



Imagerie Quantitative du Collagène par Génération de Seconde Harmonique

Stéphane Bancelin

► To cite this version:

Stéphane Bancelin. Imagerie Quantitative du Collagène par Génération de Seconde Harmonique. Biophysique [physics.bio-ph]. Ecole Polytechnique X, 2013. Français. NNT : . pastel-00958171

HAL Id: pastel-00958171

<https://pastel.hal.science/pastel-00958171>

Submitted on 11 Mar 2014

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

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



THÈSE de doctorat

SPÉCIALITÉ : *BIOPHYSIQUE*

effectuée au
LABORATOIRE D'OPTIQUE ET BIOSCIENCES

IMAGERIE QUANTITATIVE DU COLLAGÈNE PAR GÉNÉRATION DE SECONDE HARMONIQUE

présentée par
STÉPHANE BANCELIN

pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'ÉCOLE POLYTECHNIQUE

soutenue publiquement le Jeudi 12 Décembre 2013, devant le Jury composé de :

Mme Isabelle LEDOUX-RAK	LPQM, ENS de Cachan	Rapporteuse
Mme Marie-Pierre FONTAINE-AUPART	ISMO, Université Paris XI	Rapporteuse
Mme Carole AIMÉ	LCMCP, Université Paris VI	Examinatrice
M Riad HAIDAR	DOTA, ONERA	Examineur
M Denis ROUÈDE	IPR, Université de Rennes 1	Examineur
Mme Marie-Claire SCHANNE-KLEIN	LOB, École Polytechnique	Directrice de thèse

Table des matières

Introduction	1
I Le collagène	5
I.1 Les types de collagène	6
I.2 Le collagène I	6
I.2.1 La triple hélice	8
I.2.1.1 Structure primaire	8
I.2.1.2 Structure secondaire et tertiaire	8
I.2.1.3 Structure quaternaire	10
I.2.2 Synthèse	10
I.2.3 Fibrillogenèse	11
I.2.3.1 Formation des fibrilles	11
I.2.3.2 Structure des fibrilles	12
I.2.4 Structure hiérarchique dans les tissus	13
I.2.5 Dénaturation du collagène I	15
I.3 Techniques conventionnelles d'imagerie du collagène	15
I.3.1 Microscopie électronique	16
I.3.1.1 Principe	16
I.3.1.2 Préparation des échantillons	17
I.3.2 Microscopie à force atomique	18
I.3.3 Colorations histologiques et immunohistochimiques	18
I.3.4 Microscopie de fluorescence	20
I.3.5 Microscopie en lumière réfléchie (OCT, confocal de réflectance) . .	20
I.3.6 Microscopie en lumière polarisée	21
I.4 Conclusion : place de la microscopie multiphoton	22
II Microscopie multiphoton	25
II.1 Microscopie non-linéaire : fluorescence excitée à deux photons	26
II.1.1 Principe	26
II.1.2 Pré-requis	27
II.1.3 Résolution spatiale	28
II.1.4 Signaux	30
II.1.4.1 Ordre de grandeur des signaux mesurés	30
II.1.4.2 Signaux endogènes	31
II.1.4.3 Signaux exogènes	31
II.1.5 Avantages et inconvénients	31

