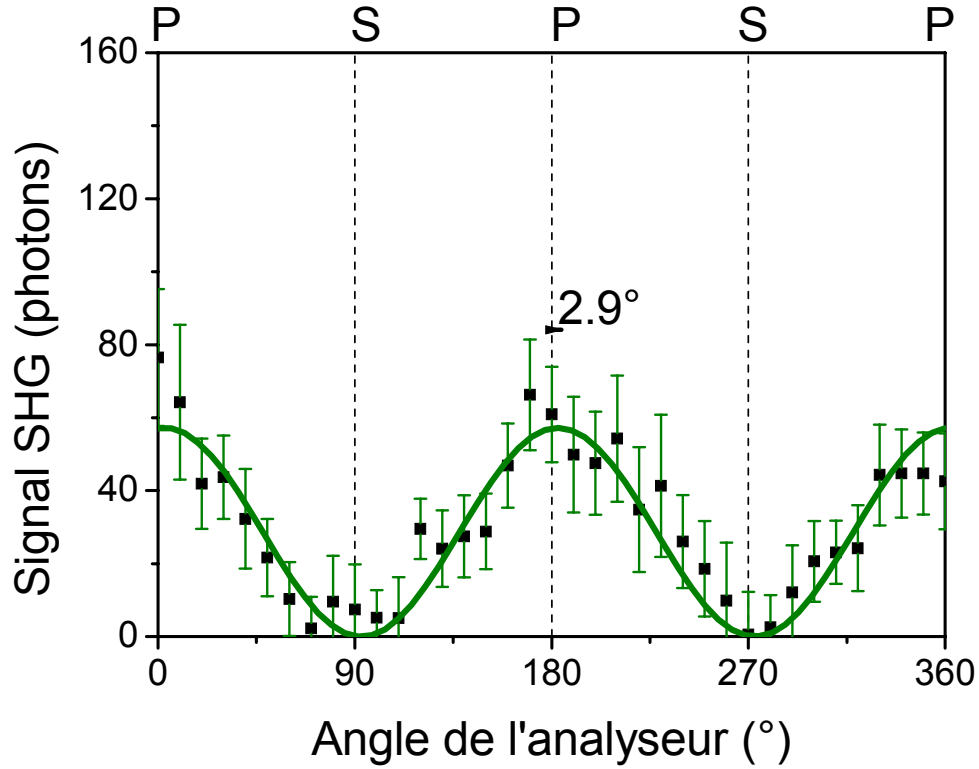


FIG. 3.13 – **Signal SHG créé par le film mince des molécules de collagène de type IV** en fonction de l'angle de l'analyseur ($\lambda=800$ nm, $P=400$ mW). Le signal SHG est acquis pendant 500 ms et ensuite la moyenne du signal sur 20 mesures est déterminée. Le bruit mesuré en absence du laser a été soustrait. Les barres d'erreurs correspondent aux erreurs statistiques. Le trait plein correspond à l'ajustement des données expérimentales avec la formule 3.24.

peuvent produire un signal SHG détectable et que l'ordre de grandeur du signal émis est 2 fois plus petit que celui du signal SHG créé par le collagène I (voir Fig. 3.10). La comparaison des courbes expérimentales ORD-SHG obtenues pour les deux types de collagène montre que la partie achirale (polarisée suivant la direction p) du signal SHG émis par le collagène de type IV, 60 photons/500 ms, est approximativement du même ordre de grandeur que la partie achirale du signal SHG émis par le collagène I, c'est-à-dire 80 photons/500 ms. Contrairement au collagène de type I, les molécules de collagène IV ne présentent pas de rotation de la polarisation du signal SHG émis. Celui-ci est parfaitement polarisé suivant la direction p , comme le signal SHG créé par un film mince des molécules achirales. De même, nous n'avons pas observé de différence linéaire, ni de différence circulaire pour ce type de collagène.

3.5 Discussion

Nous avons mené des expériences de génération de seconde harmonique en surface afin de mesurer les effets chiroptiques des molécules de collagène et déterminer les propriétés optiques non linéaires des collagènes I et IV. Les expériences de caractérisation des échantillons, telles que l'absorption à 1 photon, la fluorescence 1PEF et 2PEF et l'imagerie TEM, confirment que nous avons étudié des molécules de collagène I et non pas des fibrilles. Les spectres de dichroïsme circulaire et toutes les mesures d'activité optique de SHG montrent que le collagène de type I présente une activité optique linéaire, ainsi qu'une activité optique non-linéaire, alors que le collagène de type IV a une activité optique linéaire plus faible et ne présente pas d'activité optique de SHG. Nous avons attribué ces résultats au fait que le collagène IV a une structure en triple hélice moins continue que celle du collagène de type I et souvent interrompue par des domaines non collagéniques.

Considérons maintenant l'activité optique de SHG du collagène de type I. En étudiant la dépendance en longueur d'onde des effets chiroptiques de SHG, nous avons observé que l'angle de rotation augmente quand la longueur d'onde diminue, i.e. quand on s'approche de la résonance, mais que les valeurs obtenues pour cet angle de rotation conservent le même ordre de grandeur. Ce résultat est en accord avec les modélisations de l'activité optique de SHG provenant d'un couplage excitonique [Hache et al., 2003]. Plus généralement, la symétrie de Kleinman [Boyd, 2003] énonce que, hors résonance, toutes les composantes du tenseur de susceptibilité sont égales dans l'approximation dipolaire électrique. Mais comme $\chi_{xyz}^{(2)eee} = \chi_{xzy}^{(2)eee} = -\chi_{yxz}^{(2)eee} = -\chi_{yzx}^{(2)eee}$ (voir page 53), ceci implique que toutes les composantes chirales du tenseur de susceptibilité dipolaire électrique s'annulent. Par conséquent, il n'est pas possible d'observer des effets chiroptiques quand la symétrie de Kleinman s'applique. Comme il a été décrit ci-dessus, cette approximation est valide seulement loin d'une résonance à 1 photon et à 2 photons. Les effets chiroptiques deviennent plus importants quand on s'approche des résonances. Nos résultats expérimentaux sont en accord avec ces considérations, bien que les effets chiroptiques observés pour une excitation à 800 nm, loin de la résonance à 2 photons à 400 nm et à 1 photon à 200 nm, soient très importants. Cette différence quantitative indique que d'autres contributions existent, en dehors des contributions dipolaires électriques à l'activité optique de SHG. Ainsi, si on considère que le paramètre f_p est dominé par des contributions dipolaires électriques, d'après le Tab. 3.3, le paramètre f_s comprend des contributions dipolaires électriques ($f'_s = -0.66$) et des contributions "magnétiques" ($f''_s = 0.60$) du même ordre de grandeur. Ce résultat peut aussi être qualitativement déduit à partir des expériences de ORD-SHG et LD-SHG sensibles aux contributions dipolaires électriques et à partir des expériences de CD-SHG sensibles aux contributions "magnétiques". Nos résultats montrent que le collagène I présente une activité optique de SHG dans les deux cas, ce qui implique un mélange des contributions dipolaires électriques et "magnétiques". Par conséquent, l'origine de l'activité optique de SHG du collagène fibrillaire de type I est due à des mécanismes plus complexes que le couplage excitonique ou la chiralité à 1 électron (voir page 57) et celle-ci implique les deux mécanismes. Cette complexité au niveau de la détermination de l'origine phy-

sique de l'activité optique de SHG est similaire aux difficultés encourues lors de la modélisation du spectre CD du collagène. En effet, les modèles théoriques ne reproduisent pas correctement le spectre CD du collagène, bien qu'ils reproduisent parfaitement les spectres CD des autres protéines [Bhatnagar and Gough, 1996, Sreerama and Woody, 2004].

Cette analyse exhaustive de l'activité optique de SHG du collagène de type I nous donne un ordre de grandeur des contributions chirales. Si on compare les valeurs des paramètres f_s et f_p , obtenues dans l'expérience ORD-SHG, nous avons un rapport de $|f_s|^2 / |f_p|^2 = 0.8$ pour une excitation à 800 nm. Pour un faisceau fondamental polarisé suivant la direction p , le signal SHG créé contient une composante chirale $I_{chirale} \propto |f_s|^2$ et une composante achirale $I_{achirale} \propto |f_p|^2$:

$$I(2\omega) = I_{chirale} + I_{achirale} \propto |f_s|^2 + |f_p|^2 \quad (3.31)$$

Puisque $|f_s|^2 \approx |f_p|^2$ il en résulte que la composante chirale a typiquement le même ordre de grandeur que la composante achirale. Par conséquent, les contributions chirales exaltent le signal SHG du collagène de type I d'un facteur 2. Même si ce facteur peut varier avec la longueur d'onde d'excitation ou la polarisation du faisceau excitateur, il nous donne tout de même un ordre de grandeur pour l'exaltation du signal SHG par la chiralité du collagène de type I.

Cet ordre de grandeur n'est cependant valable que pour les expériences de génération de seconde harmonique en surface et la généralisation aux expériences de microscopie SHG n'est pas directe. En effet, dans les expériences de SHG en surface la composante achirale du tenseur de susceptibilité résulte d'un moyennage des composantes achirales des tenseurs d'hyperpolarisabilité des molécules déposées en film mince sur le substrat en silice. Ce film isotrope de molécules de collagène I est polarisé au moins en partie, c'est-à-dire que les molécules ont une certaine orientation par rapport au substrat, autrement on n'aurait pas de signal SHG achiral. A priori la molécule de collagène se fixe sur le substrat en silice (rendu préalablement hydrophile) par la partie N-terminale qui est hydrophile. Puisque le degré de polarisation et l'angle moyen formé par la chaîne polypeptidique de la molécule avec la normale à la surface ne sont pas déterminés de façon quantitative, nous ne pouvons pas déduire une valeur quantitative pour la composante achirale de la susceptibilité des expériences de SHG en surface. Cette composante achirale peut de plus avoir une valeur différente pour le collagène macrostructuré, donc dans les tissus. Dans ce cas, les molécules de collagène sont polarisées en nanofibrilles [Holmes et al., 2001, Stoller et al., 2003] et même si cette polarité peut être partiellement perdue à l'échelle micrométrique, la composante achirale du tenseur de susceptibilité peut avoir une valeur plus importante que dans les expériences de SHG en surface. Finalement, ces expériences sous-estiment peut être les contributions achirales et conduisent sans doute à surévaluer les composantes chirales dans les tissus. Cependant, elles fournissent un ordre de grandeur raisonnable qui nous permet d'affirmer que les contributions chirales ne sont pas dominantes.

Nous avons ainsi démontré que les contributions chirales exaltent le signal SHG du collagène I d'un facteur de l'ordre de 2. Par conséquent, la chiralité du collagène I n'est pas suffisante pour expliquer les importants signaux SHG observés dans le tissu pour ce collagène. Pour rendre compte du rôle du type de collagène et de la chiralité dans la génération de seconde

harmonique par le collagène, nous allons comparer les expériences de SHG en surface et de microscopie SHG effectuées pour le collagène I et le collagène IV. Les expériences de SHG en surface ont montré que les signaux SHG créés par les films minces des collagènes I et IV ont typiquement le même ordre de grandeur, alors que dans les tissus ces deux collagènes présentent des comportements différents : le collagène non fibrillaire de type IV ne présente pas de signal SHG, alors que le collagène fibrillaire de type I présente un fort signal SHG dans les mêmes conditions d'excitation. Compte tenu de ces observations et du fait que le signal SHG s'annule en milieu isotrope, nous pouvons en conclure que l'organisation du collagène de type IV dans les membranes basales est approximativement isotrope. Ceci est en accord avec les données trouvées dans la littérature pour la description de l'architecture de la membrane basale [Yurchenco and Schittny, 1990]. En effet, les molécules de collagène IV s'assemblent pour former des réseaux, sans aucun alignement des domaines collagéniques, de telle sorte qu'au niveau macroscopique le signal SHG peut s'annuler, bien qu'au niveau microscopique chaque molécule possède une hyperpolarisabilité non nulle comme il a été démontré dans les expériences de SHG en surface. Au contraire, les molécules de collagène de type I s'assemblent en fibrilles et ensuite plusieurs fibrilles vont former une fibre, etc. Au final la fibre présentera une densité très importantes des fibrilles bien alignées, donc un signal SHG très important puisqu'il varie avec le carré du nombre des molécules. Par conséquent, l'efficacité de génération de seconde harmonique par le collagène I est due à des effets cohérents au niveau des fibrilles de collagène parfaitement alignées et très denses. A partir de ces résultats nous pouvons conclure que le signal SHG est une sonde de l'organisation macromoléculaire du collagène.

3.6 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté une étude complète des propriétés optiques du collagène fibrillaire de type I et du collagène non fibrillaire de type IV par des expériences de dichroïsme circulaire conventionnel et de génération de seconde harmonique en surface résolue en polarisation. Ces expériences ont montré que le collagène de type IV a une activité optique linéaire bien moins intense que celle du collagène de type I et qu'il ne présente pas d'activité optique de SHG. Nous avons attribué cela aux nombreuses interruptions des domaines collagéniques de la triple hélice du collagène IV par des domaines non collagéniques. Pour le collagène de type I, nous avons montré qu'il présente une forte activité optique de SHG et un fort CD qui peuvent être attribués à des mécanismes de couplage excitonique et de chiralité à 1 électron. A partir de ces expériences de SHG en surface nous avons calculé que les contributions chirales exaltent le signal SHG du collagène de type I d'un facteur 2 seulement et que ce facteur n'est pas suffisant pour expliquer les forts signaux SHG observés en microscopie. Par conséquent, l'efficacité de génération de seconde harmonique par le collagène de type I est dominée par des effets cohérents au niveau de l'organisation très dense et quasi-cristalline des fibrilles de collagène bien alignées. Inversement, l'absence d'un alignement des domaines collagéniques lors de l'assemblage des molécules de

collagène de type IV explique l'absence du signal SHG au niveau macroscopique pour ce type de collagène, bien que les expériences de SHG en surface aient montré qu'au niveau microscopique chaque molécule possède une hyperpolarisabilité non nulle et du même ordre de grandeur que celle du collagène de type I.

Ces résultats peuvent être généralisés à d'autres types de collagène, en faisant l'hypothèse qu'ils ont une hyperpolarisabilité du second ordre non nulle : le signal SHG créé dépendra de leur macrostructure. Il est important de noter qu'à la différence de l'immunohistochimie, la microscopie SHG est sensible à l'organisation macromoléculaire du collagène dans les tissus, plutôt qu'au type de collagène. En conclusion, la microscopie SHG est une technique puissante pour étudier l'organisation du collagène dans les tissus. Plusieurs applications peuvent être envisagées, qui vont de l'étude de la fibrillogenèse du collagène et du remodelage de la matrice extracellulaire dans des processus normaux et pathologiques jusqu'à l'étude des accumulations pathologiques du collagène dans des processus comme la fibrose. Ce dernier point sera abordé dans le chapitre suivant. Tous ces résultats ont donné lieu à une publication dans *Journal of the American Chemical Society* [Pena et al., 2005a].

Chapitre 4

Imagerie multiphoton de la fibrose

Ce chapitre présente une application de la microscopie multiphoton à l'étude de fibroses collagéniques pulmonaires et rénales. La première partie décrit ce type de pathologie et définit les avantages de la microscopie multiphoton par rapport à d'autres techniques conventionnelles utilisées pour visualiser et quantifier la distribution de la fibrose (section 4.1). Dans la deuxième partie sont décrits les protocoles généraux d'acquisition, d'analyse et de quantification d'images (section 4.2) qui nous ont permis de caractériser l'architecture tridimensionnelle des fibroses pulmonaire (section 4.3) et rénale (section 4.4) et de définir des index pathologiques de fibrose. Ceci est déterminant pour sonder le rôle de certains facteurs dans la progression et la régression de la fibrose, comme nous allons le voir dans la section 4.4, et pour développer de nouvelles approches thérapeutiques.

4.1 Introduction

La fibrose est une lésion élémentaire du tissu conjonctif définie par l'augmentation des constituants fibrillaires de la matrice extra-cellulaire dans un tissu ou un organe. C'est une composante fréquente des processus inflammatoires mais peut aussi survenir dans d'autres conditions pathologiques (pathologies vasculaires, métaboliques, tumorales,...). La constitution d'une fibrose résulte d'une rupture de l'équilibre de la matrice extra-cellulaire : augmentation des processus de synthèse et de dépôt des constituants de la matrice extra-cellulaire d'une part et diminution de leur dégradation d'autre part. Une fois constituée, la fibrose peut rester stable, s'aggraver sous l'action répétée d'agressions tissulaires, ou régresser (évolution rare, concernant des fibroses récentes et nécessitant la disparition du stimulus initial de la fibrogenèse).

La fibrose affecte gravement le fonctionnement des organes concernés. En particulier, dans le rein et le poumon, cette pathologie conduit à une insuffisance rénale terminale et à une insuffisance respiratoire souvent létale à terme. De ce fait, les questions de la progression et plus encore, de la régression de la fibrose constituent un enjeu biomédical majeur et par conséquent, il est important de caractériser et quantifier la distribution des collagènes fibrillaires afin de suivre

l'évolution de ces processus lors des approches thérapeutiques. De nombreuses études cliniques et précliniques à l'aide de modèles animaux ont été menées à ce sujet. Néanmoins, les méthodes utilisées sont hétérogènes en spécificité et sensibilité, et sont rarement quantitatives. Une imagerie très spécifique des collagènes fibrillaires apparaît donc comme un outil idéal pour l'étude de la fibrose.

En effet, l'étude des fibres collagéniques repose pour l'instant essentiellement sur des analyses biochimiques, colorations et marquages immunohistochimiques de coupes histologiques, qui sont peu ou non quantitatifs, nécessitent un prélèvement par nature invasif du tissu à analyser et enfin ne permettent pas une vision tridimensionnelle des structures et des processus dans les tissus complexes.

L'analyse biochimique consiste à doser l'hydroxyproline, acide aminé dérivé de la proline et spécifique du collagène, après broyage du tissu. Le principe du dosage repose sur une réaction colorimétrique qui permet de révéler l'hydroxyproline et, ensuite, la mesure de variation d'absorption de la solution au spectrophotomètre est corrélée au contenu total en collagène de l'échantillon. Néanmoins, cette méthode n'est pas spécifique des collagènes fibrillaires, car tous les types de collagènes présents dans l'échantillon contribuent au dosage, et elle n'apporte aucun renseignement morphologique.

Les techniques immunohistochimiques permettent un marquage spécifique de différents types de collagène, mais elles se font sur coupe congelée et ne permettent pas une mesure quantitative du contenu total en collagène, car un petit nombre de marquages simultanés est possible à la fois pour les différents types de collagène.

Les techniques de colorations de coupes histologiques au rouge Sirius ou au trichrome de Masson sont assez peu quantitatives et ne sont pas spécifiques du type de collagène. Le trichrome de Masson colore tous les types de collagène soit en bleu soit en vert en fonction de la méthode de préparation utilisée. D'autre part, certains facteurs comme le pH du colorant (dont dépend la mise en évidence des fines fibres de collagène), la durée de coloration, les contraintes mécaniques appliquées au tissu ou l'arrangement compact de molécules de collagène au sein d'une fibre sont déterminants pour la couleur du marquage et, par conséquent, le contenu total en collagène peut être sous-estimé par cette technique basée sur l'observation d'une couleur spécifique [Sweat et al., 1968, Flint et al., 1975, Lanir et al., 1984, Whittaker et al., 1994]. Le picrosirius¹ est un marqueur plus spécifique du collagène que le trichrome de Masson. Il colore le collagène (type I, III, IV, V, ...) en rouge et le tissu musculaire en jaune, ce qui permet d'estimer plus facilement le contenu en collagène du tissu. D'autre part, les tissus marqués au picrosirius peuvent être visualisés par microscopie optique en lumière polarisée circulairement, compte tenu de la biréfringence naturelle de différents types de collagène (plus importante pour le type I que pour les autres) qui est de plus exaltée par le rouge Sirius dont l'organisation moléculaire est anisotrope. Ceci permet donc de visualiser uniquement le collagène [Whittaker et al., 1994] et par conséquent cette méthodologie est ainsi plus adaptée à la quantification du collagène que le marquage au trichrome de Masson

¹Solution saturée de rouge Sirius dans de l'acide picrique.

ou les autres colorations habituelles.

Toutefois, les méthodes décrites ci-dessus ont un grand désavantage : l'impossibilité de sonder un tissu en volume, car elles sont limitées à une coupe histologique fine, et par conséquent elles ne permettent pas de révéler l'architecture tridimensionnelle des fibres, encore moins de façon quantitative. Contrairement à ces techniques conventionnelles, la génération de seconde harmonique est une sonde de l'organisation macromoléculaire du collagène dans les tissus, comme nous l'avons démontré dans le chapitre précédent. Dans ce contexte, la microscopie SHG apparaît comme une technique particulièrement appropriée à l'étude de la fibrillogenèse du collagène, donc des fibres collagéniques, pour les raisons suivantes :

- grande spécificité pour le collagène fibrillaire
- faible invasivité, car aucune manipulation des tissus
- robustesse par rapport à la diffusion, ce qui permet une imagerie 3D en profondeur
- caractère quantitatif du signal et donc possibilité de quantifier la fibrose
- combinaison possible avec d'autres contrastes multiphoton

Ce dernier point est essentiel pour réaliser une imagerie fonctionnelle multimodale. La morphologie du tissu peut ainsi être visualisée à la fois par la SHG par le collagène et par sa fluorescence intrinsèque : NADH, flavines, élastine, . . . Mais le grand avantage de la microscopie multiphoton pour l'étude des fibres est donné par le caractère quantitatif des signaux multiphoton et, en particulier, celui du signal SHG.

Dans la partie suivante nous allons présenter le protocole général d'acquisition et de traitement d'images utilisé pour l'étude de la fibrose pulmonaire et rénale, ainsi que la façon dont nous avons quantifié la fibrose à partir du signal SHG créé par le collagène fibrillaire. Nous avons utilisé cette méthode pour la quantification de la fibrose pulmonaire et rénale, mais elle peut être appliquée à l'étude d'autres types de fibres et, plus généralement, elle peut être utilisée pour quantifier le collagène macrostructuré de divers tissus et organes.

4.2 Protocoles expérimentaux. Quantification d'images

4.2.1 Protocoles expérimentaux

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre (page 10), les images combinées SHG/2PEF ont été acquises à l'aide du microscope multiphoton dans une géométrie droite. Nous avons utilisé un objectif à immersion à eau 20× (Olympus) d'ouverture numérique effective 0.8 pour tous les échantillons examinés (poumon, rein - frais, fixés ou congelés), à l'exception des biopsies de poumon humain où un objectif à air 10× (Olympus) d'ouverture numérique 0.25 a été utilisé, afin d'avoir un champ de vue plus grand.

En fonction du type d'échantillon, les signaux créés ont été détectés soit en transmission, soit en épiscollection. Ainsi, pour des biopsies de quelques μm d'épaisseur ($\sim 6 \mu\text{m}$) le signal de fluorescence 2PEF a été détecté en épiscollection et le signal de génération de seconde harmonique

SHG en transmission. Mais pour des échantillons épais, puisqu'il n'est plus possible de faire une détection en transmission, tous les signaux ont été détectés en épiscollection (voir Fig. 4.1) et séparés à l'aide d'un miroir dichroïque et de filtres appropriés. L'échantillon est placé dans un support et immobilisé entre deux lamelles de microscope ce qui permet d'avoir une surface plane, donc une zone de balayage la plus grande possible ($\sim 1 \text{ mm}^2$).

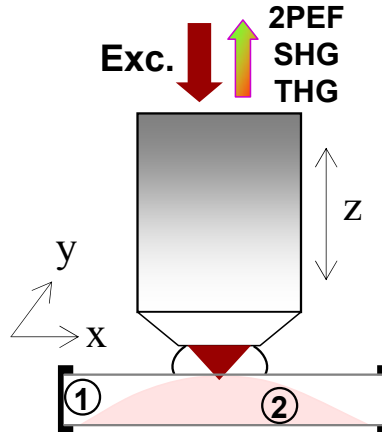


FIG. 4.1 – **Configuration expérimentale pour les expériences menées sur des échantillons épais.** Les signaux sont détectés en épiscollection. L'échantillon ② est placé dans un support ① entre deux lamelles de microscope, en immersion dans une solution (sérum physiologique, paraformaldéhyde ou une solution aqueuse de PBS (Phosphate Buffered Saline)) adaptée au type de préparation de l'échantillon (frais, fixé).

Les filtres utilisés systématiquement dans nos expériences sont : un filtre interférentiel à $\lambda_{excitation}/2$ pour détecter le signal SHG, un filtre passe-haut en longueur d'onde pour détecter le signal de fluorescence et un filtre passe-bas en longueur d'onde coupant l'infrarouge. Par exemple, pour une excitation à 860 nm nous avons utilisé un filtre interférentiel à 430 nm (HQ430/20, Chroma) pour le signal SHG, un filtre GG455 pour le signal 2PEF et 2 filtres E700SP (Chroma) pour couper le laser.

Le traitement d'images a été effectué avec les logiciels ImageJ (W. Rasband, National Institute of Health) et Amira (Mercury Computer Systems) comme il a été décrit dans le premier chapitre (page 13).

Les spectres d'absorption et de fluorescence excitée à 1 photon des produits utilisés pour colorer ou marquer les coupes histologiques ont été acquis à l'aide d'un spectrophotomètre CARY500 (Varian) et un spectrofluorimètre Hitachi F-4500. Nous avons aussi mesuré leur spectre de fluorescence excitée à deux photons avec le spectrofluorimètre à 2 photons décrit préalablement dans la section 2.4.1, à la page 33, et déterminé les spectres de signaux multiphoton endogènes et exogènes *in situ* avec un filtre interférentiel accordable (S-60, Schott), dont le principe de mesure a été décrit dans la section 1.2 à la page 12.

4.2.2 Principe de la quantification du signal SHG

La relation entre la quantité de collagène contenu dans un échantillon et le signal SHG créé par celui-ci n'est pas simple du fait de la nature cohérente de ce phénomène optique non-linéaire. Comme nous l'avons discuté dans le premier chapitre (section 1.1, page 8), pour une distribution homogène, le signal SHG varie avec le carré du nombre d'harmonophores (molécules diffusantes) N^2 qui se trouvent dans le volume d'excitation. Au contraire, dans le cas d'une distribution hétérogène à l'échelle microscopique, le signal SHG dépend fortement de la distribution spatiale d'harmonophores dans le volume focal [Freund and Deutsch, 1986, Mertz and Moreaux, 2001, Stoller et al., 2003, Williams et al., 2005].

Compte tenu de l'hétérogénéité de la fibrose pulmonaire et rénale tant à l'échelle macroscopique qu'à l'échelle microscopique, il est difficile de relier l'intensité du signal SHG ou la racine carrée de celle-ci à une densité d'harmonophores. De ce fait, nous avons décidé de quantifier l'extension de la fibrose dans le tissu en calculant la densité de pixels présentant un signal SHG significatif. Pour cela, nous avons restreint l'analyse quantitative à des profondeurs de tissu de 80 μm où l'intensité des signaux SHG détectés était plus grande que le bruit. Dans nos conditions expérimentales, l'intensité du signal SHG était de 50 photons détectés/pixel dans la plèvre viscérale, de 5 à 10 photons détectés/pixel dans une zone fibrosée profonde et la valeur maximale du bruit de 4 photons détectés/pixel. Nous avons ensuite appliqué à nos images un seuil égal à la valeur maximale du bruit : pour chaque pixel d'une image si l'intensité du pixel est plus grande que le seuil, on lui attribue la valeur 1 et dans le cas contraire on lui attribue la valeur 0. De cette façon, on calcule facilement le pourcentage de pixels correspondant à un signal SHG significatif (dit "pixels SHG"). Ensuite, on calcule la moyenne de ces pourcentages pour une pile d'images SHG de taille (x,y) acquises à différentes profondeurs dans le tissu et on obtient ainsi la densité de pixels SHG dans le volume xyz , c'est-à-dire une densité volumique de pixels SHG. Cette dernière valeur représente l'index ou le score de fibrose.

Pour vérifier la reproductibilité des scores d'un échantillon à l'autre, nous avons toujours comparé des volumes identiques de tissu excité dans les mêmes conditions. Afin de réduire les incertitudes, le signal SHG mesuré a été normalisé par le carré de la puissance d'excitation avant seuillage. Nous avons aussi pris en compte les éventuels changements de durée d'impulsions ou de conditions de focalisation du faisceau laser d'un jour à l'autre. Pour cela, nous avons utilisé comme référence pour toutes les expériences le signal SHG créé par les fibres de collagène présentes dans le derme d'une biopsie de peau humaine (fixée avec du paraformaldéhyde à 4 % en volume puis incluse dans la paraffine). Un facteur de correction est appliqué chaque fois que l'intensité du signal SHG de référence change.

Enfin, l'efficacité de génération de seconde harmonique par le collagène varie avec l'orientation du collagène par rapport à la direction de polarisation du faisceau excitateur : elle est maximale quand la direction de polarisation du faisceau excitateur est parallèle à la direction longitudinale de la fibrille (fibre) de collagène [Roth and Freund, 1979, Stoller et al., 2002b, Stoller et al., 2002a, Yasui et al., 2004]. Afin de minimiser ces effets d'orientation, nous avons utilisé une lame quart-

d'onde qui permet de changer la polarisation linéaire du faisceau excitateur en une polarisation circulaire. Ainsi, nous allons sonder toutes les directions des fibres de collagène et les visualiser indépendamment de leur orientation.

4.3 Fibrose pulmonaire

Dans cette section nous nous sommes focalisés sur l'étude de la fibrose pulmonaire idiopathique (IPF - Idiopathic pulmonary fibrosis), une maladie progressive de cause inconnue, caractérisée par l'accumulation anormale dans le poumon de fibroblastes et de protéines de la matrice extracellulaire, donc de collagène. C'est une maladie grave qui touche préférentiellement les adultes (âge moyen entre 40 ans et 70 ans) et dont la médiane de survie est comprise entre 3 et 8 ans à partir du début des symptômes [ATS/ERS, 2000]. Actuellement, la pathogenèse de la fibrose pulmonaire idiopathique n'est pas connue et il n'existe aucun traitement ayant démontré son efficacité. Il est supposé que la lésion de l'épithélium alvéolaire est à l'origine de cette maladie. Cette lésion entraîne l'activation et la prolifération de fibroblastes, accompagnées d'une faible inflammation, suivies de l'accumulation de composantes de la matrice extracellulaire telles que les collagènes et finalement de la destruction de l'architecture pulmonaire [Selman et al., 2004].

Jusqu'à présent les diverses approches thérapeutiques de la fibrose idiopathique ont ciblé les facteurs proinflammatoires, mais récemment le degré auquel l'inflammation en elle-même conduit à l'installation de la fibrose a été réévalué. Les essais cliniques se sont focalisés sur la contribution de la fibrillogenèse *per se* et du remodelage de la matrice dans le développement de l'IPF [Chapman, 2004]. La difficulté de distinguer le processus fibrosant de la réaction inflammatoire associée peut, en partie, expliquer l'absence d'un traitement efficace de cette maladie. Pour une meilleure compréhension de ces mécanismes, il est impératif d'avoir de nouveaux outils permettant d'évaluer la progression de la maladie, donc une méthode fiable et reproductible pour quantifier la fibrose pulmonaire.

Nous proposons donc ici d'utiliser la microscopie multiphoton pour quantifier et visualiser l'architecture tridimensionnelle de la fibrose pulmonaire. Ce projet a été mené en collaboration avec l'équipe de Bruno Crestani (U700 Inserm /Hôpital Bichat) dans le cadre de la thèse d'Aurélien Fabre. Nous allons tout d'abord décrire la structure du poumon, le modèle murin de fibrose pulmonaire et la préparation des échantillons de poumon de souris et de poumon humain (section 4.3.1). Ensuite nous allons présenter les résultats expérimentaux : la mise en évidence des signaux endogènes du poumon normal (sous-section 4.3.2.1), la visualisation de l'architecture de la fibrose pulmonaire par SHG (sous-section 4.3.2.2), l'analyse quantitative du signal SHG - proposition des scores de fibrose (sous-section 4.3.2.3) et l'imagerie multiphoton de la fibrose pulmonaire humaine idiopathique (sous-section 4.3.2.4), et finalement les conclusions.