II.1.5.1	Profondeur de pénétration augmentée dans les tissus diffusants	31
II.1.5.2	Microscopie point par point	34
II.1.5.3	Phototoxicité et photoblanchiment réduit	36
II.1.5.4	Diversité des modes de contrastes	37
II.2	Génération de seconde harmonique (SHG)	38
II.2.1	Principes et mécanismes	39
II.2.1.1	Rappel du cas linéaire	39
II.2.1.2	Cas non-linéaire	40
II.2.1.3	Origine physique à l'échelle moléculaire	41
II.2.1.4	Non centrosymétrie	43
II.2.1.5	Formalisme tensoriel	44
II.2.1.6	Susceptibilité non-linéaire	44
II.2.2	Rôle de la cohérence	47
II.2.2.1	Cas de l'émission incohérente : diffusion hyper-Rayleigh	49
II.2.2.2	Cas de l'émission cohérente : génération de seconde harmonique	50
II.2.2.3	SHG dans les tissus	50
II.2.2.4	Propriétés du rayonnement et résolution	52
II.2.3	Origine de la SHG du collagène	53
II.2.3.1	Symétries du collagène et réponse non-linéaire	54
II.2.3.2	Structure hiérarchique	55
II.2.3.3	Spécificité pour le collagène fibrillaire	58
II.3	Dispositif expérimental	59
III	Caractérisation et contrôle de la fibrillogenèse du collagène	67
III.1	Fibrillogenèse en milieu peu dense	69
III.1.1	Protocole	69
III.1.1.1	Préparation des échantillons	69
III.1.1.2	Microscopie SHG	70
III.1.1.3	Microscopie électronique	71
III.1.1.4	Traitements des images	71
III.1.2	Cinétique de croissance du réseau collagénique	72
III.1.3	Croissance d'une fibrille isolée	75
III.1.4	Conclusion	77
III.2	Contrôle chimique de la fibrillogenèse	78
III.2.1	Fonctionnalisation des nanoparticules de silice	79
III.2.2	Modification de la fibrillogenèse et du réseau collagénique	81
III.2.3	Imagerie de la fibrillogenèse	83
III.2.4	Traitements d'images préliminaires en 2D	84
III.2.5	Traitements avancés des images	87
III.2.5.1	Segmentation des nanoparticules de silice	88
III.2.5.2	Fonction distance	89
III.2.5.3	Densité de photons autour des nanoparticules	91
III.2.6	Résultats	92
III.2.6.1	Densité de collagène	92

III.2.6.2	Portée d'influence des nanoparticules	95
III.2.6.3	Structuration autour des nanoparticules de silice	97
III.3	Conclusion et perspectives	98
IV	Mesure quantitative du signal de génération de seconde harmonique	101
IV.1	Calibration des signaux SHG : approches théoriques, analytiques et numériques	102
IV.1.1	Approche analytique	103
IV.1.1.1	Équation de propagation	103
IV.1.1.2	Faisceau gaussien	104
IV.1.1.3	Solution en champ focalisé	105
IV.1.1.4	Approximation des ondes planes	108
IV.1.2	Simulations numériques	109
IV.1.2.1	Principe	109
IV.1.2.2	Résultats et discussion	110
IV.2	Mesures expérimentales	111
IV.2.1	Microscopie correlative SHG/TEM	111
IV.2.1.1	Préparation des échantillons	111
IV.2.1.2	Imagerie correlative sur une même fibrille de collagène	112
IV.2.2	Résultats	115
IV.2.2.1	Sensibilité du microscope SHG	115
IV.2.2.2	Courbes de calibration	116
IV.3	Discussion	118
IV.3.1	Mesure <i>Top-Down</i> de l'hyperpolarisabilité d'une triple hélice de collagène	119
IV.3.2	Comparaison aux mesures en HRS selon une approche <i>Bottom-Up</i>	120
IV.3.2.1	Hyperpolarisabilité d'une triple hélice	120
IV.3.2.2	Hyperpolarisabilité effective en polarisation circulaire	121
IV.4	Conclusion et perspectives	122
V	Biomécanique sur peau de souris	125
V.1	Le syndrome d'Ehlers-Danlos	126
V.1.1	Pathologie : origine et manifestations	127
V.1.1.1	Types d'EDS, symptômes, prévalence...	127
V.1.1.2	Causes	127
V.1.1.3	Le collagène V	128
V.1.2	Modèles de souris génétiquement modifiées pN et K14-COL5A1	129
V.1.3	La peau	130
V.2	Dispositif expérimental	132
V.2.1	Manipulation des échantillons	132
V.2.2	Machine de traction	134
V.2.3	Imagerie	136
V.3	Analyse des images	138
V.3.1	Déformation des follicules pileux	138
V.3.1.1	Segmentation des follicules	139
V.3.1.2	Déformation des follicules	140

V.3.1.3	Tenseur de déformation	141
V.3.2	Orientation des fibrilles de collagène	145
V.3.2.1	Ouverture linéaire	145
V.3.2.2	Rotation de l'élément structurant	146
V.3.2.3	Orientation locale	147
V.3.2.4	Index d'orientation et entropie	150
V.4	Résultats et discussion	150
V.4.1	Déformation du tissu	150
V.4.1.1	Réorganisation des follicules	150
V.4.1.2	Déformation locale	151
V.4.2	Réorganisation du collagène	152
V.4.3	Réponse mécanique	156
V.4.4	Différences entre souris mutantes et contrôles	158
V.4.5	Conclusion et perspectives	160
Conclusion		163
Annexes		167
A	Mesure de l'hyperpolarisabilité par diffusion hyper-Rayleigh	167
A.1	Généralités	167
A.2	Mesure de l'hyperpolarisabilité d'une liaison peptidique par une approche <i>Top-Down</i>	169
B	Réduction du tenseur d'hyperpolarisabilité	171
C	Protocole d'extraction et de purification du collagène de type I	173
D	Morphologie mathématique	178
D.1	Dilatation et érosion	179
D.2	Ouverture et fermeture	179
E	Équation de propagation	181
Bibliographie		189

Remerciements

Je veux tout d'abord remercier les membres de mon jury Isabelle LEDOUX-RAK, Marie-Pierre FONTAINE-AUPART, Carole AIME, Riad HAIDAR et Denis ROUEDE pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail de thèse. Je remercie également Jean-Louis MARTIN pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire d'Optique et Biosciences, ainsi que l'EDX pour m'avoir financé durant ces trois années.

Toute ma reconnaissance va à Marie-Claire SCHANNE-KLEIN pour m'avoir encadré en tant que directrice de thèse. Merci pour ta patience, ta disponibilité et tes conseils avisés, et merci de m'avoir laissé prendre de plus en plus d'indépendance les années passant. Ce travail te doit tout !

Un grand merci à Gaël LATOUR qui m'a initié au maniement du microscope. Merci pour ta constante disponibilité pour répondre à mes questions et pour tes fréquents coups de mains lorsque j'arrivais paniqué parce que la manip ne marchait plus. Merci à Ivan GUSACHENKO de m'avoir expliqué le fonctionnement de ses programmes. Je dois ici confesser que je n'ai toujours pas tout compris... Merci et bon courage à ceux qui poursuivront les projets de l'équipe Claire et Sotiris.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de travailler au cours de ces trois années : Vaia MARCHAIRAS et Etienne DECENCIERE du CMM pour l'analyse d'images, Christelle BONOD-BIDAUD et Florence RUGGIERO de l'IGFL qui nous ont fourni les peaux de souris pour nos expériences de biomécanique, Barbara LYNCH et Jean-Marc ALLAIN du LMS, pour ces heures passées dans le noir à tirer sur les peaux et pour les innombrables pauses cafés à attendre la fin de l'imagerie, Antonello DE MARTINO, André NAZAC et Bicher HAJ IBRAHIM du LPICM pour ces longues réunions de début de matinée qui parfois empiètent sur le déjeuner... Enfin merci à Gervaise MOSSER du LCMCP pour m'avoir appris à purifier du collagène et bien sûr à Carole AIME et Thibault CORADIN avec qui j'ai eu grand plaisir à travailler tout au long de ces trois années de thèse. Merci à tous pour nos échanges fructueux !

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du LOB pour l'ambiance toujours chaleureuse qui règne au labo. Un merci particulier à Isabelle pour son aide dans le L2 et tous ses coups de pouces sur les protocoles de biologie, à Jean-Marc pour les pièces mécaniques et à Xavier pour l'électronique du microscope et pour chaussette (il comprendra). Un merci particulier à Laure et Christelle qui font tourner le laboratoire au jour le jour. Merci pour votre disponibilité et votre aide toujours précieuse... et toutes mes excuses pour mes constants retards à ramener mes ordres de missions !