4.3.1 Structure du poumon et modèle murin de fibrose pulmonaire. Préparation des échantillons

Description de la structure du poumon

Le poumon est un organe situé dans la cavité thoracique permettant d'échanger des gaz vitaux, notamment l'oxygène et le dioxyde de carbone [Tortora and Grabowski, 2004, Wang, 2002]. Il est protégé par une double membrane nommée membrane pleurale. La couche extérieure de celle-ci, appelée plèvre pariétale, est attachée à la paroi de la cavité thoracique et au diaphragme, et la couche intérieure, appelée plèvre viscérale, est attachée aux poumons. La cavité enfermée entre les deux plèvres est nommée cavité pleurale; elle contient un liquide lubrifiant qui permet de réduire les frictions entre le poumon et la cavité thoracique lors de la respiration.

Chaque poumon a une disposition globale pyramidale et des scissures profondes (invaginations de la plèvre viscérale) divisent le poumon en plusieurs lobes², chaque lobe ayant sa propre bronche secondaire (voir l'arbre bronchique dans la Fig. 4.2 en haut à gauche)³. Puis chaque lobe se divise en plusieurs segments chacun ayant sa propre bronche tertiaire et chaque segment, à son tour, se subdivise en plusieurs compartiments nommés lobules.

Le lobule est l'unité fonctionnelle du poumon (c'est à ce niveau que se font les échanges gazeux) dont la structure est donnée sur la Fig. 4.2. Chaque lobule comporte un vaisseau lymphatique, une artériole, une veinule et une bronchiole terminale qui se subdivise en quelques bronchioles respiratoires qui à leur tour se subdivisent en canaux alvéolaires. Deux ou trois alvéoles qui partagent une même ouverture sur un canal alvéolaires forment un sac alvéolaire. Dans les alvéoles on retrouve des macrophages, cellules phagocytaires dont le rôle est d'éliminer les particules de poussière et les éventuelles débris cellulaires, qui sont présents en grand nombre au cours d'une inflammation. L'ensemble de ces conduits et des sacs alvéolaires constituent les poumons et leur confèrent leur aspect spongieux.

Anatomiquement, la paroi des conduits respiratoires subit de profondes modifications selon le degré de ramification : les anneaux de cartilage présents dans la trachée sont progressivement remplacés par des petites plaques de cartilage qui disparaissent complètement au niveau des bronchioles. De plus, au fur et à mesure que le cartilage disparaît, on voit apparaître de plus en plus de cellules musculaires lisses. La paroi des bronchioles terminales, respiratoires, . . . ainsi que celle des alvéoles ne comprennent plus du cartilage, mais des fibres élastiques, fibres réticulaires et fibres de collagène qui leur confèrent en même temps résistance et élasticité. Toutes les structures du poumon sont soutenues par une toile délicate de fibres élastiques et de fibres collagéniques.

²Chez l'homme le poumon droit se subdivise en trois lobes (supérieur, moyen et inférieur) et le poumon gauche en deux lobes (supérieur et inférieur). Chez la souris le poumon est constitué de quatre lobes à droite et un lobe unique à gauche.

³L'arbre bronchique est formé de la trachée qui ensuite se divise en bronches primaires, bronches secondaires et bronches tertiaires jusqu'aux bronchioles, bronchioles terminales, bronchioles respiratoires, canaux alvéolaires, sacs alvéolaires et alvéoles.

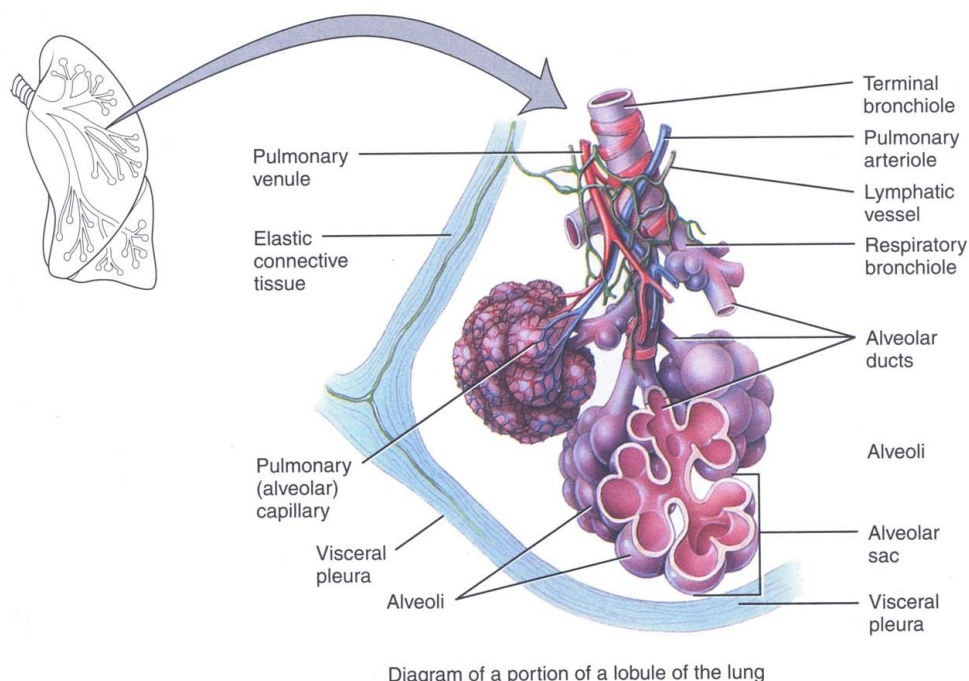


FIG. 4.2 – **Description d'un lobule pulmonaire** (cette partie du poumon est accessible par microscopie multiphoton). En haut à gauche est schématisé l'arbre bronchique pulmonaire formé de la trachée qui ensuite se divise en bronches primaires, puis secondaires et tertiaires jusqu'aux bronchioles, bronchioles terminales, ... Cette figure est extraite de la référence [Tortora and Grabowski, 2004].

Nous allons voir dans la section 4.3.2.1 quelles sont les principales structures du poumon que nous pouvons visualiser par microscopie multiphoton.

Modèle murin de fibrose pulmonaire

La fibrose pulmonaire a été induite chez la souris par administration intratrachéale de bléomycine [Adamson, 1984] par nos collaborateurs de l'hôpital Bichat-Claude Bernard. La bléomycine est un médicament cytostatique utilisé habituellement dans le traitement du cancer et qui induit, comme effet secondaire de son usage thérapeutique, une inflammation pulmonaire qui progressivement évolue en fibrose pulmonaire. L'injection de bléomycine chez la souris induit une fibrose pulmonaire avec cependant une différence de susceptibilité en fonction de la souche utilisée. Dans cette étude, nous utilisons des souris de la souche C57Black/6 qui sont particulièrement sensibles à la bléomycine.

Chez la souris les expériences ont été menées sur des mâles adultes de souche C57Black/6, d'âge moyen compris entre 6 et 7 semaines et de poids compris entre 20 et 24 g (Janvier, Le Genest Saint Isle, France), en accord avec les directives institutionnelles et les règlements internationaux. Les animaux ont eu libre accès à l'eau et à la nourriture, avant et pendant les traitements pharmacologiques. À J0 (jour 0), les souris ont été anesthésiées avec une injection intramusculaire

de 100 μ l de kétamine hydrochloride (45 mg/Kg) et de xylazine à 2 % (9 mg/Kg). Ensuite, elles ont reçu une dose unique de bléomycine hydrochloride (bleomycine, Bellon, Aventis, Paris, France), administrée par voie intratrachéale à une concentration de 80 μ g dans 50 μ l de solution saline stérile à 0.9 %. Des souris C57Black/6 n'ayant reçu aucun traitement pharmacologique ont été utilisées comme souris témoins.

14 jours (J14) après l'administration de la bléomycine, les animaux ont reçu une dose létale de kétamine hydrochloride (60 mg/Kg) et de xylazine (8 mg/Kg) et ils ont été sacrifiés pour les analyses décrites ci-après.

Préparation des échantillons

Poumon de souris

Premièrement, des lobes pulmonaires intacts fraîchement excisés après lavage bronchoalvéolaire à travers la trachée (4 fois successivement avec 0.25 ml de solution saline à 0.9 %) ont été visualisés *ex vivo* par microscopie multiphoton ou congelés directement pour des cryosections. Deuxièmement, des lobes pulmonaires ont été fixés par inflation avec de la paraformaldéhyde à 4 %, après sectionnement de l'artère aorte abdominale ou après lavage bronchoalvéolaire à travers la trachée. Les poumons ont été ainsi fixés pendant 24 h puis visualisés par microscopie multiphoton ou inclus directement dans un bloc de paraffine. À partir de ce dernier, des coupes histologiques d'épaisseur 5 μ m ont été soit visualisées directement par microscopie multiphoton soit utilisées pour des colorations histologiques conventionnelles telles que l'hématoxyline-phloxine-safran (HPS), l'orcéine, le picrosirius ou le trichrome de Masson.

Nous avons aussi marqué les macrophages (cellules du système immunitaire) par immunofluorescence. Pour cela, des cryosections ont été incubées pendant 1 h à la température ambiante avec un anticorps CD11c produit chez le hamster pour la souris (hamster anti-mouse CD11c antibody à 6.25 μ g/ml, BD Biosciences) et révélé avec un deuxième anticorps (goat anti-hamster IgG) produit chez la chèvre pour le hamster, ce dernier étant couplé avec un fluorophore exogène. Nous avons choisi d'utiliser le fluorophore Alexafluor 568 (15 μ g/ml, Molecular Probes, Invitrogen) car il présente une émission dans une gamme de longueurs d'onde facile à séparer des signaux endogènes. Son spectre de fluorescence est montré sur la Fig. 4.3 avec un maximum d'émission vers 603 nm, loin des maxima de fluorescence endogène.

Poumon humain

Nous avons étudié des biopsies pulmonaires humaines prélevées à visée diagnostique (n=2 où n représente le nombre de patients). Une fibrose pulmonaire idiopathique conforme aux critères du consensus international ATS-ERS [ATS/ERS, 2000] a été diagnostiquée chez ces patients. Des biopsies pulmonaires prélevées chez des patients sans fibrose, lors d'une excision chirurgicale d'une tumeur pulmonaire, ont été utilisées comme échantillons témoins. Ces prélèvements ont été fixés avec de la paraformaldéhyde à 4 %, inclus dans la paraffine et ils ont été soit directement visualisés par microscopie multiphoton, soit colorés avec du HPS et du trichrome de Masson.

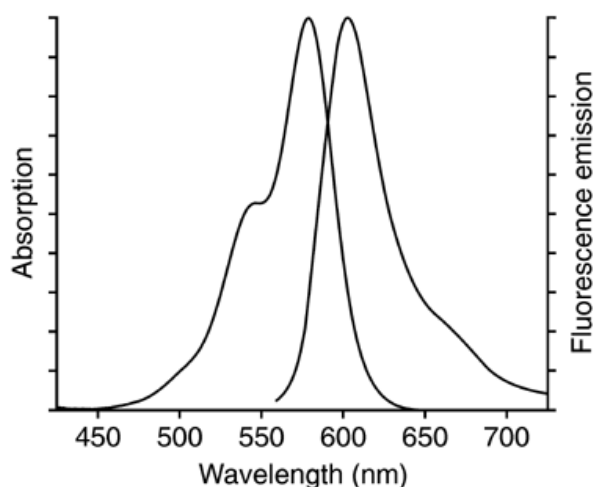


FIG. 4.3 – **Spectre d’absorption et spectre de fluorescence du fluorophore Alexafluor 568.** Ce spectre provient du site internet de Molecular Probes, Invitrogen (<http://probes.invitrogen.com>).

4.3.2 Résultats expérimentaux et discussion

4.3.2.1 Mise en évidence des signaux endogènes du poumon normal

Nous avons tout d’abord mené des expériences *ex vivo* sur des lobes pulmonaires intacts fraîchement excisés. Chaque lobe a été placé avec la surface plane vers le bas dans le support indiqué sur la Fig. 4.1 et en solution saline à 0.9 %. Nous avons utilisé une puissance moyenne d’excitation de 30 mW à 860 nm et, dans ces conditions d’excitation, nous n’avons pas observé de changements significatifs d’intensité des signaux créés, ni de modifications morphologiques du tissu lorsque l’on excite continûment pendant une durée de 20 minutes. Plusieurs piles d’images ont été acquises à partir de la surface du poumon et jusqu’à des profondeurs de 90 - 100 μm . On excite ainsi tout d’abord la plèvre viscérale, les alvéoles, etc..

La Fig. 4.4 regroupe quelques images multiphoton du tissu pulmonaire acquises à différentes profondeurs. Elle présente des images SHG acquise à la surface du poumon (Fig. 4.4a) au niveau de la plèvre viscérale et plus en profondeur (Fig. 4.4b) dans le parenchyme pulmonaire à 21 μm sous la surface. Ces images illustrent la distribution de fibres de collagène dans la plèvre viscérale (Fig. 4.4a), qui forment un réseau assez élastique pour pouvoir se dilater lors de la respiration, et celle des fines fibres de collagène dans les parois alvéolaires (Fig. 4.4b). Nous avons attribué le signal SHG au collagène fibrillaire (essentiellement collagène de type I) en tenant compte de sa distribution dans le poumon et de l’aspect fibrillaire des structures mises en évidence par microscopie SHG.

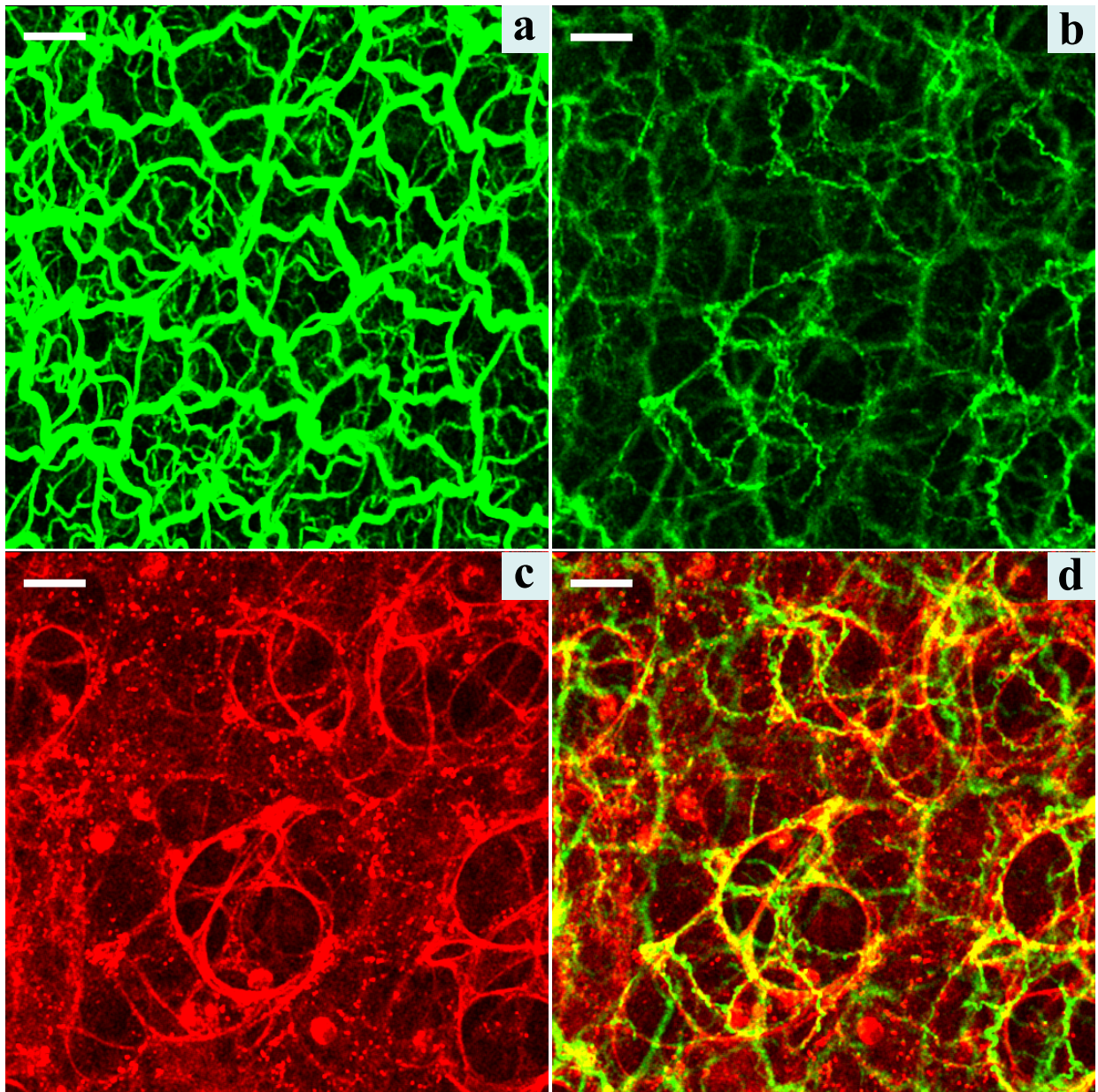


FIG. 4.4 – Images multiphoton *ex vivo* de poumon normal de souris (excitation 860 nm, 30 mW, temps d'acquisition 4.9 s/image, taille 585×561 pixels, barre d'échelle : 25 μm). En vert est représenté le signal SHG, en rouge le signal 2PEF et leur co-localisation est désignée par la couleur jaune. **a** Image SHG qui cartographie la distribution des fibres de collagène dans la plèvre ; **b** Image SHG de fibres de collagène dans les parois alvéolaires, acquise 21 μm en profondeur ; **c** Image 2PEF acquise à la même profondeur que l'image **b** et qui met en évidence les fibres élastiques dans les alvéoles, les cellules de l'épithélium bronchique et les macrophages (structures rondes) ; **d** Image combinée SHG/2PEF de **b** et **c**.

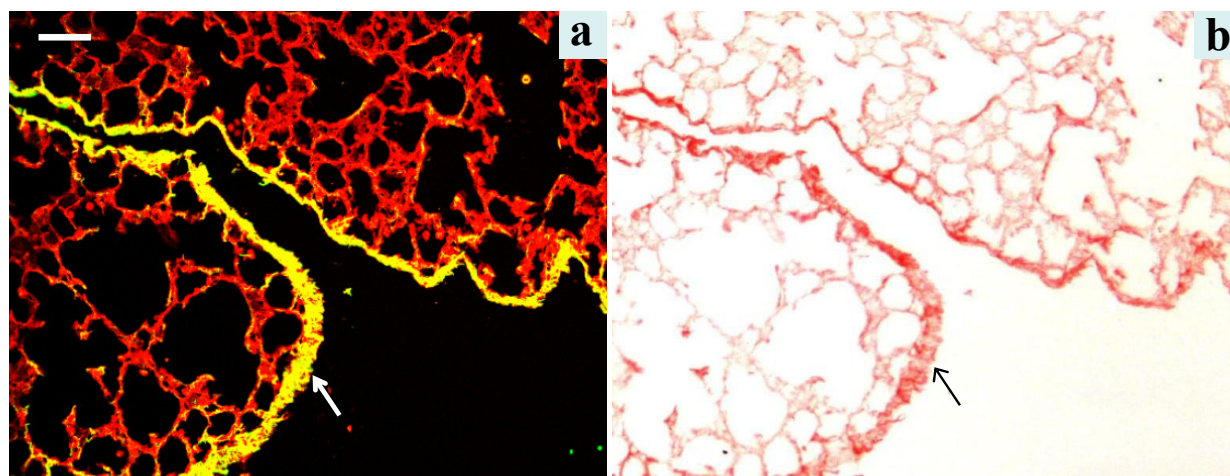


FIG. 4.5 – Attribution de signaux endogènes du poumon. **a** Image combinée SHG/2PEF et **b** image acquise en lumière directe d'une biopsie de poumon normal colorée au picosirius (barre d'échelle : 50 μm), prélevée au niveau du lobule pulmonaire et qui illustre une scissure interlobaire. Les fibres de collagène colorées en rouge dans l'image en lumière directe (flèche noire) sont clairement colocalisées avec le signal SHG (flèche blanche) dans l'image multiphoton.

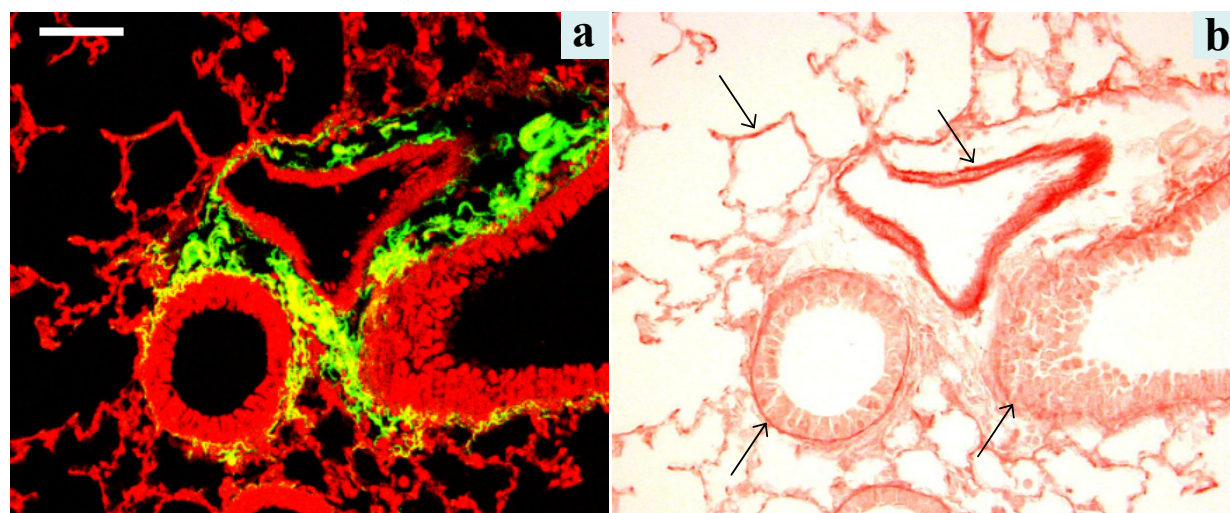


FIG. 4.6 – Attribution de signaux endogènes du poumon. **a** Image combinée SHG/2PEF et **b** image acquise en lumière directe d'une biopsie de poumon normal colorée à l'orcéine (barre d'échelle : 50 μm). Une partie du signal 2PEF dans l'image multiphoton correspond aux fibres élastiques colorées en rouge par l'orcéine dans l'image à droite. Ces fibres sont présentes dans les parois alvéolaires et dans l'axe broncho-vasculaire (voir flèches).

Cette attribution a été confirmée expérimentalement par des techniques de colorations histologiques conventionnelles. Pour cela, des coupes histologiques de tissu pulmonaire ont été colorées au picosirius et visualisées à la fois par microscopie multiphoton (Fig. 4.5a) et par microscopie optique en lumière directe (Fig. 4.5b). Ces images mettent en évidence les mêmes structures, colorées en rouge par le picosirius et révélées par génération de seconde harmonique, c'est-à-dire les fibres de collagène dans la plèvre viscérale (voir les flèches sur la figure) et de fines fibres de collagène dans les parois des alvéoles, ce qui confirme l'attribution du signal SHG au collagène fibrillaire.

La Fig. 4.4c montre une image de fluorescence excitée à deux photons (2PEF) qui a été acquise au même endroit du poumon, à la même profondeur et dans les mêmes conditions d'excitation (860 nm) que l'image SHG (Fig. 4.4b). À cette longueur d'onde d'excitation, les principaux fluorophores endogènes cellulaires et tissulaires excitables sont les flavines, le rétinol et l'élastine, comme nous l'avons discuté dans le deuxième chapitre (section 2.1, page 15). Dans cette image nous pouvons observer des structures ayant un aspect fibrillaire que nous avons donc attribué aux fibres élastiques présentes dans les parois alvéolaires. Cette attribution a de même été vérifiée par comparaison d'images de coupes histologiques colorées à l'orcéine et visualisées en lumière directe avec des images multiphoton des mêmes coupes histologiques. Les Fig. 4.6a et Fig. 4.6b illustrent l'attribution d'une partie des signaux endogènes de fluorescence aux fibres élastiques : les flèches noires indiquent la présence des fibres élastiques, colorées en rouge par l'orcéine, dans les parois alvéolaires et dans l'axe broncho-vasculaire (parois des bronches et des artères) sur l'image en lumière directe.

Sur ce type de préparation de tissu, nous avons observé que le signal de fluorescence 2PEF est exalté dans les régions où le tissu a été coloré à l'orcéine, notamment dans les parois des axes broncho-vasculaires. Pour vérifier si cela est dû à la présence du colorant, nous avons procédé à une analyse spectroscopique de l'orcéine. Nous avons donc déterminé son spectre d'absorption, de fluorescence excitée à 1 photon - 1PEF et de fluorescence excitée à 2 photons - 2PEF (voir la Fig. 4.7). À partir de ces spectres nous avons pu conclure que l'orcéine est un colorant excitable dans la gamme de longueurs d'onde du laser Titane-Saphir, donc dans nos conditions d'excitation, et qui présente un maximum d'émission autour de 625 nm pour une excitation à 1 photon à 430 nm (excitation 2PEF à 860 nm). Ainsi, ces résultats nous ont permis d'attribuer l'exaltation du signal 2PEF, dans les régions où le tissu élastique a été coloré à l'orcéine, au signal de fluorescence de l'orcéine.

Les Fig. 4.4c et Fig. 4.6a montrent que d'autres structures du poumon telles que les épithéliums alvéolaire et bronchiolaire ou les macrophages peuvent être mises en évidence par une excitation 2PEF à 860 nm. Ainsi, la Fig. 4.4c révèle des structures rondes avec un diamètre compris entre 10 et 20 μm situées en proximité de la paroi alvéolaire et que nous avons attribuées aux macrophages alvéolaires⁴. Nous avons vérifié cela par marquage immunofluorescent des macrophages (anti-

⁴Si, sur coupes histologiques, ils paraissent libres au milieu de la cavité alvéolaire, en réalité les macrophages sont accolés à la paroi sur laquelle ils se déplacent (voir aussi la Fig. 4.15).

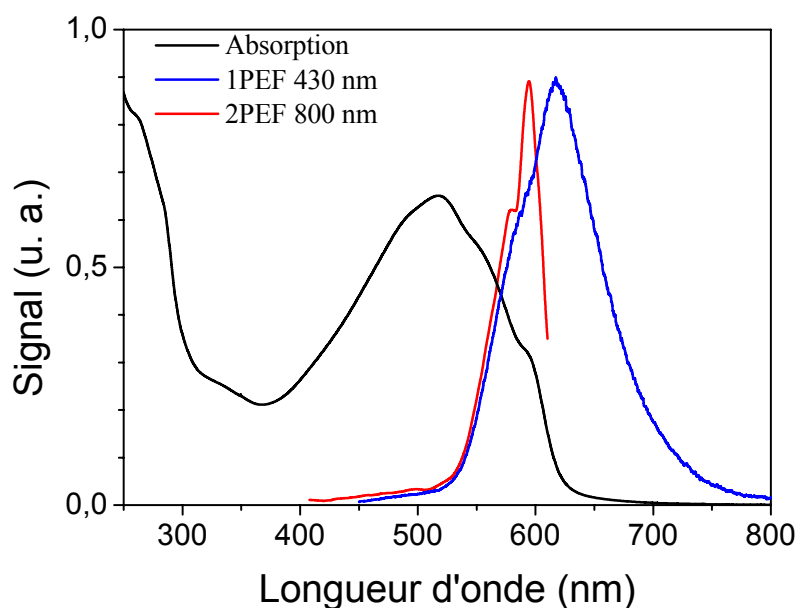


FIG. 4.7 – **Analyse spectroscopique de l'orceïne** : spectre d'absorption (noir), spectre de fluorescence excitée à 1 photon (bleu, 1PEF à 430 nm) et spectre de fluorescence excitée à 2 photons (rouge, 2PEF à 800 nm) d'une solution d'orceïne.

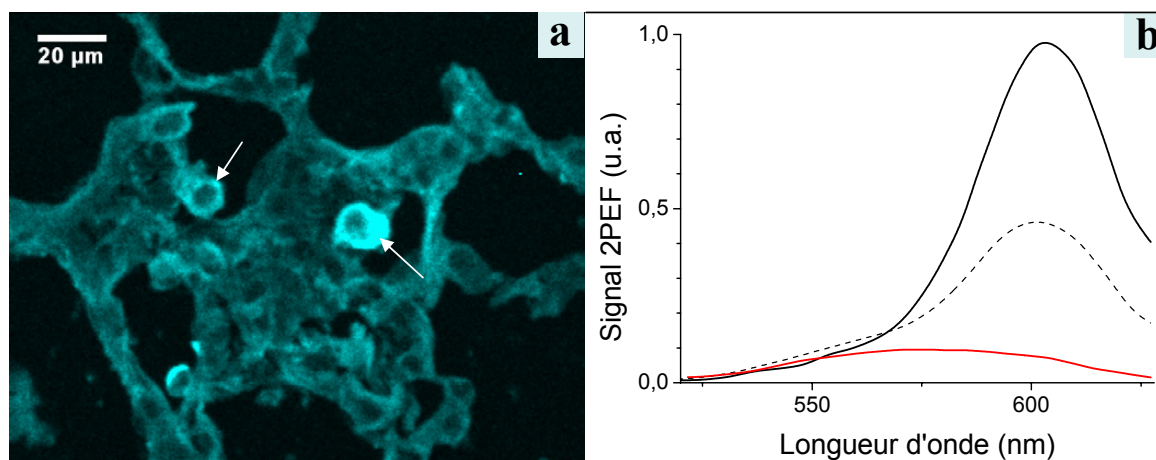


FIG. 4.8 – **Marquage immunofluorescent des macrophages** : **a** Image 2PEF d'une biopsie congelée de poumon normal (excitation 1100 nm) où les macrophages alvéolaires sont mis en évidence par marquage immunofluorescent anti-macrophages (voir la section 4.3.1 qui décrit la préparation des échantillons) ; **b** Spectres 2PEF mesurés *in situ* sur des macrophages marqués (courbe noire) et sur des structures interalvéolaires (tiret noir) qui montrent un marquage non spécifique ($\lambda_{excitation}=1100$ nm). La composante spectrale dans la partie bleue des spectres correspond au signal de fluorescence endogène des macrophages comme le démontre le spectre 2PEF acquis sur des macrophages non marqués (courbe rouge).

corps anti-macrophages CD11c lié au fluorophore exogène Alexafluor 568, voir section 4.3.1, page 83) sur coupes histologiques de poumon congelé et par des mesures *in situ* de spectres de fluorescence. La Fig. 4.8a présente une image 2PEF d'une coupe congelée de poumon excitée à 1100 nm et qui illustre le marquage positif des macrophages. Puisque l'anticorps anti-macrophages se fixe à la surface du macrophage, ces cellules apparaissent comme des disques ou des cercles si elles ont été sectionnées (voir flèches).

Cette image de fluorescence excitée à deux photons révèle aussi un marquage non spécifique du reste du tissu, confirmé de même par les mesures de spectres (Fig. 4.8b, tiret noir), mais qui est moins intense que le marquage des macrophages (courbe noire). D'autre part ces spectres ont mis en évidence une composante spectrale dans la région bleue des spectres qui n'est pas caractéristique du spectre d'émission de l'Alexafluor 568. Cette composante correspond probablement au signal de fluorescence endogène des macrophages, car leur spectre 2PEF déterminé sur des coupes histologiques préparées de la même façon mais non marquées (courbe rouge) est situé dans cette gamme de longueurs d'onde. L'immunomarquage et les spectres de fluorescence mesurés démontrent ainsi qu'une partie de la fluorescence endogène du poumon excitée à 860 nm correspond aux macrophages.