Un immense merci à mes voisins de bureau passés et présents : Pierre, pour tes conseils précieux, Antoine, pour tes moments de freestyle inoubliables, Guillaume, pour ton intarissable source de débats, Lucille, pour ta constante bonne humeur, Thibault, pour tes explosions récurrentes (ton célèbre "batard de mort" restera dans les annales...) et pour m'avoir souvent surpassé dans la collection de tasses à café, Nelly, pour avoir réglé le thermostat à 25° (quoique) ... Merci à Paul pour l'organisation des midis foot/ultimate, notre forme physique souffre de ton départ. Merci au Mayflower pour avoir accueilli sans défaillance nos soirées de labo. Merci à Silvan, Max, Max, Kamel, Floriane, Marianne, Mouna, Vincent, Louis, Pierre, Laura, Roxanne... Merci aussi à mes camarades de l'IF-SBM Aurore, Marie-Amélie, Feriel, Pascal et Elise pour ces heures passées à organiser le colloque.

Merci à mes amis François, Yann, Céline, Mélanie, Adrien, Ronan, Benoît, Guillaume, et tous ceux que j'oublie et qui ne m'en voudront pas (n'est-ce pas ?).

Merci à ma famille et à ma belle-famille de me supporter (dans les deux sens du terme) depuis tant d'années. En particulier merci à mes parents pour leur soutien inconditionnel, pour avoir contribué, parfois dans la douleur, à me façonner et pour m'accepter tel que je suis, pas toujours selon leurs désirs.

Et enfin à Marie, pour tant de raisons... notamment orthographique !

Pour finir je remercie par avance tous ceux qui liront cette thèse, intégralement ou partiellement.

Listes des abréviations

Pour des raisons de lisibilité, il a été décidé de conserver les abréviations et acronymes utilisés selon leur origine anglaise, tels qu'ils sont rencontrés dans la littérature et, en particulier, dans les articles cités dans ce manuscrit.

$\lambda/4$	lame quart d'onde
$\lambda/2$	lame demi-onde
1PEF	fluorescence excitée à un photon
2PEF	fluorescence excitée à deux photons
AFM	microscopie à force atomique
CARS	diffusion Raman anti-Stokes cohérente
CD	classe de distance
EDS	syndrome d'Elhers-Danlos
ECM	matrice extra-cellulaire
HRS	diffusion hyper-Rayleigh
MPM	microscopie mutliphoton
NA	ouverture numérique
NP	nanoparticules
OCT	tomographie par cohérence optique
OI	index d'orientation
P-SHG	génération de seconde harmonique résolue en polarisation
PLM	microscopie en lumière polarisée
PMT	tube photomultiplicateur
PSF	fonction de réponse du point
ROI	région d'intérêt
SD	déviatiion standard (écart-type)
SEM	erreur standard
SHG	génération de seconde harmonique
S/N	rapport signal sur bruit
TEM	microscopie électronique à transmission
THG	génération de troisième harmonique
CMM	Centre de Morphologie Mathématique
IGFL	Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon
LCMCP	Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris
LMS	Laboratoire de Mécanique des Solides
LOB	Laboratoire d'Optique et Biosciences
LPICM	Laboratoire de Physique des Interfaces et Couches Minces

Introduction

*Point n'est besoin d'espérer pour entreprendre,
ni de réussir pour persévérer*
- Guillaume I^{er} d'Orange-Nassau

La microscopie optique joue, depuis son invention, un rôle central en biologie en permettant d'observer des constituants du vivant invisibles à l'œil nu. La visualisation de processus biologiques est souvent une étape essentielle à la compréhension des mécanismes sous-jacents. Ainsi, la mise au point d'une technique d'imagerie adaptée peut entraîner une avancée rapide des connaissances. C'est pourquoi le développement de nouveaux outils et de nouvelles techniques pour la biologie et la médecine a toujours été un moteur pour la recherche en microscopie.

Les premiers microscopes ont permis à leur inventeur, Antoine Von Leeuwenhoek, de découvrir en 1677 les bactéries, les spermatozoïdes et les globules rouges, nonobstant les distorsions importantes des images. A la fin du XVII^e siècle, Hooke améliore le dispositif en introduisant un oculaire : c'est le microscope composé, qui devient alors un produit commercial. Durant les trois siècles qui ont suivi, les éléments optiques ont sans cesse été perfectionnés afin de réduire les aberrations géométriques et chromatiques des objectifs, des oculaires et des systèmes d'illumination. Parmi les exemples les plus probants, la microscopie optique a permis, au XIX^e siècle, la découverte de la cellule, du noyau et de nombreuses études morphologiques.