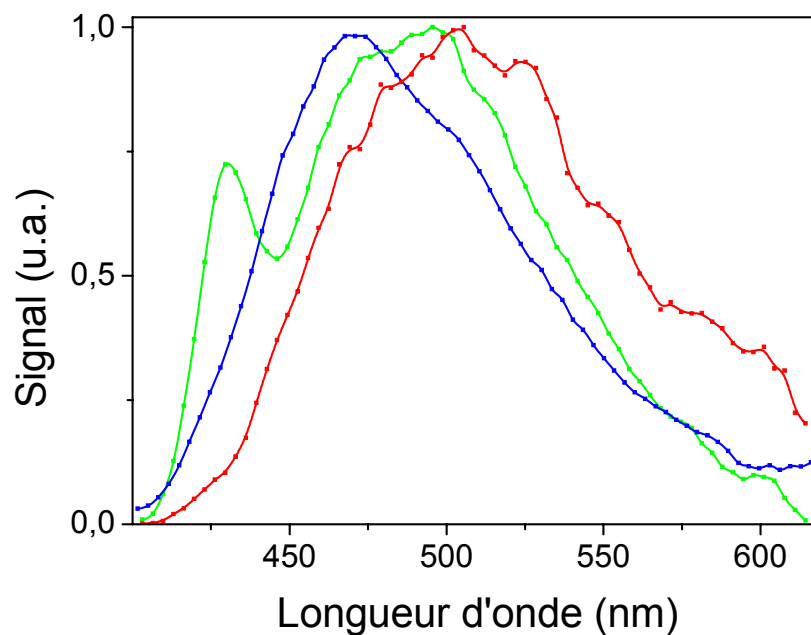


FIG. 4.9 – Spectres multiphoton du poumon normal mesurés *ex vivo* : excitation à 720 nm du NAD(P)H (courbe bleue), excitation à 860 nm des macrophages (courbe rouge) et des structures alvéolaires et intervalvéolaires (courbe verte). Ce dernier spectre présente un pic autour de 430 nm que nous avons attribué à la SHG des fibres de collagène suivi par un pic plus large autour de 490 nm que nous avons attribué au signal 2PEF des fibres élastiques dans les parois alvéolaires.

Nous avons aussi effectué des mesures *ex vivo* de spectres multiphoton du poumon normal (voir la Fig. 4.9) qui nous ont permis de confirmer une fois de plus l'attribution des signaux endogènes de fluorescence et de génération de seconde harmonique du poumon. Ainsi, les macrophages présentent un spectre de fluorescence avec un maximum autour de 510 nm probablement dû à un mélange de différents fluorophores cellulaires qui émettent dans le rouge, notamment des rétinoïdes⁵ ou des flavoprotéines [Zipfel et al., 2003a]. Comme l'illustre la Fig. 4.9, le spectre de fluorescence des macrophages est différent du spectre multiphoton acquis dans les parois alvéolaires et dans les zones interalvéolaires. Ce dernier présente un pic autour de 430 nm que nous avons attribué à la génération de seconde harmonique des fibres de collagène dans les parois alvéolaires. Il est suivi par un deuxième pic de fluorescence autour de 490 nm que nous avons attribué aux fibres élastiques, en accord avec les spectres 2PEF trouvés dans la littérature pour l'élastine [Zipfel et al., 2003a, Buehler et al., 2005].

Ces résultats présentés jusqu'ici démontrent les avantages de la microscopie multiphoton pour la visualisation des structures du poumon telles que les fibres élastiques, les fibres de collagène, les macrophages, etc. Un avantage unique de ce type de microscopie réside dans la possibilité de

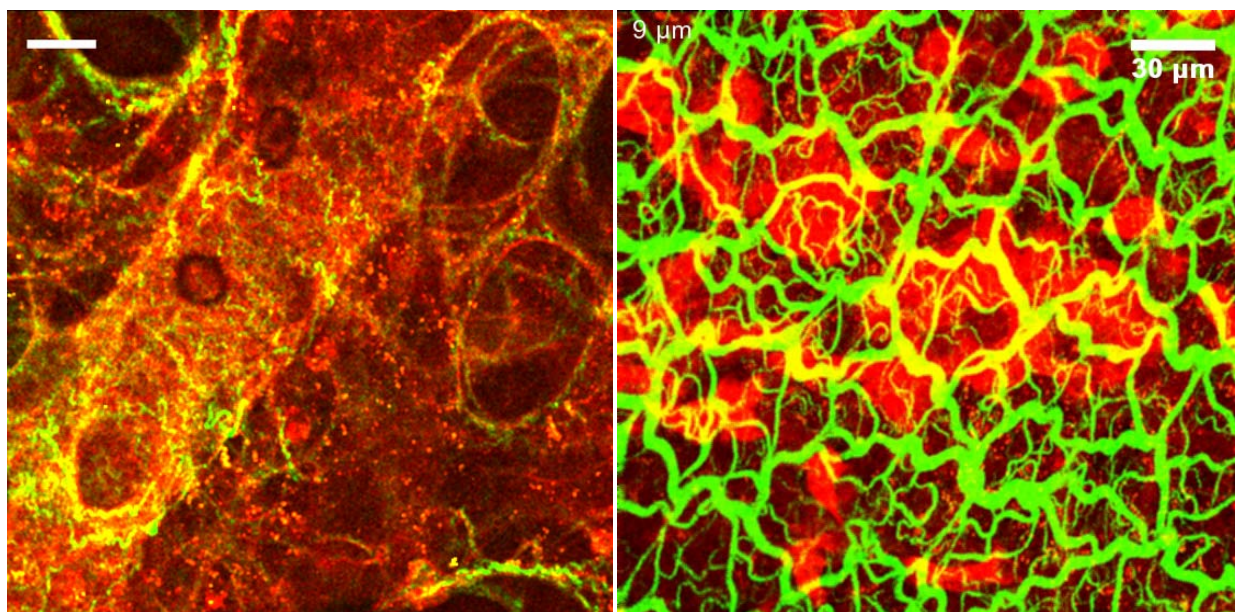


FIG. 4.10 – Images combinées SHG (vert)/2PEF (rouge) de poumon normal de souris : a) vue longitudinale d'une bronchiole respiratoire. Barre d'échelle : 25 μm . ; b) visualisation sous forme de film d'une pile d'images acquises au même endroit (sur la version papier le film sera remplacé par une image acquise dans la plèvre). Objectif 20 $\times$ (O.N.=0.8), puissance d'excitation 30 mW à 860 nm, temps d'acquisition total 2.35 minutes. Pile de 30 images (574 $\times$ 553 μm^2) espacées de 3 μm .

⁵Les rétinoïdes sont des dérivés de la vitamine A (rétinol)

combiner plusieurs modes de contraste (SHG, 2PEF, THG) comme le montre la Fig. 4.4d qui combine les images SHG et 2PEF des figures 4.4b et 4.4c. Un autre exemple est donné sur la Fig. 4.10 qui montre, à gauche, une vue longitudinale d'une bronchiole respiratoire dont la paroi s'interrompt de place en place pour communiquer par un petit orifice plus ou moins circulaire avec une alvéole et, à droite, une pile d'images acquises au même endroit, sur une profondeur de $90\text{ }\mu\text{m}$ et visualisées sous la forme d'un film⁶. Une partie de cette séquence d'images acquises entre 3 et $60\text{ }\mu\text{m}$ est reprise dans la Fig. 4.11.

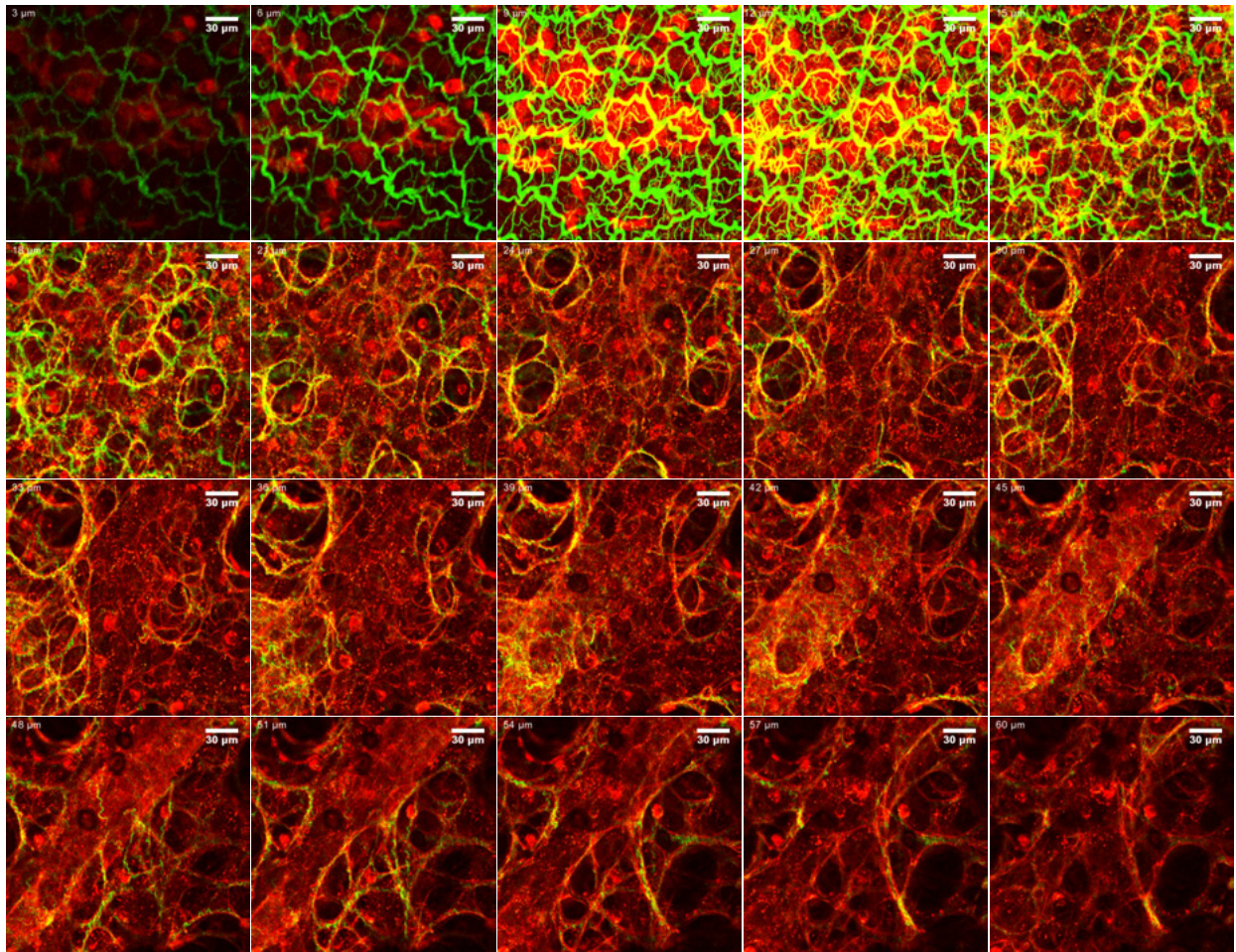


FIG. 4.11 – Séquence d'images combinées SHG (vert)/2PEF (rouge) de poumon normal acquises tous les $3\text{ }\mu\text{m}$ en profondeur au même endroit que pour les images dans la Fig. 4.10. Barre d'échelle : $30\text{ }\mu\text{m}$.

D'autres sources de contraste du tissu pulmonaire peuvent être mises en évidence par microscopie multiphoton. Quelques exemples sont donnés sur les Fig. 4.12a et b qui montrent à gauche une image 2PEF obtenue lors d'une excitation *ex vivo* du tissu pulmonaire à 780 nm ,

⁶Sur la version papier le film sera remplacé par une image acquise dans la plèvre.

image acquise au même endroit et à la même profondeur que les images montrées sur les Fig. 4.4b et c. Dans ces conditions d'excitation, les principaux fluorophores endogènes excitables sont les fluorophores intracellulaires tels que le NAD(P)H. Pour vérifier cela, nous avons effectué des mesures *in situ* de spectres de fluorescence du poumon lors d'une excitation optimale du NAD(P)H à 720 nm. Le spectre obtenu est montré sur la Fig. 4.9 (courbe bleue). Il présente un maximum d'émission à 470 nm, en accord avec les données trouvées dans la littérature pour ce fluorophore endogène [Zipfel et al., 2003a]. Ces mesures nous ont par conséquent permis de confirmer l'attribution des signaux endogènes de fluorescence excitée à 780 nm au NAD(P)H.

La Fig. 4.12b présente une image combinée SHG/THG (génération de la troisième harmonique) obtenue pour une excitation à 1180 nm. Une propriété remarquable de la microscopie THG est qu'aucun signal ne peut être obtenu dans un milieu homogène et isotrope. Par contre,

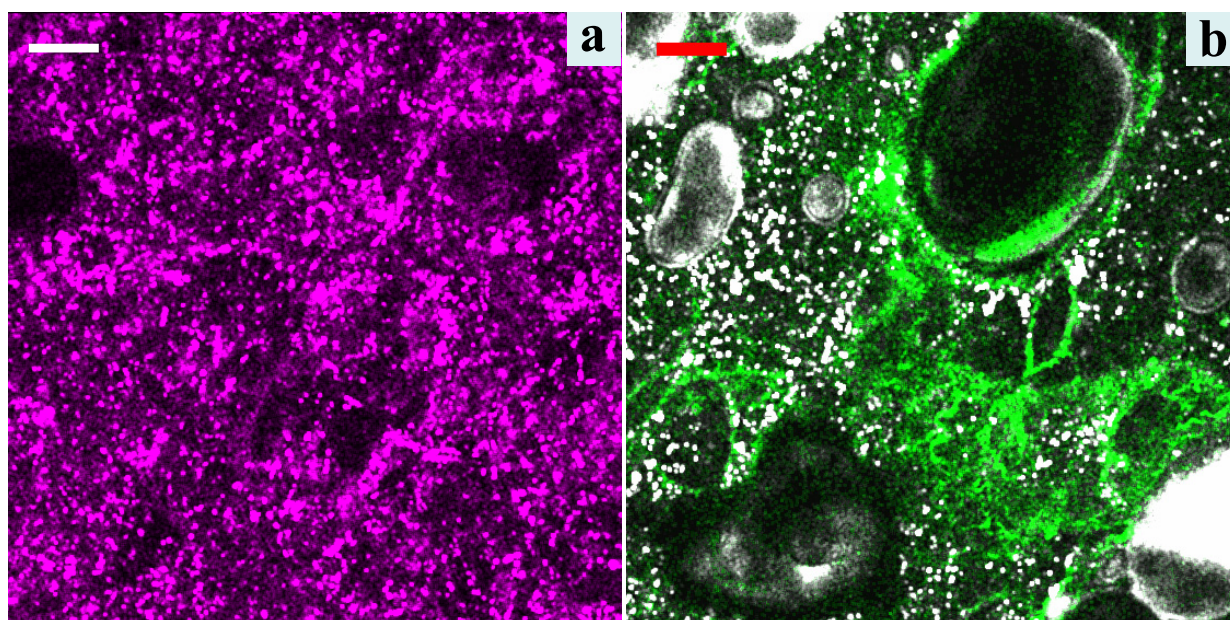


FIG. 4.12 – **Attribution de signaux endogènes du poumon.** **a** Image 2PEF excitée à 780 nm (puissance moyenne 30 mW) du tissu pulmonaire acquise à la même profondeur que les images présentées sur les Fig. 4.4b, c et d et qui révèle des fluorophores endogènes intracellulaires tels que le NAD(P)H ; **b** Image combinée THG/SHG excitée à 1180 nm (puissance moyenne 100 mW), acquise à 45 μ m profondeur dans le poumon mettant en évidence des corps lipidiques et des structures rondes délimitées par des fibres de collagène correspondant à l'air résiduel dans les alvéoles et dans l'arbre bronchique. Barre d'échelle : 25 μ m.

un signal est obtenu pour toute hétérogénéité des propriétés optiques du milieu observé (indice de réfraction, susceptibilité non-linéaire) [Cheng and Xie, 2002, Débarre et al., 2005]. Il est ainsi possible d'obtenir une image structurale d'un tissu ou d'une cellule sans aucun marquage. Dans le cas du tissu pulmonaire, la microscopie THG met en évidence deux types de structures. Tout

d'abord de petites structures de taille micrométrique sont visible dans tout le tissu. Ce signal THG a été attribué à des corps lipidiques, ce qui a été confirmée par coloration au Nile Red (voir [Débarre et al., 2006]). Le même type de signal a été observé dans d'autres structures (foie, embryon de drosophile, graines de plantes, ...) et il a été démontré au laboratoire (voir la thèse de D. Débarre) que les corps lipidiques de taille micrométriques sont la principale source de signal THG dans les tissus. L'image THG révèle d'autres structures de taille plus grande délimitées par des fibres de collagène (révélées par SHG) et qui correspondent à l'air résiduel dans les alvéoles et en général dans l'arbre bronchique. Ce signal est créé par la discontinuité des propriétés optiques entre l'air et le tissu pulmonaire [Débarre et al., 2006].

Cette mise en évidence des signaux endogènes du poumon normal par microscopie multiphoton montre que cette technique est particulièrement adaptée pour visualiser la morphologie du tissu pulmonaire sans aucun marquage. Nous avons présenté ci-dessus des images multiphoton acquises sur différents types de préparation de tissu : *ex vivo* sur des lobes pulmonaires fraîchement excisés (Fig. 4.4, Fig. 4.10, Fig. 4.11, Fig. 4.12, *in situ* sur des coupes histologiques fixées au paraformaldéhyde et incluses dans la paraffine (Fig. 4.5, Fig. 4.6) et sur des coupes histologiques congelées (Fig. 4.8). Des lobes pulmonaires fixés au paraformaldéhyde ont aussi été observés par microscopie multiphoton, comme nous allons le voir dans la suite de ce chapitre.

Toutes ces expériences nous ont permis de constater que les signaux multiphoton présentent les mêmes caractéristiques quel que soit le type de préparation de tissu, à l'exception de quelques modifications liées à la fixation. En premier lieu, les signaux THG ont été observés uniquement sur du tissu pulmonaire fraîchement excisé et donc pas sur du tissu fixé au paraformaldéhyde (PFA). Ceci est lié, d'une part, au fait que les corps lipidiques sont des objets dont la structure est assez fragile et résiste mal à la fixation et, d'autre part, au fait que les espaces initialement occupés par l'air résiduel dans l'arbre bronchique du tissu frais sont entièrement remplis avec du PFA dans le tissu fixé. Deuxièmement, nous avons observé que les signaux 2PEF sont légèrement exaltés dans les tissus fixés et que les spectres multiphoton déterminés sur du tissu fixé ne sont pas parfaitement en accord avec les mesures effectuées sur du tissu frais ; des effets similaires liés à la fixation des tissus ont été observés en microscopie conventionnelle [Majumder et al., 2005]. Troisièmement, la profondeur maximale à laquelle il est encore possible de visualiser le tissu pulmonaire par microscopie multiphoton diminue de 25 % pour les tissus fixés au PFA, ceci pouvant être dû à des changements des propriétés optiques du tissu (diffusion, absorption, indice de réfraction) suite à la fixation. Ainsi, nous avons pu visualiser le tissu pulmonaire frais jusqu'à des profondeurs de 100 μm (voir le film montré sur la Fig. 4.10), tout en gardant une résolution micrométrique et un rapport signal/bruit acceptable. En augmentant la puissance d'excitation il est encore possible de visualiser des structures pulmonaires à de plus grandes profondeurs d'imagerie au détriment de la résolution de l'image qui se trouve dégradée. Néanmoins, ces résultats montrent encore une fois la grande profondeur d'imagerie de la microscopie multiphoton, profondeur inégalée par des techniques conventionnelles.

4.3.2.2 Visualisation de l'architecture de la fibrose pulmonaire par SHG

Puisque la génération de seconde harmonique est une sonde spécifique de l'organisation macromoléculaire du collagène dans les tissus, cette technique donne la possibilité d'étudier la

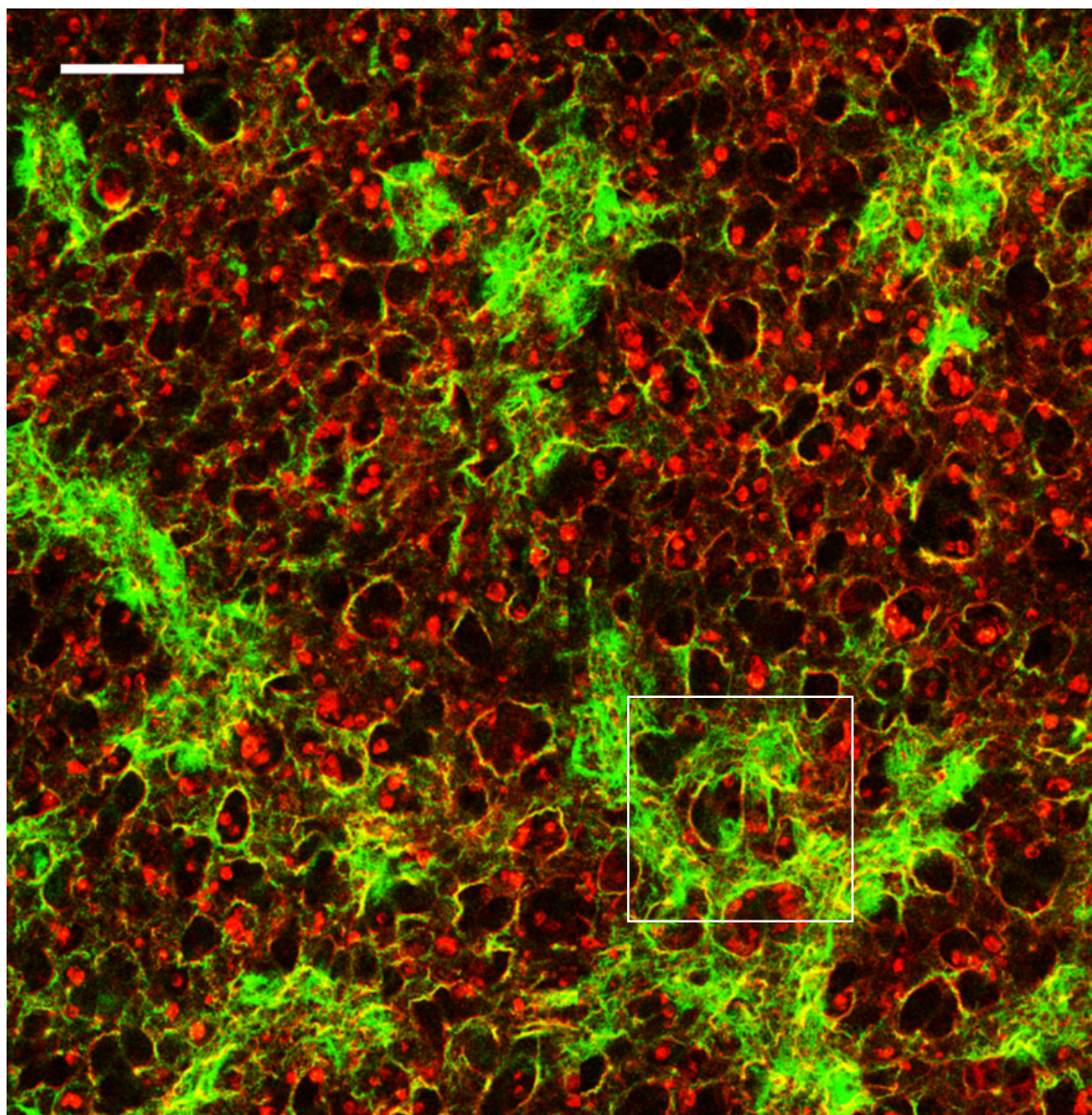


FIG. 4.13 – **Imagerie multiphoton de la fibrose pulmonaire chez la souris.** Image SHG/2PEF excitée à 860 nm (puissance moyenne 50 mW) de poumon fibrosé à J14 fraîchement excisé et non marqué. Cette image est acquise à 42 μm en dessous de la plèvre viscérale et révèle l'hétérogénéité de la fibrose (par SHG) pulmonaire induite par bléomycine chez la souris. Barre d'échelle : 100 μm .

distribution tridimensionnelle des fibres de collagène dans des conditions pathologiques telle que la fibrose pulmonaire. Nous avons donc utilisé l'imagerie multiphoton pour l'étude de la fibrose pulmonaire induite par une administration unique intratrachéale de bléomycine chez la souris. Les souris ont été sacrifiées à J3, J7 ou J14 (voir la préparation des échantillons, sous-section 4.3.1, page 83) et des lobes pulmonaires fraîchement excisés ou fixés au PFA ont été observés par microscopie multiphoton.

La Fig. 4.13 présente une image de poumon de souris malade sacrifiée à J14 obtenue pour une excitation à 860 nm. Cette image combine quatre images multiphoton acquises à une profondeur de 45 μm en dessous de la plèvre viscérale et révèle la distribution du signal SHG, donc de la fibrose pulmonaire sur une zone de 1 mm^2 approximativement. Toutes les images de poumon fibrosé à J14 que nous avons acquises lors de cette étude, présentent les mêmes caractéristiques : la distribution du signal SHG est très différente de celle dans le poumon normal avec une accumulation hétérogène des fibres de collagène dans le parenchyme pulmonaire. Cette hétérogénéité

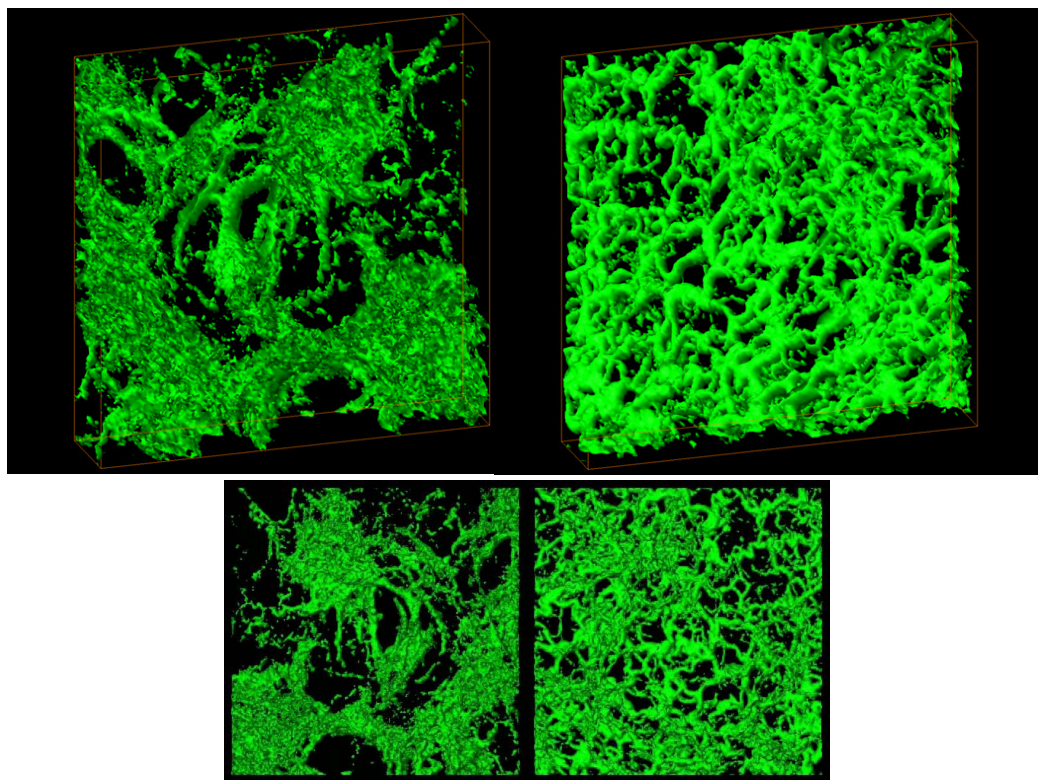


FIG. 4.14 – **Visualisation de l'architecture de la fibrose pulmonaire chez la souris** : (en haut à gauche) Reconstruction 3D des images SHG acquises dans la zone fibrosée indiquée par le carré blanc sur la Fig. 4.13; (en haut à droite) Reconstruction 3D des images SHG acquises au niveau de la plèvre. (en bas) Les deux reconstructions présentées sous la forme d'un film (sur la version papier ce film est remplacé par une image prise sous un autre angle de vue).

caractérise la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris, ainsi que la fibrose pulmonaire idiopathique chez l’homme [Polosukhin et al., 2005] et rend très difficile l’évaluation de l’étendue de la fibrose pulmonaire par les techniques existantes actuellement. Dans ce contexte, l’imagerie multiphoton donne de nouvelles perspectives : possibilité de visualiser et de quantifier la distribution de la fibrose comme nous allons le démontrer ci-après.

Ainsi, à partir des piles d’images SHG acquises à différentes profondeurs dans le tissu, nous avons fait des reconstructions 3D qui permettent de visualiser l’architecture de la fibrose pulmonaire. Deux exemples sont donnés sur la Fig. 4.14 : en haut à gauche une reconstruction 3D du signal SHG acquis dans une zone fibrosée du poumon permettant de visualiser les fibres de collagène qui ont envahi les espaces intra et intervalvéolaires ; à droite une reconstruction 3D de la distribution du signal SHG dans une zone pleurale et en bas les mêmes reconstructions 3D présentées sous forme de film. Dans cette zone, la densité de fibres de collagène est plus importante et la plèvre viscérale semble être plus épaisse que dans le poumon normal. Ceci est en effet lié à un dépôt sous-pleural de fibres de collagène.

Comme nous pouvons le remarquer sur la Fig. 4.13, la fibrose pulmonaire est toujours accompagnée d’une légère inflammation. Celle-ci est mise en évidence sur nos images par la présence des nombreux macrophages alvéolaires et d’autres cellules dans les espaces alvéolaires, ainsi que dans l’interstitium. Nous avons observé que le nombre de cellules dans les espaces alvéolaires était beaucoup plus important à J14 que dans un poumon normal (voir par exemple la Fig. 4.11). Cependant, l’inflammation est un processus qui précède l’accumulation anormale des fibres de collagène dans le poumon. Pour observer l’évolution de ce processus nous avons donc étudié des échantillons de poumon fibrosé à J3 et J7. La Fig. 4.15 montre quatre images multiphoton de coupes histologiques de poumon fixées au PFA et incluses dans la paraffine : poumon normal (J0), poumon fibrosé à J3, J7 et J14. Cette figure illustre, en termes de densité de pixels présentant un signal 2PEF (dit “pixels 2PEF”), l’apparition du processus inflammatoire à J3 après l’instillation de la bléomycine, son évolution culminante à J7 et puis une inflammation faible toujours présente à J14, en accord avec les précédentes descriptions du processus inflammatoire induit par l’administration de la bléomycine [Izbicki et al., 2002]. D’autre part, nous avons observé qu’il est possible par microscopie SHG de détecter l’apparition de la fibrose dans le poumon dès J3 (la fibrose à J3 est détectable aussi par dosage de l’hydroxyproline sur poumon entier). Ces résultats démontrent que la microscopie multiphoton peut mettre en évidence un processus inflammatoire grâce aux signaux de fluorescence excitée à 2 photons créés par les cellules inflammatoires.

Finalement, l’ensemble de ces données montrent que la microscopie multiphoton multimodale peut révéler les principales caractéristiques du modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, c’est-à-dire l’inflammation, mise en évidence par les signaux endogènes de fluorescence cellulaire (2PEF), et la fibrose, dont l’architecture tridimensionnelle est très bien visualisée par microscopie SHG. En tenant compte du caractère quantitatif du signal SHG, nous allons voir dans la partie suivante comment on peut proposer des scores reproductibles de fibrose pulmonaire.

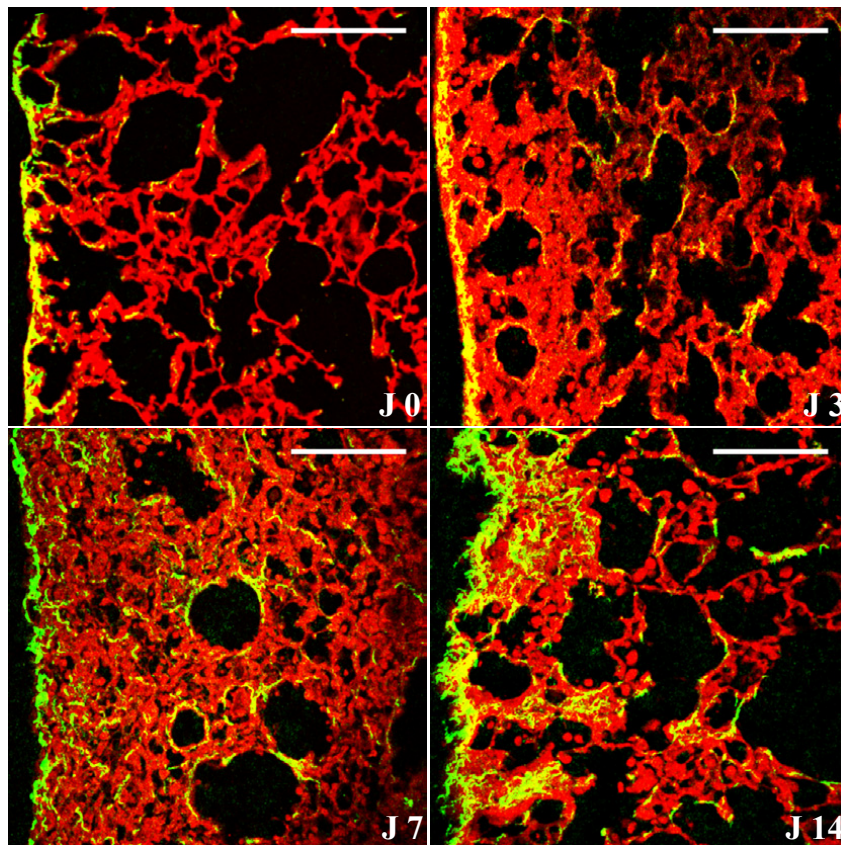


FIG. 4.15 – Visualisation de l'inflammation pulmonaire au cours de l'installation de la fibrose. Images SHG/2PEF de coupes histologiques de poumon fixées au PFA et incluses dans la paraffine : poumon normal (J0) et poumon fibrosé à J3, J7 et J14. Excitation à 860 nm, barre d'échelle : 100 μm .

4.3.2.3 Analyse quantitative du signal SHG - proposition des scores de fibrose

Les résultats que nous avons présentés ci-dessus démontrent que la microscopie SHG peut décrire la distribution de la fibrose pulmonaire avec une résolution tridimensionnelle micrométrique. De surcroît, le caractère quantitatif du signal SHG donne la possibilité d'évaluer quantitativement cette pathologie, ce qui constitue un autre avantage de cette technique. Dans ce contexte, nous avons procédé à l'analyse de plusieurs piles d'images SHG acquises à différents endroits du tissu pulmonaire, ce qui nous a permis de définir trois scores différents de fibrose pulmonaire :

- (i) score pleural - dans la région pleurale (0⁷ - 52 μm)
- (ii) score sous-pleural - dans la région sous-pleurale (14 - 52 μm)
- (iii) score central - dans la région centrale (parenchyme profond)

⁷Le repère de 0 μm est pris à la surface du lobe pulmonaire.

Les deux premiers scores ont été déterminés sur lobe entier, tandis que le score central a été déterminé dans le parenchyme pulmonaire profond. Pour cela, un lobe a été sectionné en deux le long du plan sagittal et des piles d'images SHG ont été acquises à différentes régions situées dans ce plan, de 0 μm (surface de la coupe) jusqu'à une profondeur de 60 μm . Afin de déterminer la reproductibilité de ces scores dans le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, nous avons mené des expériences sur 5 poumons de souris malades⁸, sacrifiées à J14 et sur 5 poumons de souris témoins, tous fixés au PFA. Pour chaque score de fibrose, 4 piles d'images multiphoton ont été acquises à différents endroits de la région étudiée, ce qui donne une statistique sur 20 mesures.

Les résultats que nous avons obtenus sont présentés sur la Fig. 4.16 : nous montrons les distributions statistiques de densité de pixels SHG dans chaque région sondée, ainsi que les valeurs moyennes des scores correspondants. La Fig. 4.16a illustre la distribution des profils en z de densité de pixels SHG, mesurés à différents endroits dans la région pleurale (0 - 52 μm). Cette région englobe aussi la région sous-pleurale (voir le graphe inséré en haut à droite de 14 à 52 μm). Chaque profil en z est déterminé à partir d'une pile d'images SHG de taille 540×540 μm^2 acquises pour une excitation à 860 nm. Ces données montrent que les densités de pixels SHG dans les régions pleurale et sous-pleurale sont plus grandes pour les souris ayant reçu de la bléomycine que pour les souris témoins. Si on regarde plus attentivement la distribution des profils dans la région sous-pleurale (Fig. 4.16a (insert)), nous observons que les profils en z révèlent des densités de pixels SHG systématiquement plus grandes pour les souris malades que pour les souris témoins. Inversement, la distribution des profils en z dans la région pleurale présente une petite zone de recouvrement entre les souris malades et les souris témoins. Ce résultat obtenu pour la région sous-pleurale est illustré aussi sur la Fig. 4.16b où chaque profil en z a été converti en densité volumique de pixels SHG. Nous avons effectué le même traitement pour les données dans la région centrale et l'histogramme de densités volumiques de pixels SHG pour les souris malades et témoins est donnée sur la Fig. 4.16d. Ce graphe révèle une densité volumique de pixels SHG majoritairement plus grande pour les souris malades que pour les souris témoins, mais les histogrammes "malade - témoin" présentent une zone de recouvrement plus importante. Ceci est dû, d'une part, au caractère hétérogène de la fibrose pulmonaire induite par bléomycine (voir aussi la Fig. 4.13 qui illustre cette hétérogénéité) et, d'autre part, à la présence de grandes artères et de bronchioles dans le parenchyme profond ; leur paroi contient beaucoup de fibres de collagène et, par conséquent, le signal SHG créé augmente "artificiellement" les scores.

Sur la Fig. 4.16c nous avons résumé les valeurs moyennes avec les barres d'erreurs des scores de fibrose pulmonaire définis précédemment pour les poumons normaux et les poumons fibrosés. Tous les scores déterminés sur poumons fibrosés sont nettement plus grands que ceux déterminés sur poumons normaux. Ces résultats démontrent que la microscopie SHG est un outil performant, adapté à l'étude quantitatif de la fibrose pulmonaire et cela pour les raisons suivantes :

1. grande spécificité du signal SHG par le collagène fibrillaire

⁸Souris ayant reçu de la bléomycine.

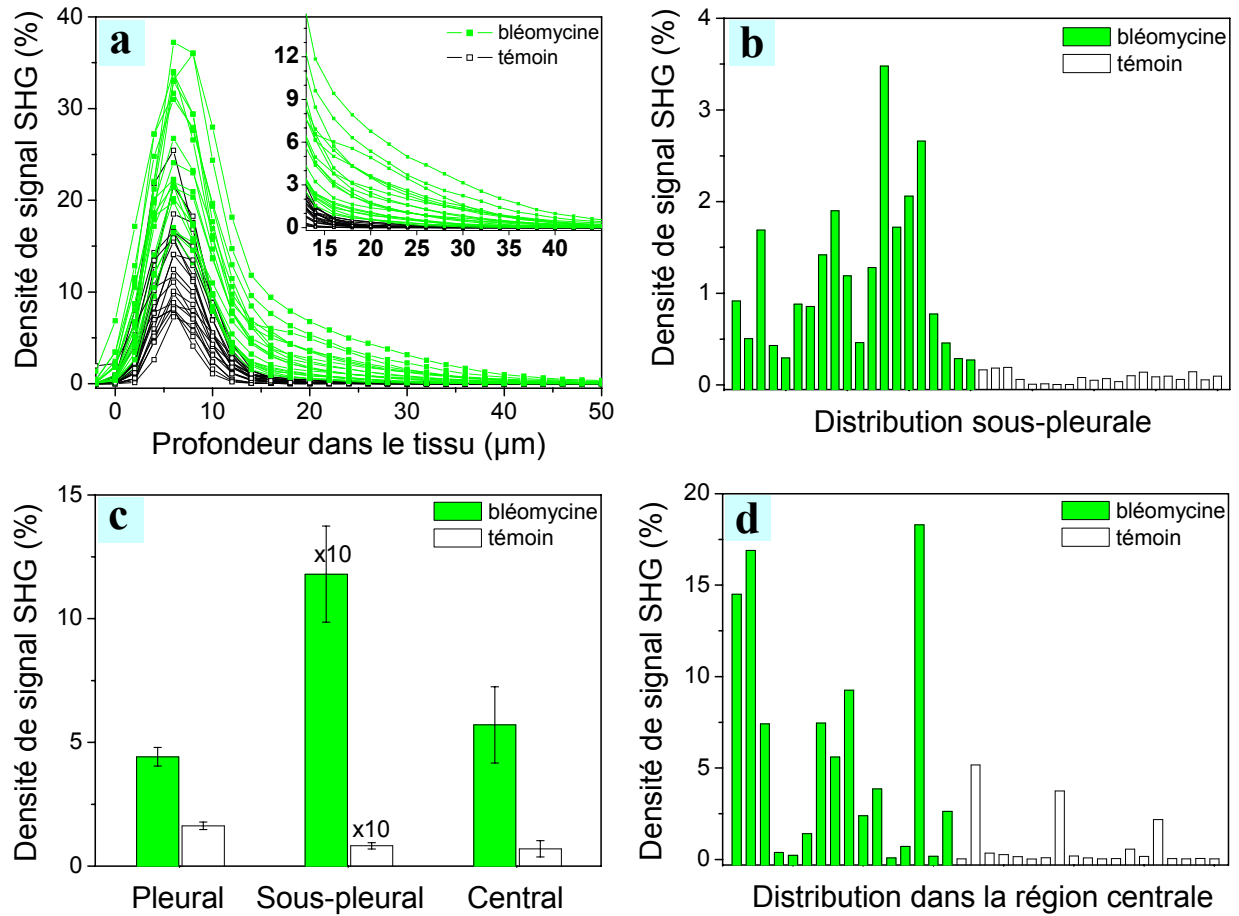


FIG. 4.16 – **Quantification de la fibrose pulmonaire.** La densité de pixels SHG a été déterminée pour 20 piles d'images SHG de taille $540 \times 540 \mu\text{m}^2$ acquises sur des poumons de souris témoins (en blanc) et de souris ayant reçu de la bléomycine (en vert). **a** Profils en z de densité de pixels SHG sur une profondeur de $50 \mu\text{m}$ à partir de la plèvre viscérale. Les profils dans la région sous-pleurale sont agrandis en haut à droite ; **b-d** Distribution de la densité de pixels SHG dans **b** la région sous-pleurale ($14 - 52 \mu\text{m}$) et **d** dans la région centrale (images de même taille et sur une profondeur de $60 \mu\text{m}$). Chaque barre correspond à la densité moyenne de pixels SHG d'un profil en z représenté en **a** ; **c** Valeurs moyennes de ces 3 scores de fibrose. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard. Les valeurs du score sous-pleural sont multipliées par 10.

2. caractère quantitatif du signal SHG

3. un plus grand volume sondé (3D) par microscopie SHG par rapport aux techniques existantes, limitées à des coupes histologiques (2D)

Ces trois scores n'ont cependant pas la même sensibilité, car le rapport entre leurs valeurs moyennes déterminées sur poumons fibrosés et celles déterminées sur poumons normaux varie

avec la région sondée : nous avons obtenu un rapport de 2.7 dans la région pleurale, 14.4 dans la région sous-pleurale et 8.1 dans la région centrale. Ceci indique que le score sous-pleural est le plus sensible à la fibrose pulmonaire. Nous voulons souligner que ce score semble significatif même pour de très petits volumes de tissu (environ 0.015 mm^3) et qu'en général seulement quelques mesures (typiquement 4) à différents endroits du tissu sont nécessaires pour le déterminer. Nous avons attribué cette sensibilité et reproductibilité du score sous-pleural à une distribution quasi-homogène de la fibrose pulmonaire dans cette région.

Il faut noter que la valeur exacte du seuil que nous avons appliqué à nos images, afin de déterminer ces scores, ne modifie pas nos conclusions. Nous avons refait le même traitement d'images pour un seuil de 2 photons/pixel (voir les valeurs moyenne des scores sur la Fig. 4.17) c'est-à-dire en passant d'un seuil de 100 % à 50 % du niveau maximal de bruit (typ. 4 photons/pixel dans nos expériences). Le rapport entre les scores passe de 2.7 à 2.8 dans la région pleurale, de 14.4 à 9.5 dans la region sous-pleurale et de 8.1 à 6.0 dans la région centrale.

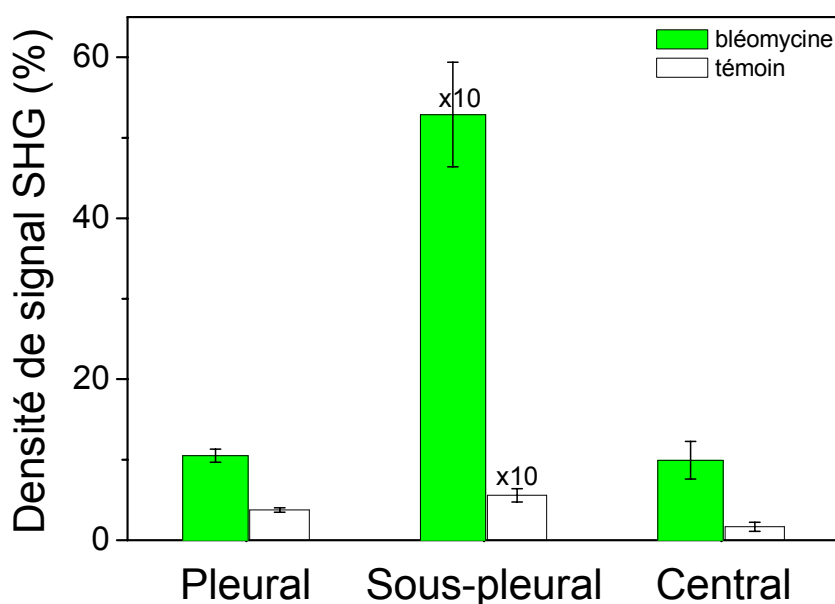


FIG. 4.17 – **Quantification de la fibrose pulmonaire.** Valeurs moyennes de scores de fibrose déterminés avec un seuil de 2 photons/pixel. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard. Les valeurs du score sous-pleural sont multipliées par 10.

En conclusion, ces scores donnent la possibilité d'évaluer rapidement et quantitativement la distribution de la fibrose pulmonaire dans le modèle murin de bléomycine. La microscopie SHG semble particulièrement adaptée à ceci, en comparaison avec les méthodes biochimiques usuellement utilisées pour évaluer la fibrose (basées sur le dosage de l'hydroxyproline, qui demandent beaucoup de temps et qui nécessitent des volumes de tissu (un lobe entier) beaucoup plus importants qu'en microscopie SHG) et avec les techniques de coloration (qui se font sur coupe

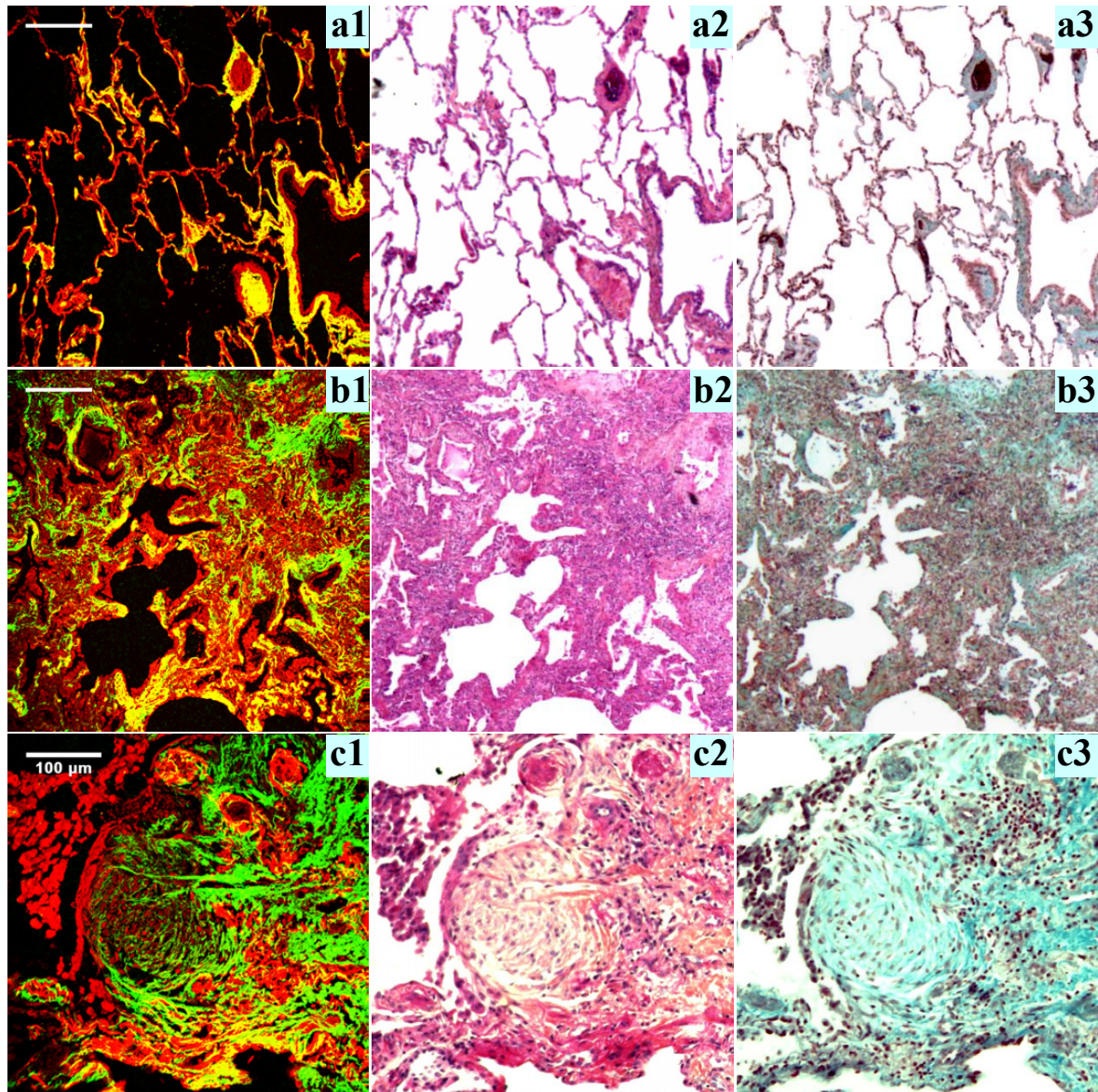


FIG. 4.18 – Biopsies de poumon humain normal et fibrosé. (à gauche) Images SHG/2PEF des biopsies pulmonaires non marquées et images acquises en lumière directe de biopsies marquées au HPS (au milieu) (a2, b2 et c2) ou au trichrome de Masson (à droite) (a3, b3 et c3). **a** Images de poumon normal qui montrent un axe bronchovasculaire et les espaces alvéolaires avec des parois minces comme illustré par HPS ; le trichrome de Masson marque le collagène en vert, ici présent autour des vaisseaux, dans les parois alvéolaires et de l'axe bronchovasculaire, en accord avec la distribution du signal SHG (en jaune sur a1). **b** Images de poumon fibrosé (IPF) qui illustrent un important changement architectural dû à la présence de la fibrose avec des parois alvéolaires déformées. **c** Images d'un foyer fibroblastique composé des myo-fibroblastes (c2) est entouré de fibrose (c3) ; l'image SHG/2PEF révèle la distribution du collagène dans la périphérie du foyer, avec des fines fibres de collagène à l'intérieur et une accumulation centrale des fibroblastes.

histologique (2D) et qui sont peu quantitatives).

Cette méthodologie pourra être généralisée à d'autres types de fibroses collagéniques et utilisée, par exemple, pour tester et évaluer les effets anti-fibrosants de certains médicaments.

4.3.2.4 Imagerie multiphoton de la fibrose pulmonaire humaine idiopathique

Afin de démontrer que la microscopie multiphoton peut très bien s'appliquer à l'étude de la fibrose pulmonaire humaine idiopathique, nous avons effectué des expériences sur des biopsies de poumon humain normal et fibrosé, fixées au paraformaldéhyde et incluses dans la paraffine (comme il a été décrit dans la préparation des échantillons, sous-section 4.3.1, page 83), et nous avons comparé les images visualisées par microscopie en lumière directe (biopsies colorées) avec celles visualisées par microscopie multiphoton (biopsies non marquées).

Les images obtenues sont montrées sur la Fig. 4.18 : coloration morphologique (HPS), marquage de la fibrose (trichrome de Masson) et images SHG/2PEF de poumon normal et de poumon fibrosé. Comme l'illustrent ces images, la microscopie multiphoton révèle toutes les caractéristiques morphologiques du tissu normal : axe bronchovasculaire, espaces alvéolaires délimités par des parois alvéolaires minces (Fig. 4.18a2) ainsi que celles du tissu fibrosé (Fig. 4.18b et c). Le tissu pulmonaire fibrosé a subi un important changement architectural dû à l'installation de la fibrose (voir le marquage au trichrome de Masson, Fig. 4.18b3) et présente des parois alvéolaires déformées. L'image multiphoton révèle les mêmes structures ainsi que les zones fibrosées (Fig. 4.18b1). Nous observons qu'il est aussi possible de visualiser la structure des foyers fibroblastiques, qui représentent les signes typiques des pneumonies interstitielles (voir Fig. 4.18c1) : l'image SHG révèle la distribution des fibres de collagène qui est plus dense dans la périphérie du foyer que dans son centre et l'image 2PEF souligne une accumulation centrale des fibroblastes dans le foyer fibroblastique. Ceci démontre que la microscopie multiphoton peut mettre en évidence toutes les caractéristiques de la fibrose pulmonaire idiopathique avec un très bon contraste par rapport aux images obtenues en lumière directe.

4.3.3 Conclusions

Cette étude nous a permis de démontrer que l'imagerie multiphoton est un outil puissant permettant de caractériser l'architecture du tissu pulmonaire normal et fibrosé avec une résolution 3D micrométrique, dans le modèle murin ainsi que sur des échantillons humains. Le signal SHG créé par le collagène fibrillaire révèle l'organisation détaillée des fibres de collagène dans la plèvre viscérale et dans les parois alvéolaires, alors que le signal 2PEF met en évidence les fibres élastiques, les macrophages ainsi que d'autres cellules de l'épithélium bronchique. Cette technique est applicable à tous les types de préparation de tissu : frais, fixé au PFA, coupes congelées, coupes fixées au paraformaldéhyde et incluses dans la paraffine, ainsi que sur des coupes colorées ou marquées avec un fluorophore exogène. Dans le modèle de fibrose pulmonaire induite par bléomycine, l'imagerie SHG permet de décrire précisément l'étendue de la fibrose pulmonaire,

révélant ainsi son caractère hétérogène. En outre, nos données indiquent que la distribution de la fibrose dans la région sous-pleurale est quasi-homogène. D'autre part, le processus inflammatoire qui accompagne la fibrose peut être corrélé aux changements de densité de pixels de fluorescence endogène cellulaire 2PEF. Tous ces résultats montrent que la microscopie multiphoton multimodale peut sonder séparément les différentes étapes d'évolution de cette pathologie pulmonaire : la fibrose et l'inflammation.

En tenant compte du caractère quantitatif du signal SHG, nous avons proposé des scores de fibrose basés sur des densités volumiques de pixels SHG dans 3 régions différentes du poumon : région pleurale, région sous-pleurale et région centrale. Ces scores présentent une plus grande sensibilité dans la région sous-pleurale et à l'inverse des techniques actuellement employées, leur détermination ne nécessite que de petits volumes de tissu (0.06 mm^3). Par conséquent, ces scores s'avèrent très intéressants pour l'évaluation quantitative de la fibrose pulmonaire et pourront facilement être généralisés à d'autres organes que le poumon. Enfin, nous espérons que l'évaluation quantitative du remodelage de la matrice extracellulaire au cours du développement de la fibrose pulmonaire, associée à d'autres techniques permettra le développement de nouvelles approches thérapeutiques basées sur une meilleure compréhension de cette pathologie.

4.4 Fibrose rénale

Parallèlement à l'étude de la fibrose pulmonaire par microscopie multiphoton, nous avons étudié un autre type de fibrose collagénique devenue une des premières causes d'insuffisance rénale terminale⁹ en France, la fibrose rénale. Cette pathologie est liée à l'accumulation anormale de constituants de la matrice extracellulaire et en particulier du collagène dans les artères et les glomérules. À un stade tardif de son évolution, la fibrose s'étend au delà de ces structures et infiltre l'interstitium rénal. L'ensemble de l'architecture rénale est ainsi détruit, ce qui conduit à une insuffisance rénale.

Dans le rein normal le collagène de type I est très peu exprimé par l'interstitium rénal [Yoshioka et al., 1990] et il est présent sous forme fibrillaire dans la capsule rénale (membrane de protection du rein), les artères, les calices rénaux mineurs et majeurs, le bassinet et l'uretère (voir la description du rein, sous-section 4.4.1). L'apparition de fibrilles de collagène de type I dans l'interstitium rénal constitue un index pathologique de fibrose et a été corrélée au risque d'évolution vers l'insuffisance rénale terminale. Mais l'origine des cellules rénales responsables de la synthèse du collagène de type I n'est pas encore établie : l'accumulation de la fibrose dans l'interstitium semble être le résultat de la prolifération et de l'activation de fibroblastes (cellules qui synthétisent du collagène) dans cette région du rein, mais d'autres hypothèses comme la

⁹Réduction irréversible et habituellement progressive de la fonction rénale dans laquelle les deux reins ont été lésés par différentes maladies au point qu'ils ne puissent plus enlever du sang les produits métaboliques et réguler la composition électrolytique du corps et la balance acido-basique. L'insuffisance rénale terminale nécessite l'hémodialyse ou la chirurgie, habituellement une transplantation rénale.

migration sanguine de fibroblastes d'origine extra-rénale, la prolifération et l'activation de fibroblastes résidents et de cellules musculaires lisses, la transition phénotypique de cellules épithéliales tubulaires, . . . pourraient expliquer ce phénomène.

De nombreuses études *in vivo* ont conclu que l'hormone angiotensine II (Ang II) joue un rôle profibrosant important soit en stimulant la synthèse du collagène de type I dans le rein [Boffa et al., 1999], soit via les contraintes mécaniques liées à l'hypertension qu'elle induit. Les essais thérapeutiques basés sur le blocage de l'activité de l'angiotensine II ont démontré qu'au delà du ralentissement de la progression de la fibrose rénale, il est possible d'obtenir une régression partielle mais pas complète de la fibrose [Boffa et al., 2003]. La régression de la fibrose rénale vasculaire ou interstitielle, comme de la fibrose pulmonaire, reste très rare et de mécanisme mal compris (évolution concernant des fibroses récentes et nécessitant la disparition du stimulus initial de fibrogenèse). Il existe probablement un point de “non-retour” physiopathologique au delà duquel la régression d'une fibrose ancienne n'est pas obtenue en agissant sur les voies connues.

D'autre part, l'auto-assemblage des fibrilles de collagène est catalysé et stabilisé ou au contraire empêché par les enzymes de la matrice extracellulaire. Le développement ou la régression de la fibrose dépend donc de l'équilibre de ces processus. Parmi ces enzymes, la transglutaminase 2 (TG2) [Lorand and Graham, 2003] a pour rôle d'établir des liaisons covalentes entre les molécules de collagène, ainsi qu'entre celles-ci et les autres protéines de la matrice. Même si la TG2 n'est pas très active physiologiquement, elle présente une forte activité lors des processus fibrosants rénaux, qui a été liée à la sévérité de l'insuffisance rénale chez l'homme [Johnson et al., 2003]. Ainsi, nous faisons l'hypothèse que l'activité extracellulaire de la TG2 dans le rein pourrait créer les conditions de l'assemblage de molécules de collagène I en fibres et participer ainsi à la fibrose et à la destruction rénale. Dans ce contexte, l'étude microscopique de la structure tridimensionnelle de la matrice extracellulaire, pourrait permettre de déceler la résistance ou la sensibilité de la matrice à l'action de la TG2 et plus généralement à l'action d'autres enzymes de cross-linking ou de dégradation.

Nous proposons ici d'utiliser la microscopie multiphoton dans un modèle murin de fibrose rénale hypertensive induite par l'Ang II afin de répondre aux questions suivantes :

- où s'accumule le collagène fibrillaire au cours de la fibrose rénale ?
- quelles sont les cellules rénales responsables de la synthèse du collagène I ?
- quel est le rôle de la TG2 dans la fibrose ?

Ce projet a été mené en collaboration avec l'équipe de Pierre-Louis Tharaux (U702 Inserm /Hôpital Tenon) et est encore en cours en raison de l'importance des questions posées et des lourdeurs liées aux modèles animaux. Nous allons présenter les résultats que nous avons obtenus au stade actuel de nos études et qui nous ont déjà permis de répondre partiellement à ces questions. Nous allons tout d'abord décrire la structure du rein, le modèle murin de fibrose rénale et la préparation des échantillons de rein de souris (section 4.4.1). Dans la section 4.4.2 seront présentés les résultats expérimentaux : imagerie multiphoton du rein normal et fibrosé (sous-section 4.4.2.1), la caractérisation de la distribution de la fibrose rénale (sous-section 4.4.2.2)

et la cartographie des facteurs responsables de la fibrose rénale (sous-section 4.4.2.3) avant de conclure et de donner les perspectives.

4.4.1 Structure du rein et modèle murin de fibrose rénale. Préparation des échantillons

Structure du rein

Les reins sont deux organes encapsulés dans une membrane transparente (capsule rénale), situés dans l'abdomen et qui assurent, par filtration et excrétion d'urine, l'équilibre hydroélectrolytique du sang et de l'organisme en général [Tortora and Grabowski, 2004]. Une coupe lon-

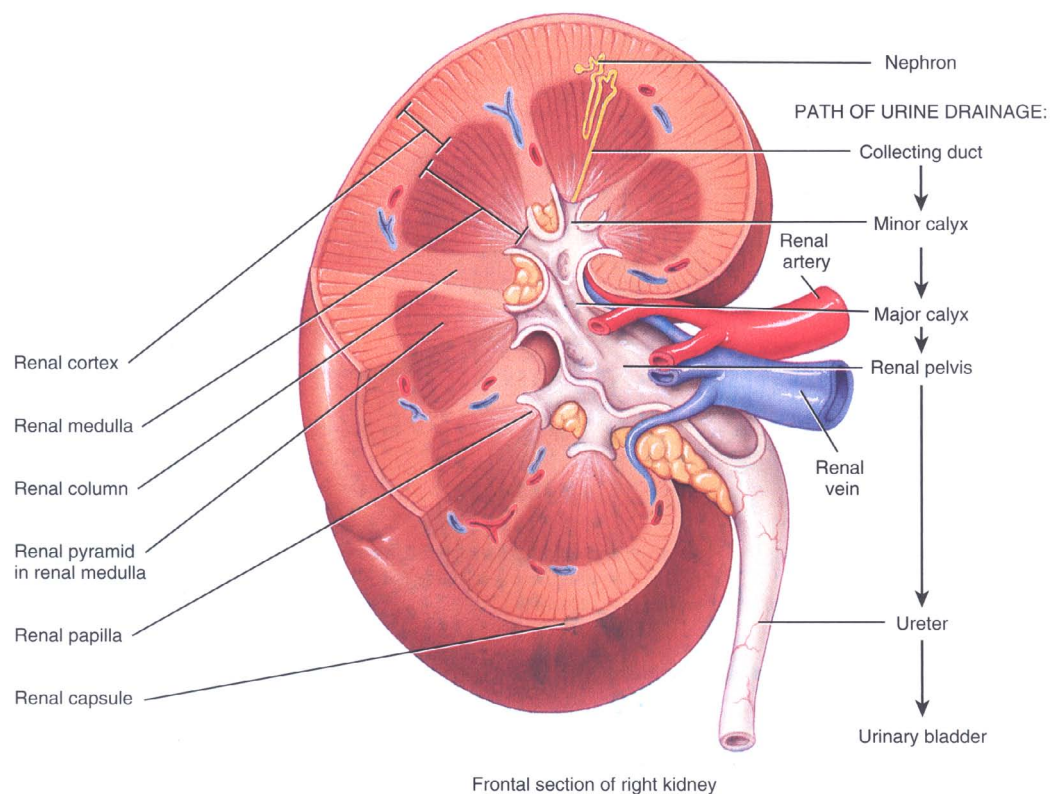


FIG. 4.19 – **Description de la structure du rein** Cette figure est extraite de la référence [Tortora and Grabowski, 2004].

gitudinale du rein (voir la Fig. 4.19) permet de distinguer trois grandes régions :

- une région externe, le cortex rénal située immédiatement sous la capsule rénale,
- une région médiane, la médulla, composée d'un ensemble de structures pyramidales à l'aspect striée, les pyramides de Malpighi,

– et au centre, en contact direct avec le hile¹⁰, une cavité, le bassinet.

Un regard plus attentif sur cette coupe nous permet de distinguer des extensions du cortex qui se prolongent jusque dans la médulla, les colonnes rénales. Les vaisseaux sanguins en provenance du hile qui irriguent le cortex et la médulla, passent dans ces colonnes rénales. Entre celles-ci se trouvent des structures en forme pyramidale ; ce sont les pyramides de Malpighi (chez la souris il y a une seule pyramide rénale). Le sommet de chaque pyramide, aussi appelé papille rénale, se projette vers le centre du rein dans une sorte d'entonnoir, le calice mineur. Celui-ci recueille l'urine qui est produite dans les parties pyramidales de la médulla. Ensuite, l'urine provenant de plusieurs calices mineurs est récoltée par les calices majeurs et déversée dans le bassinet et de là dans l'uretère. Les deux uretères droit et gauche se prolongent jusqu'à la vessie dans laquelle s'accumule l'urine qui est ensuite évacuée par l'urètre.

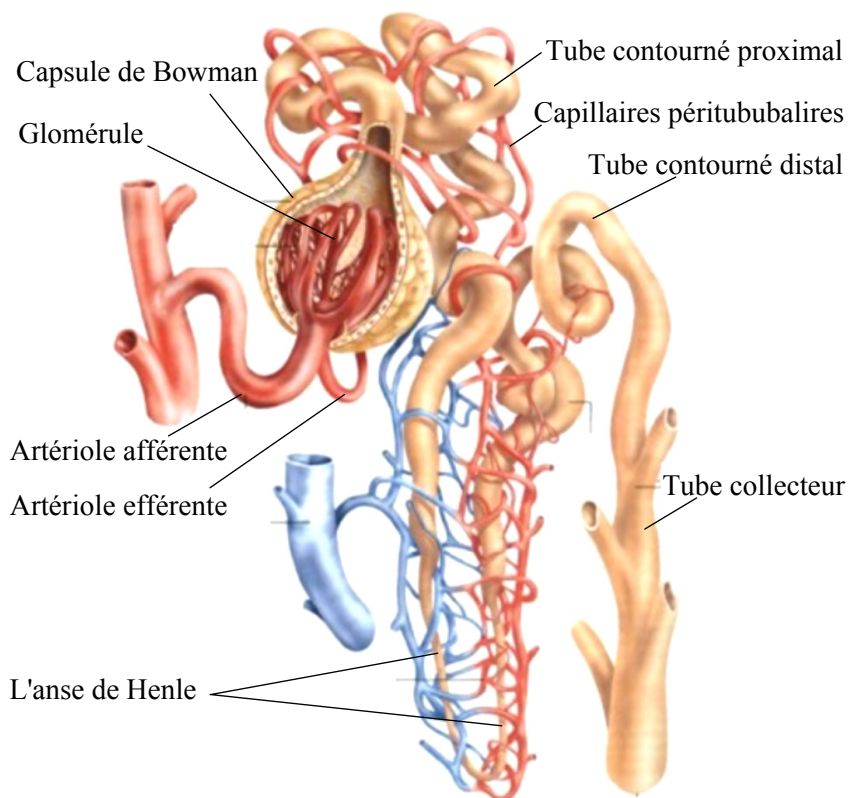


FIG. 4.20 – L'anatomie du néphron.

Le rein est constitué par la juxtaposition de millions d'unités anatomiques et fonctionnelles, les néphrons (voir la Fig. 4.20). On peut distinguer deux types de néphrons selon la profondeur à laquelle ils s'enfoncent : les néphrons juxtamédullaires qui pénètrent profondément dans la médulla et les néphrons corticaux qui n'y pénètrent pas aussi profondément. Chaque néphron est en fait composé de deux parties :

¹⁰Le hile est une structure située au niveau du bord interne de chaque rein et qui correspond à la zone d'entrée et de sortie des artères et des veines rénales, des uretères et des nerfs.

- une partie vasculaire composée d'artérioles afférente et efférente, les capillaires glomérulaires et les capillaires péri-tubulaires.
- une partie rénale composée de la capsule glomérulaire, appelée aussi capsule de Bowman, et de tubules rénaux comprenant à leur tour le tubule contourné proximal, l'anse de Henle (tubule en forme de U) et le tubule contourné distal.

Une grande partie de ces structures rénales peut être visualisée par microscopie multiphoton comme nous allons le voir dans la sous-section 4.4.2.

Modèle murin de fibrose rénale

Nous avons mené des expériences sur deux types de souris âgées de 10 à 12 semaines : souris sauvages sur fond génétique C57BL/6J (mâles) et souris déficientes en transglutaminase 2 (TG2 (-/-))¹¹ sur un fond génétique mixte C57BL/6J et 129/SvJ (femelles).

La fibrose rénale a été induite par la perfusion continue de l'Ang II (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) chez la souris, à l'aide de mini-pompes osmotiques Alzet Model 2004 (Alzet-Direct Co., Cupertino, CA) par nos collaborateurs de l'hôpital Tenon selon le procédé suivant : les souris ont été anesthésiées à l'avertin (0.1 ml/10 g de masse corporelle) injecté par voie intrapéritonéale, puis les mini-pompes osmotiques ont été placées en position sous-cutanée par une incision dorsale. Les animaux ont reçu ainsi une dose de $1 \mu\text{g d'Ang II} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ pendant 28 jours, associée à une alimentation supplémentée en sel (5 %). Ce protocole a été appliqué à la fois aux souris sauvages (TG2 (+/+)) et aux souris déficientes en TG2 (TG2 (-/-)). Un lot de souris TG2 (+/+), n'ayant pas reçu de traitement avec Ang II, a été gardé comme témoins négatifs.

Après 28 jours (J28) l'administration de l'Ang II a été arrêtée et la moitié des souris a été sacrifiée afin de caractériser la progression de la fibrose rénale dans les deux groupes de souris. Un diagnostic de glomérulosclérose¹² a été réalisé selon plusieurs critères : mise en évidence de l'accumulation de la matrice extracellulaire par coloration de coupes histologiques au trichrome de Masson, quantifiée par un score de glomérulosclérose (nombre de glomérules scléreux par rapport aux nombre total des glomérules) et albuminurie¹³ élevée dans l'urine, vraisemblablement causée par cette glomérulosclérose.

Préparation des échantillons

Coupes de tissu rénal. Pour les expériences *ex vivo* menées sur du tissu frais, des coupes épaisses (500 μm) de tissu rénal fraîchement excisé ont été placées dans un support, en immersion

¹¹Les souris déficientes en TG2 proviennent de l'équipe de Vincenzo de Laurenzi et Gerry Melino dans le Laboratoire de Biochimie IDI-IRCCS du Département de Médecine Expérimentale de l'Université Tor Vergata, Rome, Italie.

¹²Durcissement du glomérule suite à l'accumulation anormale de collagène, essentiellement de type IV).

¹³L'albumine est une protéine plasmatique produite par le foie, son excrétion excessive par les reins indique la présence d'une néphropathie glomérulaire (affection rénale due à un trouble fonctionnel ou à des lésions organiques du rein).

dans une solution saline (PBS) à 1 % (voir la Fig. 4.1) et visualisées directement par microscopie multiphoton. Pour les expériences menées sur du tissu congelé ou fixé, des reins fraîchement excisés ont été directement congelés pour les cryosections ou fixés avec de la formaldéhyde à 4 % pendant 24 h puis placés dans du PBS à 1 % afin de les visualiser plus tard. Nous avons réalisé deux types de coupes de tissu à l'aide d'un vibratome, longitudinale et coronale, afin de visualiser les différentes régions rénales. Les deux géométries de coupe de tissu rénal sont illustrées sur la Fig. 4.21.

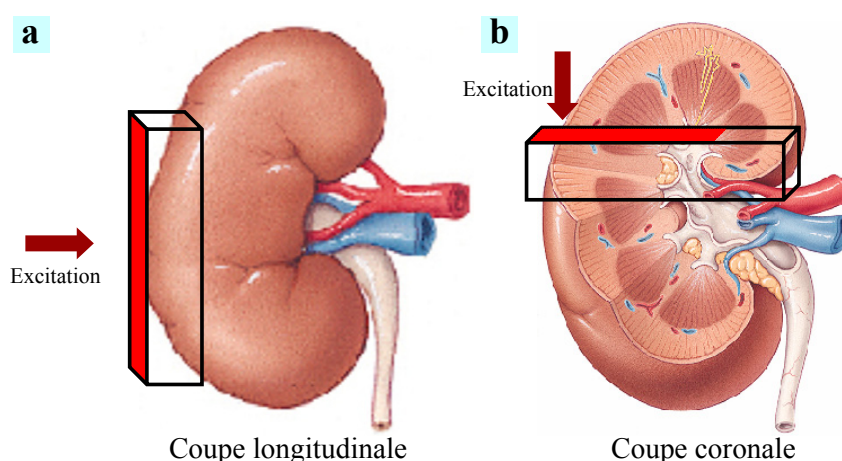


FIG. 4.21 – **Géométries de coupe de tissu rénal** : **a** coupe longitudinale dans le cortex et **b** coupe coronale, indiquées par les deux parallépipèdes. Les parallélogrammes rouges indiquent les plans d'excitation pour $z = 0 \mu\text{m}$ (vu que la taille d'une image est de $550 \mu\text{m} \times 550 \mu\text{m}$, l'échantillon est déplacé le long du parallélogramme afin de visualiser une plus grande zone. Les images de rein proviennent de la référence [Tortora and Grabowski, 2004].

Marquage par immunofluorescence du collagène de type I et du collagène de type IV. Pour cela, des coupes de $4 \mu\text{m}$ d'épaisseur de tissu rénal congelé, réalisées au cryostat, ont été fixées avec de l'acétone pendant 5 min. Après avoir été bien séchées, les coupes ont été cerclées avec un crayon marqueur à dépôt hydrophobe (Dakopen, Millian SA, USA) puis lavées avec du PBS et bloquées pendant 15 min avec du PBS - BSA ("bovine serum albumin" ou albumine de sérum bovin) à 1 %. Les coupes ont été ensuite mises en contact avec l'anticorps primaire anti-souris produit chez le lapin (anti-collagène I (Chemicon, AB765P) à $20 \mu\text{g/ml}$ ou anti-collagène IV (Chemicon, AB756P) à $10 \mu\text{g/ml}$) pendant 1.5 h à la température ambiante. Des témoins négatifs ont été réalisés en n'appliquant sur les coupes que du PBS - BSA à 1 %. Après lavage avec du PBS - BSA à 1 %, les coupes ont été incubées pendant 30 min à température ambiante avec l'anticorps secondaire, anti-lapin produit chez la chèvre, couplé à la R-Phycoérythrine (Jackson Immunoresearch, à $2.5 \mu\text{g/ml}$). Les coupes ont été ensuite montées sous lamelle.

Révélation des cellules en prolifération. Pour cela, des souris sauvages TG2(+ / +) soumises au traitement par l'angiotensine II, ont reçu une dose journalière de 0.8 mg/ml de BrdU (bro-

modésoxyuridine, Sigma-Aldrich - référence 858811-5G) pendant 28 jours dans l'eau de boisson. Le BrdU est un marqueur de la prolifération cellulaire, analogue de la thymidine : il s'incorpore dans l'ADN des cellules à renouvellement lent et ces cellules porteuses de BrdU sont ensuite reconnues à l'aide d'un anticorps fluorescent. À J28 les souris ont été sacrifiées et les reins ont été congelés pour permettre des cryosections. Puis des coupes de 4 μm d'épaisseur de tissu rénal congelé ont été fixées avec de l'acétone pendant 5 min. Après avoir été bien séchées, les coupes ont été mises en contact avec un anticorps anti-BrdU (BD Biosciences, référence 556028, dilution

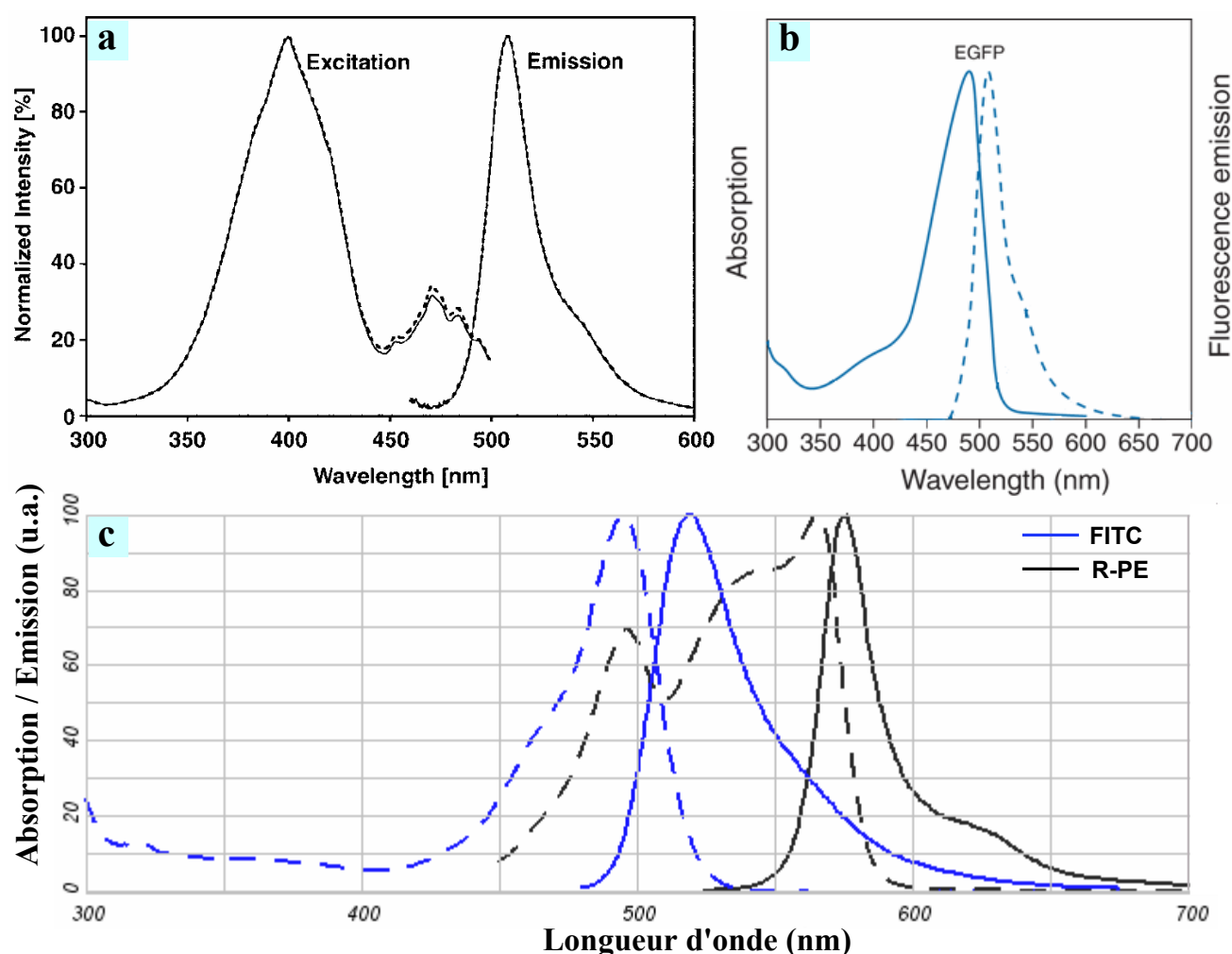


FIG. 4.22 – Spectre d'absorption et spectre de fluorescence excitée à 1 photon **a** de la GFPuv (tiret - la forme linéaire, trait continu - la forme circulaire), **b** de la EGFP, **c** de la FITC (fluorescéine-5-isothiocyanate) et de la R-Phycoérythrine (R-PE). Tous les spectres proviennent du site internet de Molecular Probes, Invitrogen (<http://probes.invitrogen.com>) sauf les spectres de la GFPuv qui sont tirés de la référence [Iwai et al., 2001].

1/100) couplé à la FITC (fluorescéine-5-isothiocyanate) pendant 30 min à température ambiante. Elles ont été ensuite montées sous lamelle.

Révélation de l'activité enzymatique de la TG2 avec His6-Xpress-GFP. Des coupes de 4 μm d'épaisseur de tissu rénal congelé, réalisées au cryostat, ont été montées sur des lames couvertes avec de la gélatine, puis elles ont été laissées sécher pendant 30 min à température ambiante. Les lames ont été ensuite incubées pendant 1 h à 37°C avec une solution de 0.1 mg/ml de His6-Xpress-GFP dans un tampon pour la TG2 (50 mM Tris-HCl, 1 mM dithiothréitol et 5 mM CaCl₂, pH 7.5). Par la suite, les coupes ont été lavées avec du PBS et montées sous lamelle. La protéine recombinée His6-Xpress-GFP est un produit dérivé de la protéine verte fluorescente GFPuv (mutant GFP optimisé pour produire un signal de fluorescence maximal par excitation dans l'UV). Elle permet de révéler l'activité de l'enzyme TG2 dont elle forme un substrat : la TG2 établit des ponts $\epsilon-(\gamma\text{-glutamyl})\text{lysine}$ entre les protéines de la matrice extracellulaire et la région peptidique Xpress de la protéine recombinée [Furutani et al., 2001].

Identification des cellules qui synthétisent le collagène de type I. Pour cela nous avons utilisé des souris transgéniques exprimant la protéine fluorescente eGFP ("enhanced" GFP) sous le contrôle du promoteur de la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type I [Magness et al., 2004]. Cette protéine est donc exprimée dans les cellules où il y a une synthèse du collagène de type I. Les reins ont été fixés avec de la formaldéhyde à 4 % pendant 24 h puis placés dans du PBS à 1 % afin de les visualiser plus tard.

Les spectres d'émission de différents fluorophores exogènes utilisés dans cette étude sont montrés sur la Fig. 4.22.

4.4.2 Résultats expérimentaux et discussion

4.4.2.1 Imagerie multiphoton du rein normal et fibrosé

Nous présentons ici les expériences menées *ex vivo* sur du tissu rénal normal et fibrosé. La Fig. 4.23 montre des images multiphoton de rein normal acquises à différentes profondeurs dans une coupe longitudinale de tissu (voir la Fig. 4.21). À gauche nous montrons une projection en z de trois images SHG acquises tous les 3 μm à partir de la surface du rein. Elle cartographie la distribution de fibres de collagène dans la membrane de protection du rein, la capsule rénale, dont l'épaisseur moyenne est de 10 μm . Nous observons, qu'à l'inverse de la plèvre viscérale du poumon où les fibres de collagène forment un réseau quasi-élastique qui permet sa dilatation lors de la respiration, la capsule rénale, appelée aussi loge fibreuse, a une structure très dense de fibres de collagène qui d'une part jouent un rôle de protection du rein lors de traumatismes et d'autre part lui donne sa forme et sa consistance ferme.

La Fig. 4.23b présente une image combinée SHG/2PEF acquises à 18 μm en profondeur dans le cortex rénal. La distribution du signal 2PEF révèle des structures que nous avons attribuées, sur des considérations morphologiques, aux tubules rénaux. Les structures rondes et noires correspondent aux noyaux des cellules tubulaires qui ne sont pas fluorescents. L'absence d'un signal

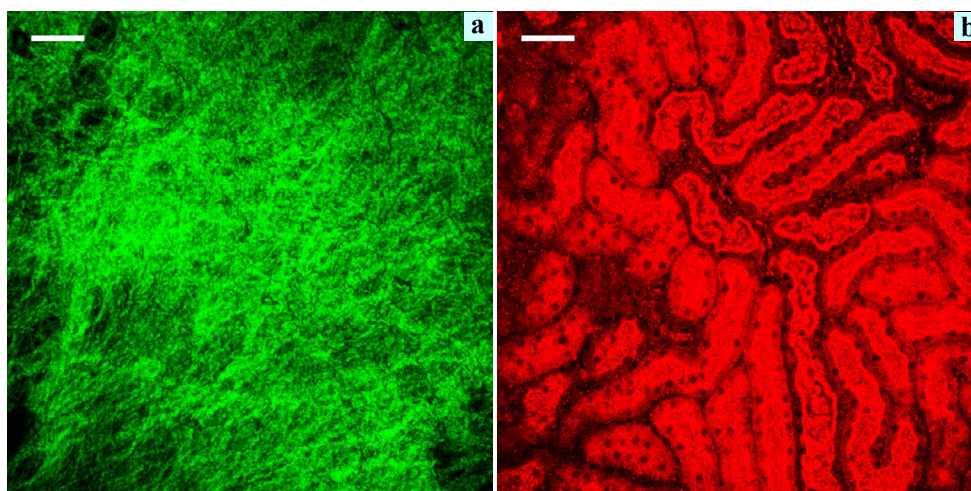


FIG. 4.23 – **Images multiphoton *ex vivo* de rein normal de souris** (excitation 860 nm, 25 mW, temps d’acquisition 7.2 s/image, taille 880×880 pixels, barre d’échelle : 50 μ m). En vert est représenté le signal SHG, en rouge le signal 2PEF. **a** Image SHG qui cartographie la distribution des fibres de collagène dans la capsule rénale ; **b** Image combinée SHG/2PEF acquise à 18 μ m en profondeur dans le cortex : le signal 2PEF met en évidence les tubules rénaux et l’absence de signal SHG rend compte du fait qu’il n’y a pas de collagène fibrillaire dans la région corticale d’un rein non fibrosé.

SHG à cette profondeur du cortex et plus généralement dans l’interstitium rénal est lié au fait que dans un rein non fibrosé, le collagène de type I est présent seulement dans l’adventice artériel, les artères, les calices rénaux mineurs et majeurs, le bassinnet et l’uretère.

Au contraire, au cours du développement de la fibrose la distribution des collagènes dans le rein change : le collagène de type I va s’accumuler autour de vaisseaux (fibrose vasculaire) et dans l’interstitium rénal, autour de tubules et de glomérules (fibrose interstitielle), alors que le collagène de type IV s’accumule surtout dans les glomérules (glomérulosclérose). Pour vérifier la spécificité du signal SHG créé dans le rein, nous avons réalisé des expériences sur des coupes histologiques de tissu rénal marqué avec des anticorps anti-collagène I et anti-collagène IV, liés à un fluorophore exogène. Ceci permet de comparer la distribution du signal SHG avec celle du signal de fluorescence 2PEF exogène.

Tout d’abord, des coupes histologiques congelées de tissu rénal fibrosé ont été marquées avec un anticorps anti-collagène de type I lié à la R-PE et visualisées par microscopie multiphoton (excitation 972 nm). La Fig. 4.24 regroupe quelques images multiphoton de tissu rénal fibrosé et congelé : les Fig. 4.24a et d illustrent la distribution des fibres de collagène visualisées par microscopie SHG et les Fig. 4.24b et e révèlent la distribution du collagène de type I marqué avec un anticorps lié à la R-PE dans les mêmes régions. Nous observons que le collagène de type I (voir les Fig. 4.24c et f) est présent dans l’interstitium rénal (fibrose interstitielle), autour de la capsule de Bowmann des glomérules (G), dans l’adventice artérielle (A) (présence normale du

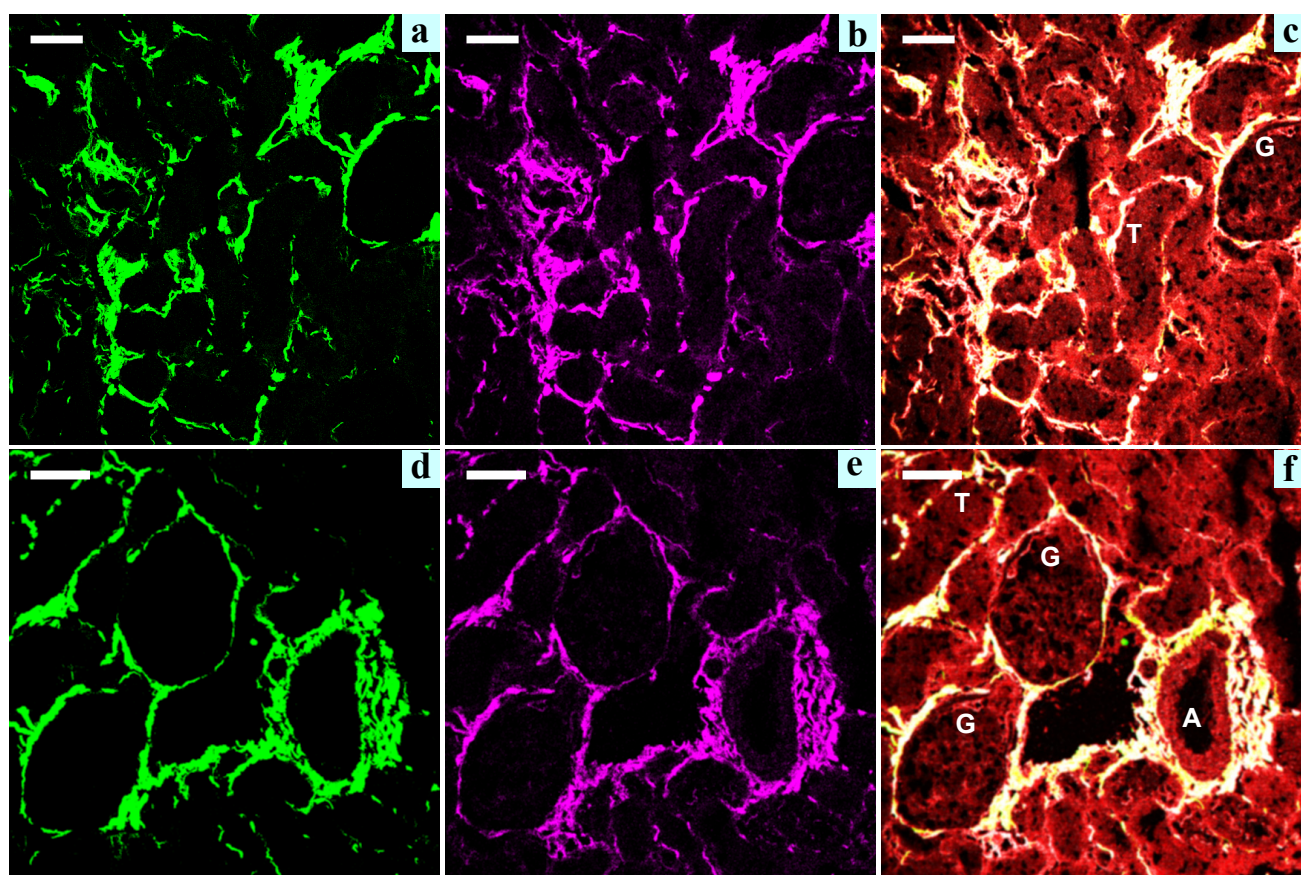


FIG. 4.24 – **Marquage immunofluorescent anti-collagène I.** Images multiphoton de tissu rénal congelé et fibrosé (excitation 972 nm, 35 mW, temps d'acquisition : 5 s/image (a,b,c) et 6.5 s/images (d,e,f), barre d'échelle : 50 μ m). En vert est représenté le signal SHG, en rouge le signal 2PEF de fluorescence endogène et en magenta le signal 2PEF de fluorescence exogène (R-PE). **a et d** Images SHG qui mettent en évidence la distribution des fibres de collagène dans l'interstitium rénal; **b et e** Images 2PEF exogène qui révèlent la distribution du collagène de type I marqué avec un anticorps lié à la R-PE; **c et d** Images combinées SHG/2PEF endogène/2PEF exogène : la distribution du signal SHG est identique à celle du signal 2PEF créé par le marqueur exogène (représentée en blanc). **A** - artère, **G** - glomérule, **T** - tubule rénal.

collagène de type I) et dans l'interstitium périvasculaire (fibrose vasculaire). Nous remarquons que la distribution du collagène de type I dans le rein, révélée par marquage immunofluorescent anti-collagène I, est identique à la distribution des fibres de collagène mise en évidence par génération de seconde harmonique. La co-localisation de ces deux signaux et le fait que l'anticorps reconnaît spécifiquement les molécules de collagène I et non pas les molécules de procollagènes situées dans les cellules démontrent une fois de plus que le signal SHG est spécifique du collagène fibrillaire de type I (dans l'espace extracellulaire les molécules de collagène I s'auto-assemblent pour former

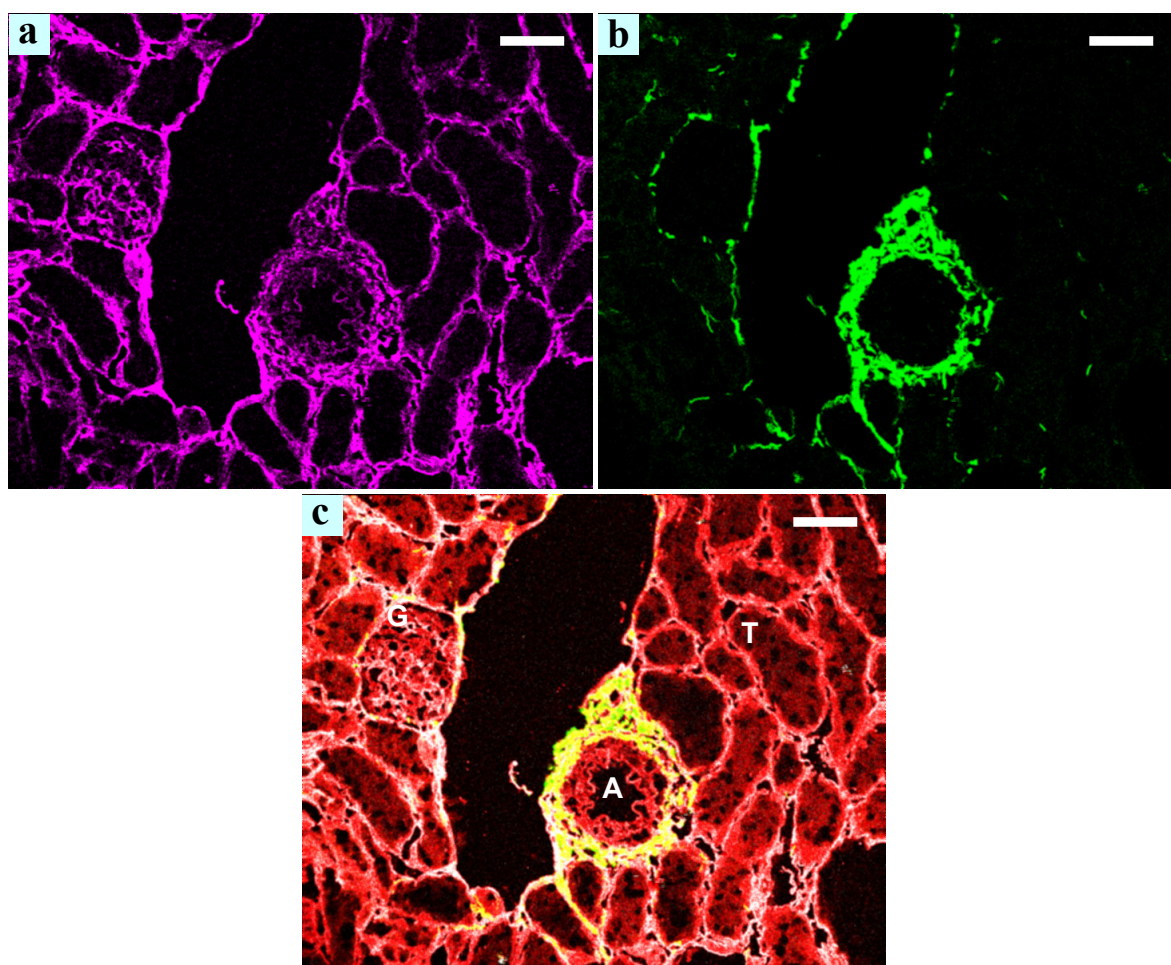


FIG. 4.25 – **Marquage immunofluorescent anti-collagène IV.** Images multiphoton de tissu rénal congelé et fibrosé (excitation 972 nm, 26 mW, temps d'acquisition : 6.5 s/image, barre d'échelle : 50 μ m). En vert est représenté le signal SHG, en rouge le signal 2PEF de fluorescence endogène et en magenta le signal 2PEF de fluorescence exogène (R-PE). **a** Image 2PEF exogène qui révèle la distribution du collagène de type IV, marqué avec un anticorps lié à la R-PE, dans les membranes basales ; **b** Image SHG qui met en évidence la distribution des fibres de collagène de type I dans l'interstitium rénal ; **c** Image combinée SHG/2PEF endogène/2PEF exogène : la distribution du signal SHG est clairement différente de celle du collagène de type IV. **A** - artère, **G** - glomérule, **T** - tubule rénal.

des fibrilles de collagène) et que la fibrose rénale due à l'accumulation pathologique de celui-ci peut être mise en évidence par microscopie SHG.

Afin de visualiser la distribution de l'accumulation de collagène de type IV et la comparer avec la distribution du signal SHG, nous avons fait un marquage immunofluorescent anti-collagène de type IV sur des coupes congelées de tissu rénal fibrosé. Les lames ont été visualisées par

microscopie multiphoton avec une excitation à 972 nm et les images obtenues sont montrées sur la Fig. 4.25. L'image de fluorescence exogène (Fig. 4.25a) illustre la distribution du collagène de type IV dans le rein : il est présent dans toutes les membranes basales tubulaires (T) et glomérulaires (G) (voir la Fig. 4.25c) et son accumulation excessive contribue à un épaissement mesurable de la taille de ces membranes. L'image SHG révèle une distribution du collagène fibrillaire de type I dans le rein qui est très différente de celle du collagène de type IV (Fig. 4.25b). Ces images confirment une fois de plus la spécificité du signal SHG, au niveau macromoléculaire, pour le collagène fibrillaire, comme nous l'avons montré lors des expériences de génération de seconde harmonique en surface et d'imagerie multiphoton sur les artères, la peau et le poumon.

Comme le montrent ces figures, d'autres structures peuvent être visualisées par microscopie multiphoton grâce aux signaux endogènes de fluorescence. Les tubules rénaux, les glomérules et plus précisément leurs capillaires glomérulaires, les canaux collecteurs (collectant l'urine et se trouvant dans les papilles rénales, voir la Fig. 4.29) produisent un signal de fluorescence endogène cellulaire. Ce signal est probablement dû à la présence de différents fluorophores cellulaires qui émettent dans le rouge, comme les rétinoides ou les flavoprotéines, mais ceci reste à vérifier par des mesures de spectres de fluorescence. Les artères rénales sont aussi visibles par microscopie 2PEF grâce au signal de fluorescence de l'élastine qui est présente dans leur média. Deux exemples sont donnés sur les Fig. 4.24f et Fig. 4.25c, la dernière révélant une artère rénale (A) dont la lamelle élastique interne est ondulée.

Nous allons maintenant présenter la mise en évidence de la fibrose rénale par microscopie multiphoton sur du tissu frais. Pour cela, nous avons mené des expériences *ex vivo* sur des souris fibrosées (fibrose induite par administration d'AngII pendant 28 jours), sacrifiées à J28. La Fig. 4.26 montre des images d'une biopsie longitudinale de tissu rénal fibrosé (voir la Fig. 4.21), obtenues pour une excitation à 860 nm. Ces images, acquises à différentes profondeurs à partir de la surface du cortex (6 μm - **a**, 10 μm - **b**, 32 μm - **c** et 70 μm - **d**), mettent en évidence une grande accumulation de collagène fibrillaire dans le tissu, donc une fibrose rénale bien installée à J28. Nous avons observé que la fibrose rénale, induite par l'AngII, est localisée dans l'interstitium rénal autour de tubules rénaux et de glomérules.

Dans nos conditions d'excitation, nous avons pu visualiser la région corticale jusqu'à une profondeur de 120 μm . Pour cela des piles d'images multiphoton ont été acquises tous les 2 μm . Un exemple est montré sur la Fig. 4.28 (à gauche), qui illustre la distribution de la fibrose dans cette région du rein ; la pile d'images est visualisée sous forme de film¹⁴. Une séquence d'images multiphoton acquises tous les 8 μm dans la même zone est reprise dans la Fig. 4.27.

À partir de ces images nous avons ensuite fait des reconstructions 3D qui permettent de visualiser l'architecture de la fibrose rénale dans la région corticale. Un exemple est donné sur la Fig. 4.28 (à droite).

L'ensemble de ces données montre qu'il est possible de visualiser par microscopie multiphoton la morphologie du tissu rénal grâce aux signaux endogènes de fluorescence (2PEF) et l'architec-

¹⁴Sur la version papier ce film est remplacé par une image acquise à 8 μm de profondeur à partir de la surface.

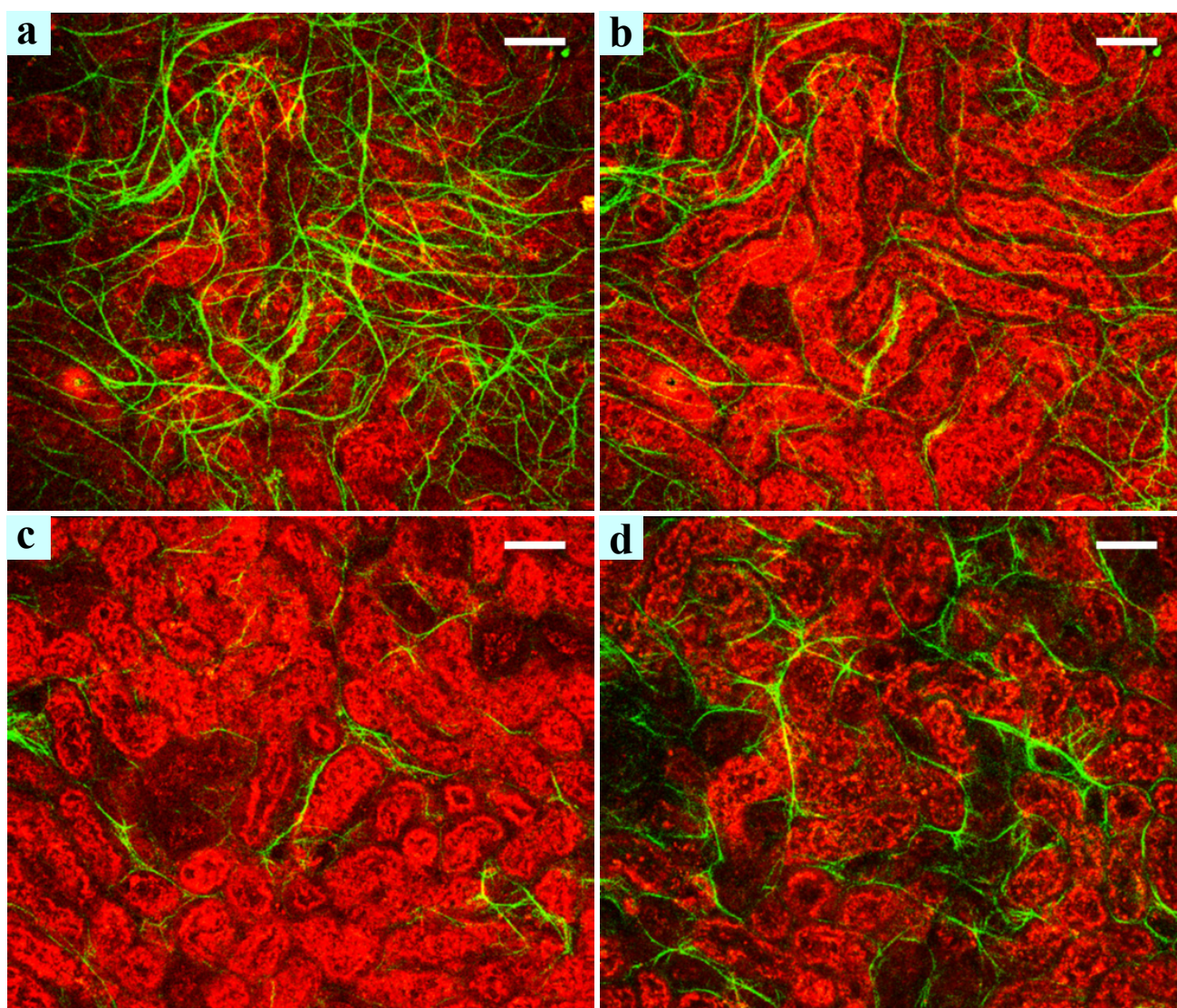


FIG. 4.26 – **Images multiphoton *ex vivo* de rein fibrosé de souris** (excitation 860 nm, 50 mW, temps d'acquisition 10.9 s/image, taille 925×787 pixels, barre d'échelle : 50 μm). En vert est représenté le signal SHG, en rouge le signal 2PEF. Les images ont été acquises à différentes profondeurs dans le cortex : 6 μm (a), 10 μm (b), 32 μm (c) et 70 μm (d).

ture de la fibrose rénale par génération de seconde harmonique par le collagène fibrillaire de type I. Nous avons démontré que l'AngII induit chez la souris une fibrose tubulo-interstitielle comparable à celle observée dans les néphropathies humaines chroniques évoluées [Nath, 1990] et qui est directement liée à la progression de l'insuffisance rénale. Nous avons aussi observé que les fibres de collagène I ne s'accumulent pas dans les glomérules rénaux, même s'ils ont la capacité de synthèse du collagène I *in vitro* [Johnson et al., 1992, Kagami et al., 1994]. Nous allons voir

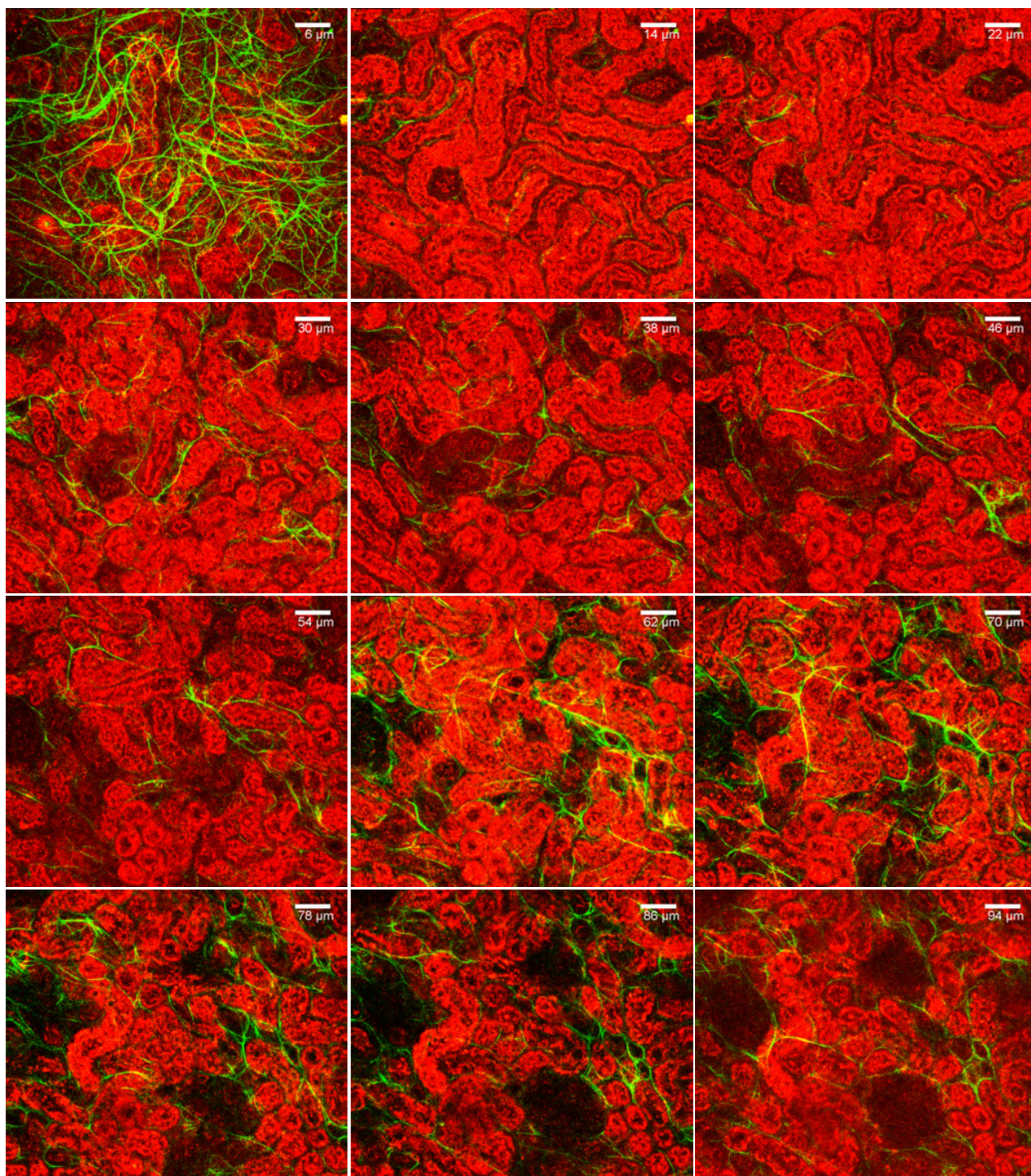


FIG. 4.27 – Images multiphoton *ex vivo* de rein fibrosé de souris, à différentes profondeurs variant avec un pas de 8 μm . Excitation 860 nm, 50 mW, temps d'acquisition 10.9 s/image, taille 925×787 pixels, barre d'échelle : 50 μm . En vert est représenté le signal SHG, en rouge le signal 2PEF.

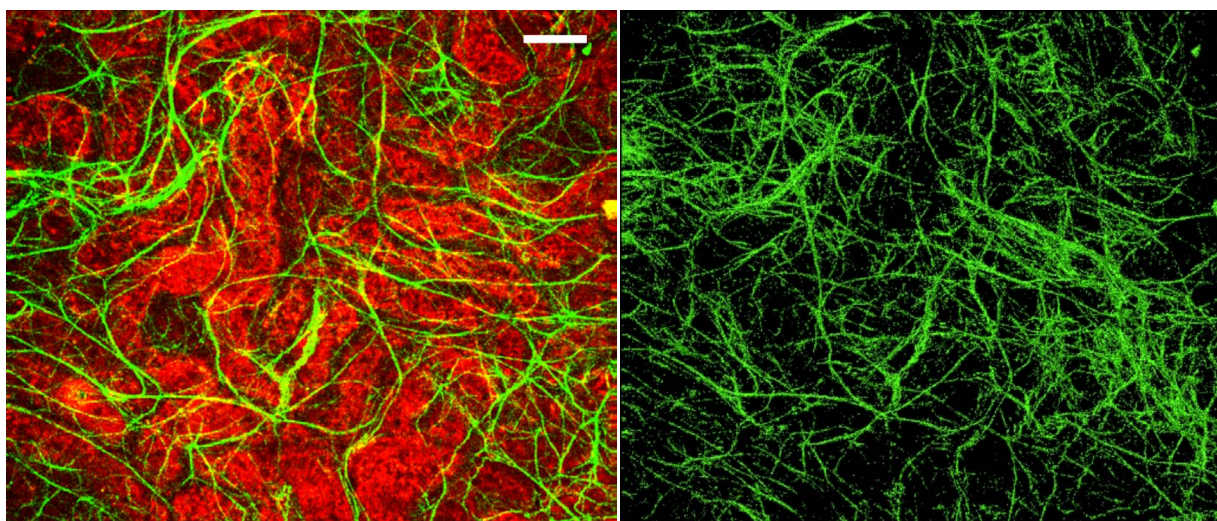


FIG. 4.28 – **Images combinées SHG (vert)/2PEF (rouge) de rein fibrosé de souris** : à gauche, visualisation sous forme de film d’une pile d’images acquises dans le cortex (sur la version papier le film est remplacé par une image acquise à $8\ \mu\text{m}$ de profondeur) et à droite, reconstruction 3D du signal SHG acquis au même endroit. Puissance d’excitation 50 mW à 860 nm, temps d’acquisition total 10.9 minutes. Pile de 60 images ($925 \times 787\ \mu\text{m}^2$) espacées de $2\ \mu\text{m}$. Barre d’échelle : $50\ \mu\text{m}$.

dans la section 4.4.2.3 quelles sont les cellules qui synthétisent le collagène de type I *in vivo* chez la souris.

Dans la partie suivante, nous allons présenter les expériences de caractérisation de la fibrose rénale à une plus grande échelle, c’est-à-dire sur une coupe coronale de tissu.

4.4.2.2 Caractérisation de la distribution de la fibrose rénale

Compte tenu du caractère hétérogène de la fibrose rénale, nous avons cherché à caractériser sa distribution dans le rein. Pour cela, les souris ayant reçu le traitement d’AngII ont été sacrifiées à J28 et les reins ont été fixés avec de la formaldéhyde à 4 % (voir la préparation des échantillons, page 107). Des coupes coronales de tissu rénal de $200\ \mu\text{m}$ d’épaisseur ont été réalisées à l’aide d’un vibratome à la même distance du pôle rénal pour tous les reins analysés. Une série de piles d’images multiphoton a été ensuite acquise à partir du cortex jusqu’au niveau de la papille rénale sur une superficie de $1.65\ \text{mm}^2$ et en profondeur sur $50\ \mu\text{m}$, ce qui donne un volume total sondé de $8.2 \cdot 10^{-2}\ \text{mm}^3$. Un exemple typique d’images obtenues pour une excitation à 860 nm est donné sur la Fig. 4.29. Elle présente en haut et au milieu deux images combinées SHG/2PEF (chaque image combine trois images multiphoton) qui illustrent d’une part la morphologie du rein dans les régions corticale (tubules rénaux, glomérules), médullaire (tubules rénaux) et papillaire (canaux collecteurs) et d’autre part la distribution de la fibrose rénale. Comme nous pouvons l’observer sur

ces images, la fibrose rénale a une distribution très hétérogène. Elle s'accumule dans les régions corticale et médullaire (voir aussi la reconstruction 3D du signal SHG dans ces régions, en bas

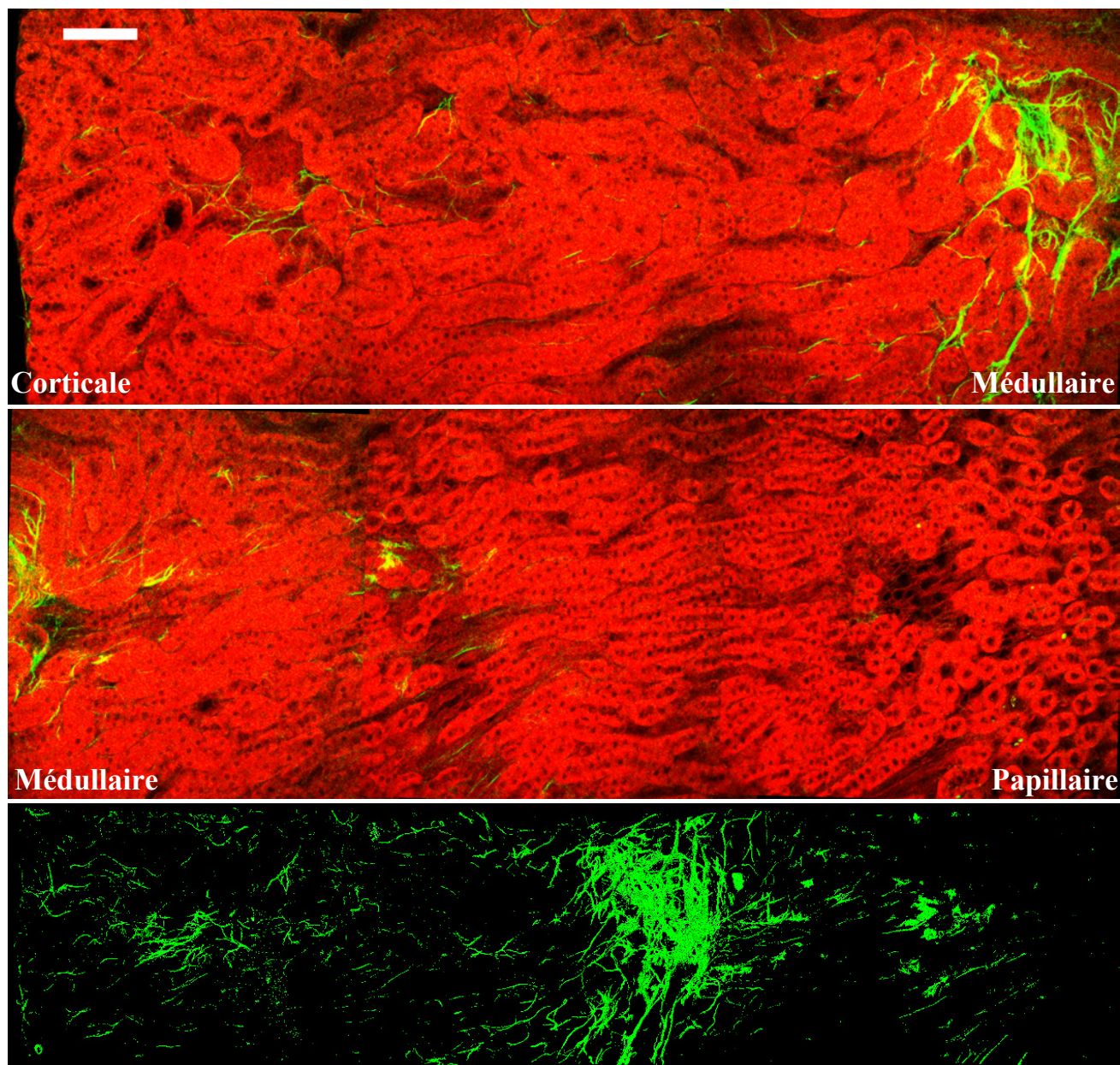


FIG. 4.29 – **Distribution de la fibrose rénale chez la souris (coupe coronale).** (**haut**) Images combinées SHG (vert)/2PEF (rouge) révélant la morphologie du rein et la distribution de la fibrose dans les régions corticale, médullaire et papillaire. Excitation à 860 nm, 20 mW, barre d'échelle : 100 μm . Chaque image combine 3 images multiphoton de taille 980 $\times$ 1032 pixels (temps d'acquisition 15.1 s/image) ; (**bas**) Reconstruction 3D du signal SHG dans la région cortico-médullaire (épaisseur totale de 50 μm).

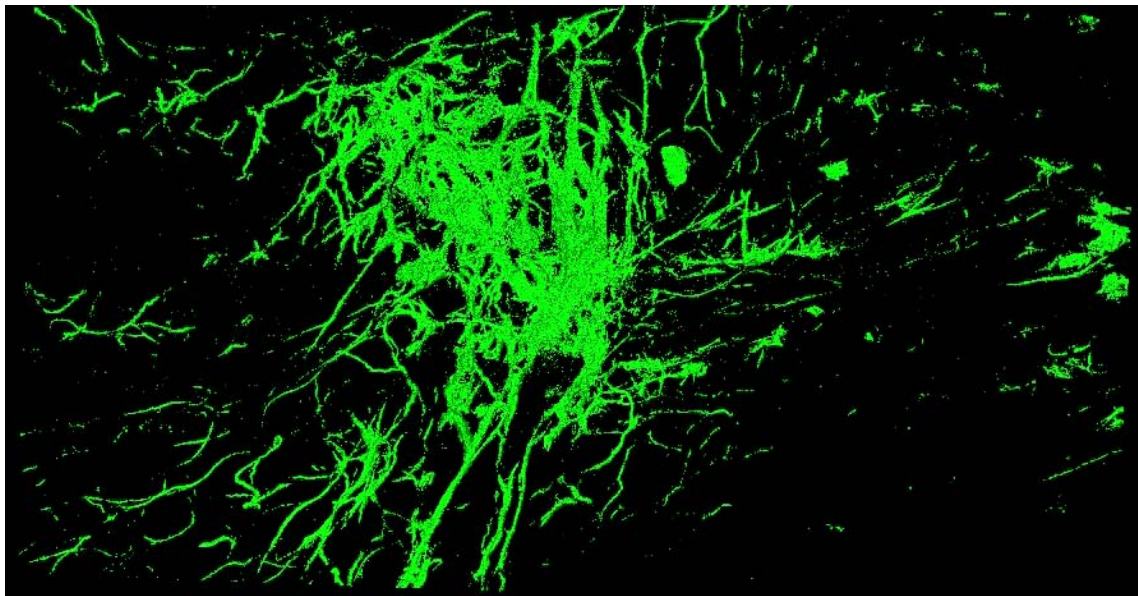


FIG. 4.30 – **Reconstruction 3D du signal SHG dans la région cortico-médullaire.** Ce film illustre l'architecture de la fibrose rénale chez la souris, elle présente une plus grande densité de fibres de collagène dans la région cortico-médullaire.

de la Fig. 4.29) autour des tubules rénaux avec une plus grande densité de fibres de collagène dans la région cortico-médullaire (voir le film montré sur la Fig. 4.30). Dans nos expériences, nous avons systématiquement observé que la région cortico-médullaire est la plus atteinte par la fibrose. Cette inhomogénéité de la fibrose rénale pose de nouvelles questions physiopathologiques sur la présence de cellules particulières qui synthétisent le collagène ou d'autres facteurs qui pourrait induire cette fibrose. Ces facteurs ne sont pas connus, mais il est possible que la fibrose vasculaire soit le résultat d'une migration sanguine de fibroblastes d'origine extra-rénale, d'une prolifération et activation de fibroblastes résidants ou de cellules musculaires lisses et que la fibrose interstitielle soit due à une prolifération et activation des fibroblastes résidents dans l'interstitium rénal ou à un changement de phénotype de cellules épithéliales tubulaires [Kalluri and Neilson, 2003, Neilson, 2006]. Dans les sous-sections suivantes nous allons aborder une partie de ces hypothèses, notamment les questions du rôle de la TG2 dans l'assemblage de fibres de collagène et celui de cellules qui synthétisent le collagène de type I.

4.4.2.3 Cartographie des facteurs (cellules/protéines) responsables de la fibrose

La transglutaminase tissulaire TG2 est une enzyme qui a pour rôle d'établir des liaisons covalentes entre les molécules de collagène, ainsi qu'entre celles-ci et les autres protéines de la matrice extracellulaire [Lorand and Graham, 2003]. Elle pourrait donc jouer un rôle important dans la stabilisation de la fibrose rénale, en lui conférant une résistance à l'action des enzymes de

dégradation. Afin d'apprécier le rôle de cette enzyme dans la fibrose rénale, nous avons comparé des souris sauvages TG2(+/-) avec des souris déficientes en transglutaminase 2 TG2(-/-).

Cartographie de l'activité de la transglutaminase tissulaire TG2 et son rôle dans la fibrose rénale Tout d'abord, nous avons comparé l'activité tissulaire de la TG2 avec le signal SHG du collagène fibrillaire sur des coupes histologiques de tissu congelé qui ont été incubées avec la His6-Xpress-GFP. Ce substrat fluorescent de la TG2 permet de révéler l'activité de cette enzyme lors de sa fixation aux protéines de la matrice extracellulaire rénale. Nous avons analysé des souris TG2(+/-) et TG2(-/-) fibrosées, donc ayant reçu le traitement avec l'AngII pendant 28 jours, et des souris TG2(+/-) sans aucun traitement. Les résultats que nous avons obtenus sont montrés sur la Fig. 4.31. Nous avons représenté en rouge le signal de fluorescence 2PEF endogène du tissu rénal, en vert le signal SHG créé par les fibres de collagène et en cyan le signal de fluorescence 2PEF exogène créé par l'His6-Xpress-GFP qui met en évidence l'activité de la TG2. Sur les images multiphoton qui combinent ces signaux l'activité de la TG2 est représentée en blanc, afin de mieux la visualiser.

Nous avons constaté que les souris génétiquement déficientes en TG2 (souris TG2(-/-)) et ayant reçu de l'AngII pendant 28 jours ne présentent pas de fixation du substrat fluorescent His6-Xpress-GFP dans le tissu rénal (voir la Fig. 4.31b), comme attendu. Ceci indique une absence de compensation par une activité transglutaminase autre. Les souris sauvages TG2(+/-) ayant reçu de l'AngII présentent une forte activité de la TG2 dans l'interstitium rénal, périglomérulaire et péricapillaire, et dans la média et l'adventice artérielle (Fig. 4.31a). Dans les régions fibrosées, où le collagène fibrillaire s'accumule, il y a une co-localisation du signal SHG avec celui de l'His6-Xpress-GFP. Chez les souris sauvages TG2(+/-) qui n'ont pas reçu de traitement avec l'AngII (souris normales), l'activité de la TG2 est beaucoup moins intense et localisée dans la média et l'adventice artérielle (Fig. 4.31c). D'autre part, puisque les souris TG2(+/-) traitées avec l'AngII présentent une activité de liaison covalente du substrat fluorescent de la TG2 nettement accrue par comparaison à celle de souris non traitées, il est possible que l'AngII stimule l'activité de la TG2, mais cette hypothèse reste à être validée.

Afin de mettre en évidence le rôle de la TG2 dans l'organisation extracellulaire du collagène fibrillaire, donc dans la constitution de la fibrose rénale, nous avons quantifié (voir le principe de quantification du signal SHG, page 79) et comparé la densité volumique de pixels présentant un signal SHG (dit "pixels SHG") pour trois groupes de souris : i) souris TG2(+/-) sans traitement d'AngII (2 souris), ii) souris TG2(+/-) avec traitement d'AngII pendant 28 jours (6 souris) et iii) souris TG2(-/-) avec traitement d'AngII pendant 28 jours (6 souris).

Les reins ont été fixés avec de la formaldéhyde à 4 % et des coupes coronales de 200 μm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un vibratome. Le signal SHG a été quantifié dans un volume de tissu de $8.2 \cdot 10^{-2} \text{mm}^3$ qui correspond à une série de 6 piles d'images multiphoton acquises à partir du cortex jusqu'au niveau de la papille rénale sur une superficie de 1.65mm^2 et en profondeur sur 50 μm (voir par exemple la Fig. 4.29). Les résultats que nous avons obtenus sont présentés sur la Fig. 4.32 : nous montrons les valeurs moyennes de densité volumique de

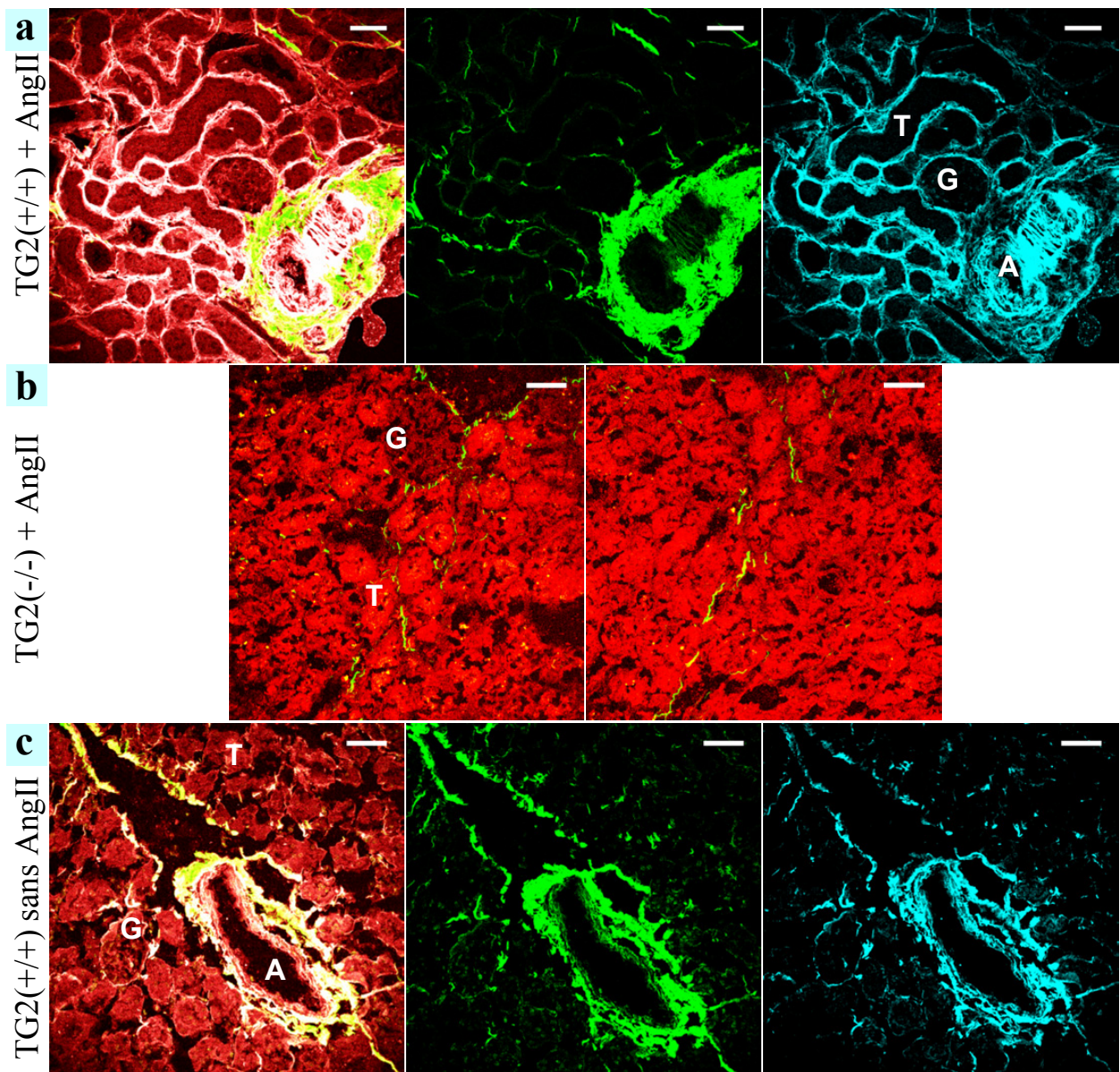


FIG. 4.31 – Cartographie de l'activité de la transglutaminase tissulaire TG2. La fluorescence endogène est représentée en rouge, le signal SHG du collagène fibrillaire en vert et le signal 2PEF exogène de l'His6-Xpress-GFP, qui met en évidence l'activité de la TG2, en cyan. Sur l'image combinée 2PEF endogène/SHG/2PEF exogène, l'activité de la TG2 est représentée en blanc. **a** Souris TG2(+/+) ayant reçu le traitement avec l'AngII pendant 28 jours : forte activité de la TG2 dans l'interstitium rénal, **b** Souris TG2(-/-) ayant reçu le traitement avec l'AngII pendant 28 jours : pas d'activité de la TG2, et **c** Souris TG2(+/+) sans traitement d'AngII : peu d'activité de la TG2. Excitation à 972 nm, 25 mW (a, c) et 32 mW (b), barre d'échelle : 50 μ m. Temps d'acquisition : 12.9 s (a), 10.8 s (b et c). **A** - artère, **G** - glomérule, **T** - tubule rénal.

pixels SHG déterminées pour les trois groupes de souris. Nous avons obtenu un rapport de 2.3

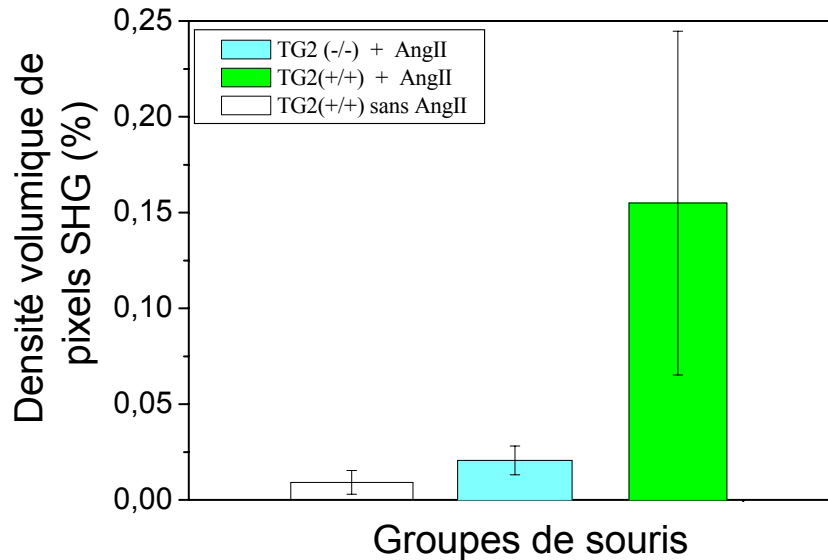


FIG. 4.32 – **Quantification de la fibrose rénale.** Valeurs moyennes de densité volumique de pixels SHG déterminées avec un seuil de 4 photons/pixel pour des reins fixés de souris TG2(+/+) sans Ang II (souris témoins) et des souris TG2(+/+) et TG2(-/-) traitées avec l'AngII pendant 28 jours (statistique sur 2 souris dans le premier groupe et 6 dans les deux derniers groupes). Taille du volume sondé : $8.2 \cdot 10^{-2} \text{ mm}^3$. Excitation à 860 nm. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard.

entre les souris TG2(-/-)+AngII et les souris TG2(+/+) sans AngII, de 7.5 entre les souris TG2(+/+)+AngII et les souris TG2(-/-)+AngII dû à la déficience du gène TG2 en présence d'Ang II et de 16.9 entre les souris TG2(+/+)+AngII et les souris TG2(+/+) sans AngII dû à l'effet de l'Ang II chez les souris TG2 (+/+). Ces résultats encore préliminaires, car la statistique n'est pas suffisante, montrent que la densité volumique de pixels SHG, donc la densité de fibres de collagène I dans le groupe de souris déficientes en TG2 est significativement plus faible que dans le groupe de souris sauvages traitées avec AngII. Nous avons récemment confirmé ces résultats dans le cadre d'un autre étude, sur des mâles sauvages et déficients en TG2, qui traite à la fois la progression de la fibrose rénale et son éventuelle régression spontanée sur des souris sacrifiées à J70. Comme le montre le graphe ci-dessus, la barre d'erreur pour les souris TG2(+/+) traitées par AngII (souris fibrosées) indique une grande variabilité de la gravité du processus fibrosant chez les différentes souris et soulève plusieurs questions :

- cette variabilité est-elle liée à une variabilité interindividuelle ? (différence de réponse physiologique selon les individus)
- cette variabilité est-elle liée au modèle de fibrose rénale hypertensive induite par AngII ?
- d'autres facteurs pourraient-ils jouer un rôle ? (tels que la variabilité du fond génétique, ...)
- la taille du volume sondé est-elle suffisante pour révéler la fibrose ?

Ces différents aspects sont en cours d'investigation au laboratoire, mais ne seront pas abordés dans ce manuscrit.

L'ensemble de ces résultats (cartographie de l'activité de la transglutaminase tissulaire TG2 associée au fait que les souris déficientes en TG2 sont beaucoup moins fibrosées) suggère que la TG2 est impliquée dans l'assemblage des fibres de collagène I dans le rein.

Identification de cellules rénales responsables de la synthèse du collagène I in vivo Afin d'identifier les cellules responsables de la synthèse du collagène I *in vivo* dans le rein, nous avons utilisé

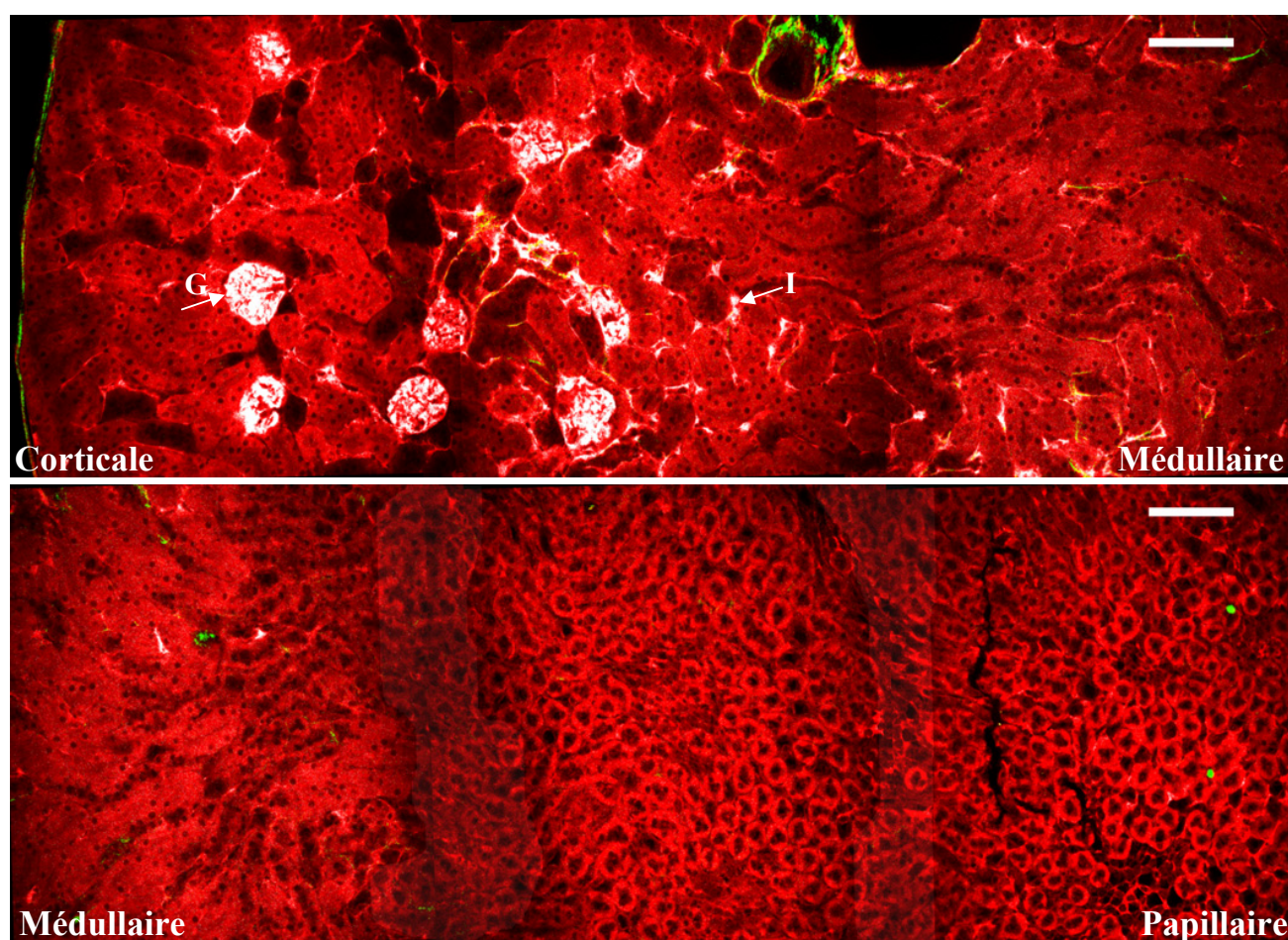


FIG. 4.33 – Cartographie de cellules qui synthétisent le collagène de type I. La fluorescence endogène est représentée en rouge, le signal SHG du collagène fibrillaire en vert et le signal 2PEF exogène de la eGFP en blanc. Le collagène de type I est produit dans les glomérules (flèche **G**) et par les cellules de l'interstitium péri-tubulaire (flèche **I**), dans les régions corticale et médullaire. Excitation à 860 nm, puissance 6 mW pour exciter la eGFP et 28 mW pour exciter la fluorescence endogène et le signal SHG. Barre d'échelle : 100 μ m. Temps d'acquisition total : 46.1 s/image.

des souris transgéniques exprimant la protéine fluorescente eGFP sous le contrôle du promoteur de la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type I. Cette protéine s'exprime donc dans les cellules où il y a une synthèse du collagène de type I. Les souris ont reçu le traitement avec l'AngII pendant 28 jours, puis les reins excisés ont été fixés avec de la formaldéhyde à 4 % (voir la préparation des échantillons). Des coupes coronales de tissu ont été ensuite réalisées (le même type de coupe que pour la Fig. 4.29) à l'aide d'un vibratome, puis visualisées par microscopie multiphoton. Dans ces expériences, nous avons utilisé une longueur d'onde d'excitation de 860 nm, qui permet d'exciter à la fois les deux signaux endogènes (2PEF et SHG) et le signal exogène (2PEF de la eGFP). Puisque l'émission de la eGFP est située dans la même gamme de longueurs d'onde que celle de la fluorescence endogène, ces signaux ne peuvent pas être séparés spectralement. Pour exciter seulement la eGFP et pas du tout la fluorescence endogène, nous avons utilisé une puissance d'excitation minimale (6 mW).

La Fig. 4.33 présente deux images multiphoton qui combinent le signal de fluorescence endogène (rouge) avec le signal SHG du collagène fibrillaire (vert) et celui de la eGFP (blanc). Elles cartographient la distribution des sites de synthèse du collagène de type I sur une coupe coronale de tissu rénal fibrosé à J28. Ces images indiquent que la synthèse du collagène I est localisée dans les glomérules rénaux, ainsi que dans les cellules de l'interstitium péritubulaire. Mais puisqu'il n'y a pas de signal SHG dans les glomérules, ceci implique que le collagène de type I est présent sous forme de molécules de procollagène dans les cellules glomérulaires ou sous forme de molécules de collagène non assemblées en fibrilles dans l'espace extracellulaire glomérulaire. Il est ainsi possible que les cellules glomérulaires disposent d'un équipement enzymatique différent de celui de cellules tubulaires et interstitielles, ne favorisant pas l'assemblage du collagène I en fibrilles. D'autre part il est aussi envisageable que les collagénases (enzymes de dégradation du collagène) soient particulièrement efficace dans les glomérules par rapport à l'interstitium péritubulaire.

Les résultats obtenus pour les expériences de mise en évidence des cellules en prolifération dans le rein sont présentés sur la Fig. 4.34. L'identification de ces cellules repose sur un marquage persistant par la bromodésoxyuridine (BrdU administrée *in vivo* chez la souris pendant 28 jours) qui caractérise des cellules à renouvellement lent. Les cellules porteuses de BrdU sont reconnues à l'aide d'un anticorps fluorescent anti-BrdU couplé à la FITC. Les signaux ont été acquis de la même façon que pour les expériences précédentes pour une longueur d'onde d'excitation de 760 nm. Nous avons représenté en rouge le signal de 2PEF endogène, en vert le signal SHG et en magenta le signal 2PEF exogène créé par l'anticorps anti-BrdU couplé à la FITC. Comme le montrent ces images, les cellules en prolifération sont les cellules épithéliales tubulaires. Ainsi il est possible que les fibroblastes du tissu interstitiel, qui sont les premiers responsables de l'accumulation de matrice extracellulaire, proviennent en grande partie de la transdifférenciation de ces cellules épithéliales tubulaires qui, leur nouveau phénotype acquis, migrent dans l'interstitium à travers la membrane basale tubulaire. Il reste cependant à déterminer quel type de cellules tubulaires est à l'origine de cette transdifférenciation.

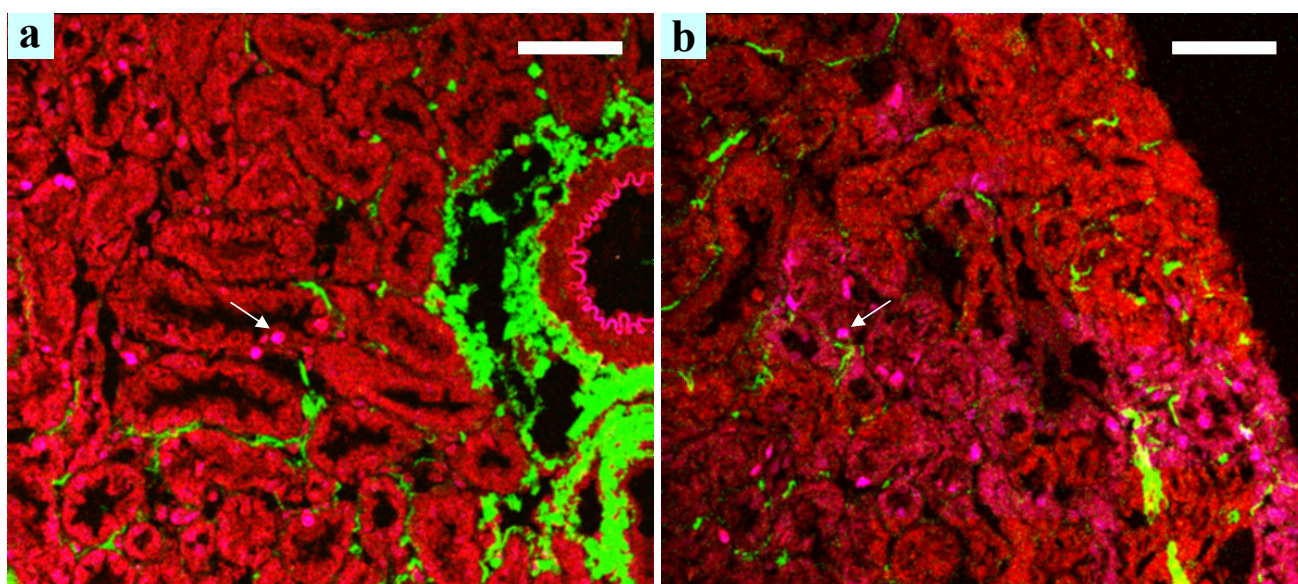


FIG. 4.34 – **Révélation de cellules en prolifération chez les souris fibrosées.** La fluorescence endogène est représentée en rouge, le signal SHG du collagène fibrillaire en vert et le signal 2PEF exogène de l'anticorps anti-BrdU couplé à la FITC en magenta. Ces images indiquent que les cellules en prolifération sont les cellules de l'épithélium tubulaire (flèches). Excitation à 760 nm, puissance 6 mW pour exciter la FITC et 26 mW pour exciter la fluorescence endogène et le signal SHG. Barre d'échelle : 50 μm . Temps d'acquisition : 4.7 s/image

4.4.3 Conclusions et perspectives

Nous avons démontré dans cette étude que la microscopie multiphoton permet de visualiser la morphologie du tissu rénal grâce aux signaux de fluorescence endogène de cellules et de la matrice extracellulaire rénale et au signal SHG du collagène fibrillaire de type I qui est présent dans un rein sain seulement au niveau de la capsule rénale, l'adventice artérielle, les artères, les calices rénaux mineurs et majeurs, le bassin et l'uretère. D'autre part, la microscopie multiphoton nous a permis d'étudier les sites préférentiels d'accumulation pathologique du collagène fibrillaire dans un modèle de fibrose rénale induite par administration d'angiotensine II chez la souris. Nous avons tout d'abord confirmé, sur coupe histologique, par immunohistochimie anti-collagène I et anti-collagène IV que dans le rein, le signal SHG est spécifique du collagène fibrillaire de type I et que la distribution de ces deux molécules est très différente : le collagène de type I s'accumule dans l'interstitium rénal, autour de la capsule glomérulaire, dans l'adventice artérielle et dans l'interstitium périvasculaire, alors que le collagène de type IV est présent dans les membranes basales tubulaire et glomérulaire. Ensuite, sur coupe longitudinale épaisse de tissu nous avons mis en évidence par microscopie SHG une fibrose interstitielle dans la région corticale et à une plus grande échelle, sur coupes coronales de tissu, nous avons observé que la fibrose rénale a

une distribution hétérogène dans les régions corticale et médullaire avec une plus grande densité de fibres de collagène dans la région cortico-médullaire.

L'inhomogénéité de la fibrose rénale soulève plusieurs questions concernant les facteurs qui en sont responsables. L'utilisation de souris déficientes en transglutaminase 2 nous a permis d'apprécier le rôle de cette enzyme dans l'assemblage de fibres de collagène au cours de la fibrose. La cartographie de l'activité de cette enzyme associée à la quantification du signal SHG sur coupes coronales de tissu fibrosé chez des souris sauvages et déficientes en TG2 montrent que la TG2 joue un rôle dans la constitution de la fibrose interstitielle, les souris déficientes en TG2 étant moins fibrosées. D'autre part, il semblerait que l'AngII stimule l'activité de la TG2 mais cette hypothèse doit être vérifiée par comparaison de l'activité TG2 chez des souris fibrosées à J0 (jour 0), J3, J7, J28 et J66 et par mesure de l'activité TG2 dans des cultures cellulaires traitées par l'AngII.

Nous avons aussi montré que les cellules responsables de la synthèse du collagène I *in vivo* au cours de la fibrose rénale sont situées dans les glomérules et dans l'interstitium péritubulaire. Compte tenu de la cartographie de cellules en prolifération (cellule épithéliales tubulaires) il est possible que les cellules responsables de la synthèse du collagène I proviennent en grande partie de la transdifférenciation de cellules de l'épithélium tubulaire.

D'autres expériences doivent être menées afin de rechercher les mécanismes physiopathologiques responsables de la fibrose rénale et de vérifier si la TG2 constitue une cible thérapeutique dans la fibrose rénale en utilisant un inhibiteur spécifique de l'activité TG2 extracellulaire. Actuellement nous menons des études sur des souris sauvages et déficientes en TG2, fibrosées et témoins. La moitié des souris sont sacrifiées à J28 et l'autre moitié des souris sont surveillées encore 38 jours supplémentaires et sacrifiées à J66 afin d'analyser l'importance de la restauration spontanée et sous inhibiteurs de la TG2 de la fonction rénale. Nous espérons que ces expériences vont apporter une avancée significative pour l'étude du remodelage de la matrice extracellulaire *in vivo*, applicable à nombre de questions physiopathologiques.

4.5 Conclusion

Nous avons présenté dans ce chapitre une nouvelle méthodologie, basée sur l'utilisation de signaux endogènes de fluorescence excitée à 2 photons et de génération de seconde harmonique, pour l'étude de fibroses pulmonaire et rénale. Nous avons démontré que la microscopie multiphoton peut mettre en évidence toutes les caractéristiques de ces pathologies et qu'elle permet de sonder séparément les processus inflammatoire et fibrosant. Le caractère quantitatif du signal SHG créé par le collagène fibrillaire nous a permis de proposer des scores de fibrose basés sur des densités volumiques de pixels SHG, qui se sont avérés très sensibles dans la région sous-pleurale du poumon. Dans le rein, bien que ces scores nous aient permis d'apprécier le rôle de certains facteurs dans l'évolution de la fibrose rénale, il n'a pas été possible de mettre en évidence une telle sensibilité. La variabilité de la sévérité de la fibrose rénale, due soit au modèle de fibrose

rénale hypertensive induite par AngII soit à d'autres facteurs, pourrait être la cause d'une telle difficulté et d'autres études doivent être menées pour éclaircir ce point. Néanmoins, nous avons montré que la microscopie multiphoton permet d'évaluer quantitativement le remodelage de la matrice extracellulaire dans le rein comme dans le poumon. Cette méthodologie pourrait être facilement généralisée à d'autres organes, et en association avec des techniques complémentaires nous espérons qu'elle permettra le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

Conclusion

Au cours de ce travail de thèse, à l'interface entre l'optique et la biologie, nous avons vu qu'il est important de bien analyser les contrastes optiques non-linéaires endogènes observés dans les tissus afin de développer des outils d'imagerie pertinents, applicables à des problématiques d'intérêt médical telles que les fibroses pulmonaires et rénales.

Nous avons tout d'abord démontré les potentialités de la microscopie multiphoton pour l'imagerie des artères et de la peau, liées au maintien d'une résolution micrométrique en milieu diffusant, à sa faible invasivité et à la grande spécificité des signaux endogènes. Ceci nous a permis d'identifier les problèmes physiques soulevés par les signaux optiques non-linéaires, observés dans les tissus, notamment ceux créés par le collagène et la kératine. Sur ce dernier point, nous avons effectué une étude de caractérisation spectroscopique de la kératine de l'épiderme humain *in vitro* sur protéine purifiée et *in situ* sur des biopsies de peau humaine. Cette étude, nécessaire pour la compréhension des signaux observés en imagerie multiphoton, nous a permis de déterminer la signature spectroscopique de la kératine sur peau saine, étape indispensable si on veut suivre ses modifications liées à diverses pathologies telles que les tumeurs.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la spécificité du signal de seconde harmonique en fonction du type de collagène et le rôle de sa structure chirale en triple hélice dans la forte amplitude des signaux observés. Pour cela, nous avons mené des expériences de dichroïsme circulaire conventionnel et de génération de seconde harmonique en surface résolue en polarisation sur des films de molécules de collagène fibrillaire de type I et de collagène non fibrillaire de type IV. Nous avons montré que les composantes chirales exaltent le signal SHG du collagène de type I d'un facteur 2 seulement qui n'est pas suffisant pour expliquer les forts signaux SHG observés en microscopie.

Ces expériences démontrent qu'au niveau macroscopique l'efficacité de génération de seconde harmonique par le collagène de type I est dominée par des effets cohérents au niveau de l'organisation très dense et quasi-cristalline des fibrilles de collagène bien alignées. Inversement, l'absence d'un alignement des domaines collagéniques lors de l'assemblage des molécules de collagène de type IV explique l'absence du signal SHG au niveau macroscopique pour ce type de collagène, bien que les expériences de SHG en surface aient montré qu'au niveau microscopique chaque molécule possède une hyperpolarisabilité non nulle et du même ordre de grandeur que celle du collagène de type I.

L'ensemble de nos mesures montre que la microscopie par génération de seconde harmonique

est une sonde de l'organisation macromoléculaire du collagène dans les tissus, plutôt qu'une sonde du type de collagène. Ces expériences ont été confirmées par immunohistochimie (anti-collagène I et anti-collagène IV) lors de l'étude de la fibrose rénale.

Finalement, nous avons appliqué ces résultats à l'étude de fibroses rénale et pulmonaire. Nous avons démontré que la microscopie multiphoton permet de visualiser la morphologie de ces tissus, de mettre en évidence toutes les caractéristiques de ces pathologies et d'évaluer quantitativement le remodelage de la matrice extracellulaire au cours de l'évolution de la fibrose.

Nous avons proposé des scores de fibrose basés sur des densités volumiques de pixels SHG, qui se sont avérés très sensibles dans la région sous-pleurale du poumon et qui nous ont permis d'apprécier le rôle de certains facteurs dans l'évolution de la fibrose rénale.

Pour la suite de ce travail, nous prévoyons d'autres études visant à déterminer les cellules ou les médiateurs responsables de la fibrose. Les méthodes que nous développons permettront de mesurer le remodelage de la matrice extracellulaire lors de l'administration d'inhibiteurs potentiels à différents stades de gravité. En particulier, nous essaierons de déterminer si les processus fibrosants sont réversibles et le *restitutio ad integrum* de l'architecture de la matrice collagénique possible.

En conclusion, nous avons démontré qu'à l'inverse des techniques conventionnelles qui ne permettent pas de sonder un tissu en volume et par conséquent ne peuvent pas révéler la distribution tridimensionnelle du collagène, encore moins de façon quantitative, la microscopie SHG est une sonde structurelle du collagène. De ce fait, ce type de microscopie est un outil adapté à l'étude *in situ* du remodelage de la matrice extracellulaire à l'échelle micrométrique. Cette méthodologie pourrait être facilement généralisée à d'autres organes, et en association avec des techniques complémentaires elle permettra le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Ainsi, nous espérons que la microscopie multiphoton deviendra un outil de choix pour l'imagerie des tissus épais et pour des études *in vivo* sur le petit animal.

Bibliographie

- [Adamson, 1984] ADAMSON, I. Y.(1984). *Drug-induced pulmonary fibrosis*. **Environ. Health Perspect.**, **55**, pp. 25–36.
- [Akhmanov and Zharikov, 1967] AKHMANOV, S. A. AND ZHARIKOV, V. I.(1967). *Nonlinear optics in gyrotropic media*. **JETP Lett.**, **6**, pp. 137–140.
- [Alberts et al., 1994] ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., AND WATSON, J. D.(1994). **Molecular biology of the cell**. Garland Publishing, New-York and London.
- [ATS/ERS, 2000] ATS/ERS(2000). *Idiopathic pulmonary fibrosis : diagnosis and treatment. international consensus treatment. american thoracic society (ATS), and the european respiratory society (ERS)*. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, **161**, pp. 646–664.
- [Barad et al., 1997] BARAD, Y., EISENBERG, H., HOROWITZ, M., AND SILBERBERG, Y.(1997). *Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation*. **Appl. Phys. Lett.**, **70**, pp. 922–924.
- [Barron, 1982] BARRON, L. D.(1982). **Molecular light scattering and optical activity**. Cambridge University Press.
- [Barzda et al., 2005] BARZDA, V., GREENHALGH, C., AUS DER AU, J., ELMORE, S., VAN BEEK, J., AND SQUIER, J.(2005). *Visualization of mitochondria in cardiomyocytes by simultaneous harmonic generation and fluorescence microscopy*. **Opt. Express**, **13**, pp. 8263–8276.
- [Bateman et al., 1996] BATEMAN, J. F., LAMANDÉ, S. R., AND RAMSHAW, J. A. M.(1996). *Collagen superfamily*. In COMPER, W. D., editor, **Extracellular matrix : Molecular components and Interactions**, **2**. Harwood Academic Publisher, Amsterdam.
- [Belkin et al., 2001] BELKIN, M. A., HAN, S. H., WEI, X., AND SHEN, Y. R.(2001). *Sum-frequency generation in chiral liquids near electronic resonance*. **Phys. Rev. Lett.**, **87**(11), pp. 113001–113003.

- [Bhatnagar and Gough, 1996] BHATNAGAR, R. AND GOUGH, C.(1996). *Circular dichroism of collagen and related polypeptides*. In FASMAN, G., editor, **Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules**, 6, pp. 183–199. Plenum Press, New York.
- [Billinton and Knight, 2001] BILLINTON, N. AND KNIGHT, A. W.(2001). *Seeing the wood through the trees : A review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence*. **Anal. Biochem.**, **291**, p. 175–197.
- [Boffa et al., 2003] BOFFA, J. J., LU, Y., S., P., STEFANSKI, A., DUSSAULE, J. C., AND CHATZIANTONIOU, C.(2003). *Regression of renal vascular and glomerular fibrosis : role of angiotensin II receptor antagonism and matrix metalloproteinases*. **J. Am. Soc. Nephrol.**, **14**(5), p. 1132–1144.
- [Boffa et al., 1999] BOFFA, J.-J., THARAUX, P.-L., PLACIER, S., ARDAILLOU, R., DUSSAULE, J.-C., AND CHATZIANTONIOU, C.(1999). *Angiotensin II activates collagen type I gene in the renal vasculature of transgenic mice during inhibition of nitric oxide synthesis*. **Circulation**, **100**, p. 1901–1908.
- [Born and Wolf, 1980] BORN, M. AND WOLF, E.(1980). **Principles of optics**. Cambridge University press.
- [Both et al., 2004] BOTH, M., VOGEL, M., FRIEDRICH, O., VON WEGNER, F., KÜNSTING, T., FINK, R. H. A., AND UTTENWEILER, D.(2004). *Second harmonic imaging of intrinsic signals in muscle fibers in situ*. **J. Biomed. Optics**, **9**(5), pp. 882–892.
- [Boulesteix, 2004] BOULESTEIX, T.(2004). **Microscopie non linéaire : chiralité et génération de second harmonique**. PhD thesis, Université PARIS XI Orsay.
- [Boulesteix et al., 2004] BOULESTEIX, T., BEAUREPAIRE, E., SAUVIAT, M.-P., AND SCHANNE-KLEIN, M.(2004). *Second harmonic microscopy of unstained living cardiac myocytes : measurements of sarcomere length with 20 nm accuracy*. **Optics Lett.**, **29**(17), pp. 2031–2033.
- [Boulesteix et al., 2006] BOULESTEIX, T., PENA, A., PAGÈS, N., GODEAU, G., SAUVIAT, M.-P., BEAUREPAIRE, E., AND SCHANNE-KLEIN, M.(2006). *Micrometer scale ex vivo multiphoton imaging of unstained arterial wall structure*. **Cytometry**, **69A**(1), pp. 20–26.
- [Boyd et al., 1986] BOYD, G. T., SHEN, Y. R., AND HANSCH, T. W.(1986). *Continuous-wave second-harmonic generation as a surface microprobe*. **Opt. Lett.**, **11**(2), pp. 97–99.
- [Boyd, 2003] BOYD, R.(2003). **Nonlinear optics**. Academic press, London.
- [Brown et al., 2003] BROWN, E., MCKEE, T., DITOMASO, E., PLUEN, A., SEED, B., BOUCHER, Y., AND JAIN, R.(2003). *Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumors in vivo using second-harmonic generation*. **Nat. Med.**, **9**(6), pp. 796–800.

- [Buehler et al., 2005] BUEHLER, C., KIM, K., GREUTER, U., SCHLUMPF, N., AND SO, P.(2005). *Single-photon counting multicolor multiphoton fluorescence microscope*. **J. Fluorescence**, **15**(1), pp. 41–51.
- [Byers et al., 1994] BYERS, J. D., YEE, H. I., AND HICKS, J. M.(1994). *A second harmonic generation analog of optical rotatory dispersion for the study of chiral monolayers*. **J. Chem. Phys.**, **101**, pp. 6233–6241.
- [Campagnola et al., 2002] CAMPAGNOLA, P. J., MILLARD, A. C., TERASAKI, M., HOPPE, P. E., MALONE, C. J., AND MOHLER, W.(2002). *Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues*. **Biophys. J.**, **82**, pp. 493–508.
- [Chance et al., 1962] CHANCE, B., COHEN, P., JOBSIS, F., AND SCHOENER, B.(1962). *Intracellular oxidation-reduction states in vivo*. **Science**, **137**, pp. 499–508.
- [Chapman, 2004] CHAPMAN, H.(2004). *Disorders of lung matrix remodeling*. **J. Clin. Invest.**, **113**(2), pp. 148–157.
- [Cheng and Xie, 2002] CHENG, J. X. AND XIE, X. S.(2002). *Green’s function formulation for third harmonic generation microscopy*. **J. Opt. Soc. Am. B**, **19**(7), pp. 1604–1610.
- [Chu et al., 2003] CHU, S.-W., CHEN, I.-S., TSAI, T.-H., LIU, T.-M., LIN, C.-Y., TSAI, H.-J., AND SUN, C.-K.(2003). *In vivo developmental biology study using noninvasive multi-harmonic generation microscopy*. **Opt. Express**, **11**, pp. 3093–3099.
- [Cox et al., 2003] COX, G., KABLE, E., JONES, A., FRASER, I., MARCONI, K., AND GORRELL, M.(2003). *3-dimensional imaging of collagen using second harmonic generation*. **J. Struct. Biol.**, **141**, pp. 53–62.
- [Cox et al., 2005] COX, G., MORENO, N., AND FEIJO, J.(2005). *Second harmonic imaging of plant polysaccharides*. **J. Biomed. Opt.**, **10**(2), p. 024013.
- [Débarre et al., 2005] DÉBARRE, D., SUPATTO, W., AND BEAUREPAIRE, E.(2005). *Structure sensitivity in third-harmonic generation microscopy*. **Opt. Lett.**, **30**(16), pp. 2134–2136.
- [Débarre et al., 2006] DÉBARRE, D., SUPPATO, W., PENA, A., FABRE, A., TORDJMAN, T., COMBETTES, L., SCHANNE-KLEIN, M., AND BEAUREPAIRE, E.(2006). *Imaging the distribution and transport dynamics of lipid bodies in unstained cells and tissues using third harmonic generation microscopy*. **Nat. Methods**, **3**(1), pp. 47–53.
- [Denk et al., 1990] DENK, W., STRICKLER, J., AND WEBB, W.(1990). *Two-photon laser scanning microscopy*. **Science**, **248**, pp. 73–76.
- [Deyl et al., 1980] DEYL, Z., MACEK, K., ADAM, M., AND VANCIKOVA(1980). *Studies on the chemical nature of elastin fluorescence*. **Biochim. Biophys. Acta**, **625**, pp. 248–254.

- [Dombeck et al., 2003] DOMBECK, D., KASISCHKE, K., VISHWASRAO, H., INGELSSON, M., HYMAN, B., AND WEBB, W.(2003). *Uniform polarity microtubule assemblies imaged in native brain tissue by second-harmonic generation microscopy*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **100**(12), pp. 7081–7086.
- [Duncan et al., 1982] DUNCAN, M. D., REINTJES, J., AND MANUCCIA, T. J.(1982). *Scanning coherent anti-stokes raman microscope*. **Opt. Lett.**, **7**, pp. 350–352.
- [Dunn et al., 2000] DUNN, A., WALLACE, V., COLENO, M., BERNIS, M., AND TROMBERG, B.(2000). *Influence of optical properties on two-photon fluorescence imaging in turbid samples*. **Appl. Opt.**, **39**(7), pp. 1194–1201.
- [Eichner and Kahn, 1990] EICHNER, R. AND KAHN, M.(1990). *Differential extraction of keratin subunits and filaments from normal human epidermis*. **J. Cell Biol.**, **110**, pp. 1149–1158.
- [Eyre et al., 1984] EYRE, D. R., PAZ, M. A., AND GALLOP, P. M.(1984). *Cross-linking in collagen and elastin*. **Annu. Rev. Biochem.**, **53**, pp. 717–748.
- [Flint et al., 1975] FLINT, M. H., LYONS, M. F., MEANEY, M. F., AND WILLIAMS, D. E.(1975). *The masson staining of collagen - an explanation of an apparent paradox*. **Histochem. J.**, **7**, pp. 529–546.
- [Freund and Deutsch, 1986] FREUND, I. AND DEUTSCH, M.(1986). *Second-harmonic microscopy of biological tissue*. **Optics Lett.**, **11**, pp. 94–96.
- [Freund et al., 1986] FREUND, I., DEUTSCH, M., AND SPRECHER, A.(1986). *Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation and small-angle scattering in rat-tail tendon*. **Biophys. J.**, **50**, pp. 693–712.
- [Furutani et al., 2001] FURUTANI, Y., KATO, A., NOTOYA, M., GHONEIM, M. A., , AND HIROSE, S.(2001). *A simple assay and histochemical localization of transglutaminase activity using a derivative of green fluorescent protein as substrate*. **J. Histochem. Cytochem.**, **49**, pp. 247–258.
- [Gelse et al., 2003] GELSE, K., PÖSCHL, E., AND AIGNER, T.(2003). *Collagens : structure, function, and biosynthesis*. **Advanced Drug Delivery Reviews**, **55**, pp. 1531–1546.
- [Giordmaine, 1965] GIORDMAINE, G. A.(1965). *The nonlinear optical properties of liquids*. **Phys. Rev.**, **138**, pp. A1599–A1606.
- [Godeau et al., 1986] GODEAU, G., GONNORD, G., AND JOLIVET, O.(1986). *A selective method for the quantitative estimation of elastin fibers*. **Analyt. Quant. Cytol.**, **4**, pp. 321–325.
- [Göppert-Mayer, 1931] GÖPPERT-MAYER, M.(1931). *Über elementarakte mit zwei quantensprüngen*. **Ann. Phys.**, **9**, pp. 273–294.

- [Guo et al., 1997] GUO, Y., HO, P., SAVAGE, H., HARRIS, D., SACKS, P., SCHANTZ, S., LIU, F., ZHADIN, N., AND ALFANO, R.(1997). *Second-harmonic tomography of tissues*. **Opt. Lett.**, **22**, pp. 1323–1325.
- [Hache et al., 2003] HACHE, F., BOULESTEIX, T., SCHANNE-KLEIN, M.-C., ALEXANDRE, M., LEMERCIER, G., AND ANDRAUD, C.(2003). *Polarization rotation in a second harmonic reflection experiment from an isotropic surface of chiral tröger base*. **J. Phys. Chem. B**, **107(22)**, pp. 5261–5266.
- [Hache et al., 2001] HACHE, F., MESNIL, H., AND SCHANNE-KLEIN, M.-C.(2001). *Application of classical models of chirality to surface second harmonic generation*. **J. Chem. Phys.**, **115**, pp. 6707–6715.
- [Han et al., 2005] HAN, M., GIESE, G., AND BILLE, J. F.(2005). *Second harmonic generation imaging of collagen fibrils in cornea and sclera*. **Opt. Express**, **13(15)**, pp. 5791–5797.
- [Heinz, 1991] HEINZ, T.(1991). *Second-order nonlinear optical effects at surfaces and interfaces*. In STEGEMAN, H. P. AND G.I., editors, **Nonlinear surface electromagnetic phenomena**, **5**, pp. 353–415. Elsevier, Amsterdam.
- [Heinz et al., 1982] HEINZ, T. F., CHEN, C. K., RICARD, D., AND SHEN, Y. R.(1982). *Spectroscopy of molecular monolayers by resonant second-harmonic generation*. **Phys. Rev. Lett.**, **48(7)**, pp. 478–481.
- [Heinz et al., 1985] HEINZ, T. F., LOY, M. M. T., AND THOMPSON, W. A.(1985). *Study of Si(111) surfaces by optical second-harmonic generation : Reconstruction and surface phase transformation*. **Phys. Rev. Lett.**, **54(1)**, pp. 63–66.
- [Heinz et al., 1983] HEINZ, T. F., TOM, H. W. K., AND SHEN, Y. R.(1983). *Determination of molecular orientation of monolayer adsorbates by optical second-harmonic generation*. **Phys. Rev. A**, **28(3)**, pp. 1883–1885.
- [Holmes et al., 2001] HOLMES, D., GRAHAM, H., TROTTER, J., AND KADLER, K.(2001). *Stem/tem studies of collagen fibril assembly*. **Micron**, **32**, pp. 273–285.
- [Huang et al., 2002] HUANG, S., HEIKAL, A. A., AND WEBB, W. W.(2002). *Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein*. **Biophys. J.**, **82**, pp. 2811–2825.
- [Hudson et al., 1993] HUDSON, B. G., REEDERS, S. T., AND TRYGGVASON, K.(1993). *Type IV collagen : structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis*. **J. Biol. Chem.**, **268**, pp. 26033–26036.
- [Hulmes, 2002] HULMES, D. J. S.(2002). *Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures*. **J. Struct. Biol.**, **137**, pp. 2–10.

- [Hunt et al., 1987] HUNT, J. H., GUYOT-SIONNEST, P., AND SHEN, Y. R.(1987). *Observation of C-H stretch vibrations of monolayers of molecules optical sum-frequency generation*. **Chem. Phys. Lett.**, **133**, pp. 189–192.
- [Iwai et al., 2001] IWAI, H., LINGEL, A., AND PLÜCKTHUN, A.(2001). *Cyclic green fluorescent protein produced in vivo using an artificially split PI-PfuI intein from pyrococcus furiosus*. **J. Biol. Chem.**, **276**, pp. 16548–16554.
- [Izbicki et al., 2002] IZBICKI, G., SEGEL, M., CHRISTENSEN, T., CONNER, M., AND BREUER, R.(2002). *Time course of bleomycin-induced lung fibrosis*. **International journal of experimental pathology**, **86**(5), pp. 279–288.
- [Jackson, 1975] JACKSON, J. D.(1975). **Classical Electrodynamics**. Wiley, New York.
- [Johnson et al., 1992] JOHNSON, R. J., ALPERS, C. E., YOSHIMURA, A., LOMBARDI, D., PRITZL, P., FLOEGE, J., AND SCHWARTZ, S. M.(1992). *Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension*. **Hypertension**, **19**(5), pp. 464–474.
- [Johnson et al., 2003] JOHNSON, T. S., EL-KORAIE, A. F., SKILL, N. J., BADDOUR, N. M., EL NAHAS, A. M., NJLOMA, M., ADAM, A. G., AND GRIFFIN, M.(2003). *Tissue transglutaminase and the progression of human renal scarring*. **J. Am. Soc. Nephrol.**, **14**(8), pp. 2052–2062.
- [Junqueira et al., 1979] JUNQUEIRA, L., BIGNOLAS, G., AND BRENTANI, R.(1979). *Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections*. **Histochem. J.**, **11**, pp. 447–455.
- [Kagami et al., 1994] KAGAMI, S., BORDER, W. A., MILLER, D. E., AND NOBLE, N. A.(1994). *Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells*. **J. Clin. Invest.**, **93**, pp. 2431–2437.
- [Kalluri and Neilson, 2003] KALLURI, R. AND NEILSON, E. G.(2003). *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. **J. Clin. Invest.**, **112**, p. 1776–1784.
- [Kauranen et al., 1994] KAURANEN, M., VAN ELSHOCHT, S., MAKI, J. J., AND PERSOONS, A.(1994). *Second-harmonic generation from chiral surfaces*. **J. Chem. Phys.**, **101**, pp. 8193–8199.
- [Keene et al., 1987] KEENE, D. R., SAKAI, L. Y., LUNSTRUM, G. P., MORRIS, N. P., AND BURGESSON, R. E.(1987). *Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils*. **J. Cell Biol.**, **104**(3), pp. 611–621.
- [König and Riemann, 2003] KÖNIG, K. AND RIEMANN, I.(2003). *High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution*. **J. Biomed. Opt.**, **8**(3), pp. 432–439.

- [Lanir et al., 1984] LANIR, Y., WALSH, J., AND SOUTAS-LITTLE, R. W.(1984). *Histological staining as a measure of stress in collagen fibers*. **J. Biomech. Eng.**, **106**(2), pp. 174–176.
- [Larson et al., 2003] LARSON, D. R., ZIPFEL, W. R., WILLIAMS, R. M., CLARK, S. W., BRUCHEZ, M. P., WISE, F. W., AND WEBB, W. W.(2003). *Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo*. **Science**, **300**(5624), pp. 1434–1436.
- [Lichtman and Conchello, 2005] LICHTMAN, J. W. AND CONCHELLO, J. A.(2005). *Fluorescence microscopy*. **Nat. Methods**, **2**(12), pp. 910–919.
- [Lorand and Graham, 2003] LORAND, L. AND GRAHAM, R. M.(2003). *Transglutaminases : crosslinking enzymes with pleiotropic functions*. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, **4**(2), pp. 140–156.
- [Magness et al., 2004] MAGNESS, S. T., BATALLER, R., YANG, L., AND BRENNER, D. A.(2004). *A dual reporter gene transgenic mouse demonstrates heterogeneity in hepatic fibrogenic cell populations*. **Hepatology**, **40**(5), pp. 1151–1159.
- [Majumber et al., 2005] MAJUMBER, S. K., GHOSH, N., AND GUPTA, P. K.(2005). *N₂ laser excited autofluorescence spectroscopy of formalin-fixed human breast tissue*. **J. Photochem. Photobiol. B**, **81**, pp. 33–42.
- [Maki et al., 1995] MAKI, J. J., KAURANEN, M., AND PERSOONS, A.(1995). *Surface second-harmonic generation from chiral materials*. **Phys. Rev. B**, **51**(3), pp. 1425–1434.
- [Maki et al., 1997] MAKI, J. J., KAURANEN, M., VERBIEST, T., AND PERSOONS, A.(1997). *Uniqueness of waveplate measurements in determining the tensor components of second-order surface nonlinearities*. **Phys. Rev. B**, **55**(8), pp. 5021–5026.
- [Maki et al., 1996] MAKI, J. J., VERBIEST, T., KAURANEN, M., ELSHOCHT, S. V., AND PERSOONS, A.(1996). *Comparison of linearly and circularly polarized probes of second-order optical activity of chiral surfaces*. **J. Chem. Phys.**, **105**, pp. 767–772.
- [Masters et al., 1997] MASTERS, B. R., SO, P. T. C., AND GRATTON, E.(1997). *Multiphoton excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of in vivo human skin*. **Biophys. J.**, **72**, pp. 2405–2412.
- [Mertz and Moreaux, 2001] MERTZ, J. AND MOREAUX, L.(2001). *Second-harmonic generation by focused excitation in inhomogeneously distributed scatterers*. **Optics Commun.**, **196**, pp. 325–330.
- [Mironov and Richter, 2001] MIRONOV, S. L. AND RICHTER, D. W.(2001). *Oscillations and hypoxic changes of mitochondrial variables in neurons of the brainstem respiratory centre of mice*. **J. Physiol.**, **533**, pp. 227–236.

- [Nath, 1990] NATH, K. A.(1990). *Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage*. **Am. J. Kidney Dis.**, **20**, p. 1–17.
- [Neilson, 2006] NEILSON, E. G.(2006). *Mechanisms of disease : fibroblasts — a new look at an old problem*. **Nat. Clin. Pract. Nephrol.**, **2**, pp. 101–108.
- [Oheim et al., 2001] OHEIM, M., BEAUREPAIRE, E., CHAIGNEAU, E., MERTZ, J., AND CHARPAK, S.(2001). *Two-photon microscopy in brain tissue : parameters influencing the imaging depth*. **J. Neurosci. Methods**, **111**, pp. 29–37.
- [Pena et al., 2005a] PENA, A.-M., BOULESTEIX, T., DARTIGALONGUE, T., AND SCHANNE-KLEIN, M.-C.(2005a). *Chiroptical effects in the second harmonic signal of collagens I and IV*. **J. Am. Chem. Soc.**, **127**(29), pp. 10314–10322.
- [Pena et al., 2005b] PENA, A.-M., STRUPLER, M., BOULESTEIX, T., GODEAU, G., AND SCHANNE-KLEIN, M.-C.(2005b). *Spectroscopic analysis of keratin endogenous signal for skin multiphoton microscopy*. **Opt. Express**, **13**(16), pp. 6268–6274; erratum : 13(17)6667.
- [Petralli-Mallow et al., 1993] PETRALLI-MALLOW, T. P., WONG, T. M., BYERS, J. D., YEE, H. I., AND HICKS, J. M.(1993). *Circular dichroism spectroscopy at interfaces : a surface second harmonic generation study*. **J. Phys. Chem.**, **97**, pp. 1383–1388.
- [Plotnikov et al., 2006] PLOTNIKOV, S. V., MILLARD, A. C., CAMPAGNOLA, P. J., AND MOHLER, W. A.(2006). *Characterization of the myosin-based source for second-harmonic generation from muscle sarcomeres*. **Biophys. J.**, **90**, pp. 693–703.
- [Pogue et al., 2001] POGUE, B. W., PITTS, J. D., MYCEK, M. N., SLOBODA, R. D., WILMOT, C. M., BRANDSEMA, J. F., AND O’HARA, J. A.(2001). *In vivo NADH fluorescence monitoring as an assay for cellular damage in photodynamic therapy*. **Photochem. Photobiol.**, **74**(6), pp. 817–824.
- [Polosukhin et al., 2005] POLOSUKHIN, V. V., STATHOPOULOS, G. T., LAWSON, W. E., AND BLACKWELL, T. S.(2005). *Variability of interalveolar septal remodeling after bleomycin treatment in mice*. **Ultrastruct. Pathol.**, **29**(1), pp. 53–64.
- [Richards-Kortum and Sevick-Muraca, 1996] RICHARDS-KORTUM, R. AND SEVICK-MURACA, E.(1996). *Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis*. **Annu. Rev. Phys. Chem.**, **47**, pp. 555–606.
- [Rodger and Nordén, 1997] RODGER, A. AND NORDÉN, B.(1997). **Circular dichroism and linear dichroism**. Oxford University Press.
- [Roth and Freund, 1979] ROTH, S. AND FREUND, I.(1979). *Second-harmonic generation in collagen*. **J. Chem. Phys.**, **70**, pp. 1637–1643.

- [Rousselle et al., 1997] ROUSSELLE, P., KEENE, D. R., RUGGIERO, F. CHAMPLAUD, M. F., VAN DER REST, M., AND BURGESSON, R. E.(1997). *Laminin 5 binds the NC-1 domain of type VII collagen*. **J. Cell Biol.**, **138**(3), pp. 719–728.
- [Sauviat et al., 2005] SAUVIAT, M.-P., BOUVET, S., GODEAU, G., AND PAGÈS, N.(2005). *Electrical activity alterations induced by chronic absorption of lindane (gamma-hexachlorocyclohexane) trace concentrations in adult rat heart*. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **83**(3), pp. 243–251.
- [Sauviat et al., 2002] SAUVIAT, M.-P., COLAS, A., AND PAGÈS, N.(2002). *Does lindane (gamma-hexachlorocyclohexane) increase the rapid delayed rectifier outward K^+ current (I_{Kr}) in frog atrial myocytes?* **BMC Pharmacol.**, **2**, p. 15.
- [Schanne-Klein et al., 1998] SCHANNE-KLEIN, M.-C., HACHE, F., ROY, A., FLYTZANIS, C., AND PAYRASTRE, C.(1998). *Off resonance second order optical activity of isotropic layers of chiral molecules : observation of electric and magnetic contributions*. **J. Chem. Phys.**, **108**, pp. 9436–9443.
- [Schanne-Klein et al., 2003] SCHANNE-KLEIN, M. C., MESNIL, H., BOULESTEIX, T., AND HACHE, F.(2003). *Nonlinear optical spectroscopy of chiral molecules*. **Recent Res. Devel. Chem. Phys.**, **4**, pp. 487–517.
- [Scholz et al., 1969] SCHOLZ, R., THURMAN, R. G., WILLIAMSON, J. R., CHANCE, B., AND BÜCHER, T.(1969). *Flavin and pyridine nucleotide oxidation-reduction changes in perfused rat liver*. **J. Biol. Chem.**, **244**, p. 2317–2324.
- [Selman et al., 2004] SELMAN, M., THANNICKAL, V., PARDO, A., ZISMAN, D., MARTINEZ, F., AND LYNCH, J.(2004). *Idiopathic pulmonary fibrosis : pathogenesis and therapeutic approaches*. **Drugs**, **64**(4), pp. 405–430.
- [Shen, 1984] SHEN, Y.(1984). **The principles of nonlinear optics**. Wiley, New-York.
- [Shen, 1989] SHEN, Y.(1989). *Optical second harmonic generation at interfaces*. **Ann. Rev. Phys. Chem.**, **40**, pp. 327–350.
- [Sheppard and Kompfner, 1978] SHEPPARD, C. AND KOMPFFNER, R.(1978). *Resonant scanning optical microscope*. **Appl. Opt.**, **17**, pp. 2879–2882.
- [Squier et al., 1998] SQUIER, J. A., MÜLLER, M., BRAKENHOFF, G. J., AND WILSON, K. R.(1998). *Third harmonic generation microscopy*. **Opt. Express**, **3**, pp. 315–324.
- [Sreerama and Woody, 2004] SREERAMA, N. AND WOODY, R. W.(2004). *Computation and analysis of protein circular dichroism spectra*. In BRAND, L. AND JOHNSON, M. L., editors, **Numerical Computer Methods, 13 of Methods in Enzymology**, pp. 318–351. Elsevier, Amsterdam.

- [Stoller et al., 2003] STOLLER, P., CELLIERS, P., REISER, K., AND RUBENCHIK, A.(2003). *Quantitative second-harmonic generation microscopy in collagen*. **Appl. Opt.**, **42**(25), pp. 5209–5219.
- [Stoller et al., 2002a] STOLLER, P., KIM, B.-M., RUBENCHIK, A., REISER, K., AND DA SILVA, L.(2002a). *Polarization-dependent optical second-harmonic imaging of a rat-tail tendon*. **J. Biomed. Opt.**, **7**(2), pp. 205–214.
- [Stoller et al., 2002b] STOLLER, P., REISER, K., CELLIERS, P., AND RUBENCHIK, A.(2002b). *Polarization-modulated second harmonic generation in collagen*. **Biophys J.**, **82**(6), pp. 3330–3342.
- [Stroh et al., 2005] STROH, M., ZIMMER, J., DUDA, D., LEVCHENKO, T., COHEN, K., BROWN, E., SCADDEN, D., TORCHILIN, V., BAWENDI, M., FUKUMURA, D., AND JAIN, R.(2005). *Quantum dots spectrally distinguish multiple species within the tumor milieu in vivo*. **Nat. Med.**, **11**(6), pp. 678–682.
- [Sun et al., 2003] SUN, C.-K., CHEN, C.-C., CHU, S.-W., TSAI, T.-H., CHEN, Y.-C., AND LIN, B.-L.(2003). *Multiharmonic-generation biopsy of skin*. **Opt. Lett.**, **28**(24), pp. 2488–2490.
- [Svirko and Zheludev, 1998] SVIRKO, Y. P. AND ZHELUDEV, N. I.(1998). **Polarization of light in nonlinear optics**. Wiley, Chichester.
- [Sweat et al., 1968] SWEAT, F., MELOAN, S. N., AND PUCHTLER, H.(1968). *A modified one-step trichrome stain for demonstration of fine connective tissue fibers*. **Stain Technol.**, **43**(4), pp. 227–231.
- [Thornhill, 1975] THORNHILL, D. P.(1975). *Separation of a series of chromophores and fluorophores present in elastin*. **Biochem. J.**, **147**, pp. 215–219.
- [Tortora and Grabowski, 2004] TORTORA, G. J. AND GRABOWSKI, S. R.(2004). **Introduction to the human body : The essentials of anatomy and physiology**. John Wiley and Sons, Inc..
- [Wagnière, 1993] WAGNIÈRE, G.(1993). **Linear and nonlinear optical properties of molecules**. VHCA, Basel.
- [Wang, 2002] WANG, N. S.(2002). *Anatomy and ultrastructure of the lung*. In BITTAR, E. E., editor, **Pulmonary biology in health and disease**. Springer-Verlag, New York.
- [Wauchope et al., 1992] WAUCHOPE, R., BUTTLER, T., HORNSBY, A., AUGUSTIJN-BECKERS, P., AND BURT, J.(1992). *The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making*. **Res. Environ. Contam. Toxicol.**, **123**, pp. 1–155.

- [Whittaker et al., 1994] WHITTAKER, P., KLONER, R., BOUGHNER, D., AND PICKERING, J.(1994). *Quantitative assessment of myocardial collagen with picosirius red staining and circularly polarized light*. **Basic Res. Cardiol.**, **89**, pp. 397–410.
- [Williams et al., 2005] WILLIAMS, R., ZIPFEL, W. R., AND WEBB, W.(2005). *Interpreting second-harmonic generation images of collagen fibrils*. **Biophys. J.**, **88**, pp. 1377–1386.
- [Wu et al., 2004] WU, Y., XI, P., QU, J. Y., CHEUNG, T. H., AND YU, M. Y.(2004). *Depth-resolved fluorescence spectroscopy reveals layered structure of tissue*. **Opt. Express**, **12**, pp. 3218–3223.
- [Xu and Webb, 1996] XU, C. AND WEBB, W.(1996). *Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm*. **J. Opt. Soc. Am. B**, **13**(3), pp. 481–491.
- [Yasui et al., 2004] YASUI, T., TOHNO, Y., AND ARAKI, T.(2004). *Characterization of collagen orientation in human dermis by two-dimensional second-harmonic-generation polarimetry*. **J. Biomed. Opt.**, **9**(2), pp. 259–264.
- [Yoshioka et al., 1990] YOSHIOKA, K., TOHDA, M., TAKEMURA, T., AKANO, N., MATSUBARA, K., OOSHIMA, A., AND MAKI, S.(1990). *Distribution of type I collagen in human kidney diseases in comparison with type III collagen*. **J. Pathol.**, **162**(2), p. 141–148.
- [Yurchenco and Schittny, 1990] YURCHENCO, P. D. AND SCHITTNY, J. C.(1990). *Molecular architecture of basement membranes*. **FASEB J.**, **4**, pp. 1577–1590.
- [Zipfel et al., 2003a] ZIPFEL, W. R., WILLIAMS, R., CHRISTIE, R., NIKITIN, A., HYMAN, B., AND WEBB, W.(2003a). *Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **100**, pp. 7075–7080.
- [Zipfel et al., 2003b] ZIPFEL, W. R., WILLIAMS, R., AND WEBB, W.(2003b). *Nonlinear magic : multiphoton microscopy in the biosciences*. **Nature Biotech.**, **21**(11), pp. 1369–1377.
- [Zoumi et al., 2002] ZOUMI, A., YEH, A., AND TROMBERG, B.(2002). *Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **99**(17), pp. 11014–11019.

Résumé : La microscopie multiphoton est une technique d'imagerie optique dont une des caractéristiques les plus remarquables est de fournir une information micrométrique en profondeur dans les tissus intacts. Un autre intérêt est la possibilité de visualiser la structure d'une cellule ou d'un tissu en utilisant des sources de contraste endogènes qui permettent une imagerie très peu invasive. De plus, divers modes de contrastes tels que la fluorescence excitée à deux photons (2PEF), la génération de seconde harmonique (SHG) ou la génération de troisième harmonique (THG) sont facilement combinables, et les applications de la microscopie multiphoton sont ainsi nombreuses et variées, dans des domaines comme les neurosciences, la cancérologie, l'embryologie,...

Cependant, des progrès sont encore nécessaires dans la compréhension des contrastes optiques non-linéaires endogènes observés dans les tissus. Dans ce contexte, la génération de seconde harmonique par le collagène fibrillaire soulevait différentes questions au début de ce travail, notamment sur la spécificité de la SHG en fonction du type de collagène et sur le rôle de sa structure chirale en triple hélice dans la forte amplitude des signaux observés. L'étude du collagène est particulièrement intéressante car il représente 30 % du contenu total du corps humain en protéines. Constituant principal de la matrice extracellulaire d'une grande variété de tissus et d'organes, le collagène est impliqué dans tout remodelage de la matrice extracellulaire et dans de nombreuses pathologies, mais on manque actuellement d'outils performants pour visualiser son architecture tridimensionnelle à l'échelle micrométrique. Dans ce contexte, la microscopie SHG est un outil prometteur pour visualiser la distribution du collagène dans les tissus.

Ce travail de thèse a débuté avec des expériences de génération de seconde harmonique en surface résolue en polarisation sur des films minces de molécules de collagène de type I et IV, qui nous ont permis de démontrer que la microscopie SHG est une sonde de l'organisation macromoléculaire du collagène et non pas du type de collagène. Nous avons appliqué ensuite ces résultats à l'étude de la fibrose collagénique pulmonaire et rénale dans des modèles murins, une accumulation pathologique de collagène fibrillaire qui peut conduire à une insuffisance rénale terminale ou à une insuffisance respiratoire souvent létale à terme. Nous avons démontré que la microscopie multiphoton permet de visualiser la morphologie de ces tissus, de mettre en évidence toutes les caractéristiques de ces pathologies et d'évaluer quantitativement le remodelage de la matrice extracellulaire au cours de l'évolution de la fibrose. Finalement, nous avons proposé des scores de fibrose basés sur des densités volumiques de pixels SHG qui nous ont permis d'apprécier le rôle de certains facteurs (cellules/enzymes d'assemblage) responsables de la fibrose. Ce travail devrait ainsi permettre de proposer de nouvelles approches thérapeutiques pour ces pathologies fibrosantes.

Mots-clés : *microscopie SHG, collagène, microscopie multiphoton, kératine, fibrose, poumon, rein*

Abstract: Multiphoton microscopy is an optical imaging technique which has the unique ability of providing three-dimensional micrometer resolution within thick tissues. Another attractive feature is that it is possible to visualise the structure of an unstained cell or tissue using endogenous sources of contrast that allow for a less invasive imaging method. Moreover, different contrast modes like two-photon excited fluorescence (2PEF), second harmonic generation (SHG) or third harmonic generation (THG) can be easily combined, and all these features enable a wide range of applications of multiphoton microscopy in fields like neurosciences, oncology, embryology,...

Meanwhile, progresses are still needed in order to completely characterize the endogenous sources of nonlinear optical contrast observed in biological media. Thus, the second harmonic generation from fibrillar collagen raised different questions in the beginning of this work, mainly on the role of the collagen type and the role of its triple helical structure (that means the chirality) in the SHG signal. The study of collagen is particularly interesting for this protein represents 30% of the total human body proteins. The collagen is the main constituent of the extracellular matrix of a wide variety of tissues and organs and hence it is involved in the remodelling of the extracellular matrix and numerous pathologies. But nowadays there's a lack of appropriate methodologies to visualise the 3D architecture of collagen at a micrometer scale. In this context, the SHG microscopy appears as a promising tool for the visualisation of the distribution of collagen within the tissues.

This work started with polarisation-resolved surface second harmonic generation experiments on thin films of collagen I and IV molecules, which allowed us to demonstrate that the SHG microscopy is a sensitive probe of collagen macromolecular organization and not of the collagen type. We next applied these results to the study of pulmonary and renal fibrosis in animal models, a pathological accumulation of fibrillar collagen which can progress to a terminal renal insufficiency or to a respiratory insufficiency often lethal eventually. We demonstrated that multiphoton microscopy permit to visualise the morphology of these tissues, to evidence all the characteristic features of these pathologies and quantitatively evaluate the remodelling of the extracellular matrix during fibrosis. Finally, we have proposed fibrosis scores based on volume fractions of significant SHG signals which allowed us to appreciate the role of different factors (cells/assembling enzymes) in fibrosis. This methodology will help to develop new therapeutic approaches based on a better understanding of these fibrotic pathologies.

Keywords: *SHG microscopy, collagen, multiphoton microscopy, keratin, fibrosis, lung, kidney*