Le XX^e siècle voit notamment l'avènement des techniques de fluorescence basées sur l'absorption de photons par des colorants intrinsèques ou extrinsèques, suivie d'émission de lumière à une longueur d'onde plus élevée. Toutefois les propriétés diffusives des tissus biologiques brouillent l'imagerie d'un objet enfoui en profondeur, obligeant à augmenter l'intensité de la lumière d'excitation pour atteindre des profondeurs plus importantes, au risque d'endommager l'échantillon. Il faut attendre 1957 pour que Marvin Minsky propose un microscope "confocal" dans lequel l'utilisation astucieuse d'un diaphragme permet d'imager un plan particulier, autorisant ainsi des "coupes" virtuelles d'un échantillon tridimensionnel par un balayage point par point. L'utilisation conjointe de cette technique et de marqueurs fluorescents fonctionnalisés permet d'accéder à une observation 3D *in situ* en ciblant très spécifiquement l'objet biologique d'intérêt (organites cellulaires, macromolécules...). Progressivement le domaine d'utilisation du microscope s'étend. De la cellule on passe aux tissus vivants voire à l'organe, du morphologique on évolue vers le fonctionnel. Ainsi aujourd'hui nous cherchons à visualiser l'interaction des protéines ou des cellules dans les tissus, les processus intracellulaires... Chaque année de nouvelles

techniques apparaissent pour voir plus petit, plus spécifique, plus physiologique...

Le développement des lasers ultra-brefs, dans les années 80, a permis de dépasser le stade de la réponse linéaire pour tirer profit d'effets non-linéaires spectaculaires, aujourd'hui exploités de façon quasi-routinière dans certains laboratoires. Parmi les pionniers dans ce domaine, on peut citer Denk, Strickler et Webb qui introduisent en 1990 la microscopie de fluorescence excitée à deux photons (2PEF) en utilisant des lasers femtosecondes infrarouges [1]. Cet effet n'étant significatif qu'au foyer de l'objectif utilisé, il est possible d'obtenir une résolution intrinsèquement tridimensionnelle. Depuis une quinzaine d'années, la microscopie non-linéaire s'est imposée comme une technique de choix pour des études *in vivo*. Du fait de ses avantages, notamment sa bonne profondeur de pénétration et la multiplicité des modes de contrastes accessibles, les applications de la microscopie multiphoton sont nombreuses et variées, dans des domaines comme les neurosciences [2, 3, 4], la cancérologie [5, 6], l'embryologie [7, 8, 9, 10]...

Le Laboratoire d'Optique et Biosciences (LOB) dans lequel j'ai effectué ma thèse s'intéresse particulièrement aux techniques de microscopie multiphoton (MPM). Parmi les projets développés on peut citer par exemple l'utilisation d'optique adaptative [11, 12] pour la MPM, l'imagerie en nappe de lumière [13] ou multi-couleur (*Brainbow*) [14] ou la génération d'harmoniques résolue en polarisation (P-SHG, P-THG) [15, 16, 17, 18]. Le groupe possède une grande expertise en génération de seconde harmonique (SHG) par le collagène et sur l'application de cette technique à l'étude de tissus conjonctifs présentant des propriétés structurales variées. En particulier, l'équipe a travaillé sur des tissus tels que la cornée [19, 20, 21] ou le tendon [22], sur la caractérisation de gels de collagène [23, 24], utilisés pour la formation de matériaux biomimétiques, sur le diagnostic de fibroses rénales [25, 26]...

Cette thèse est centrée sur l'étude du collagène, une protéine ubiquitaire qui représente environ 30% de la masse protéique du corps humain et est le constituant principal de la matrice extracellulaire d'une grande variété de tissus et d'organes. De ce fait, le collagène est impliqué dans tout remodelage de la matrice extracellulaire et dans de nombreuses pathologies. Partant de là, il subsiste un besoin de techniques performantes pour visualiser l'architecture tridimensionnelle du collagène à l'échelle micrométrique. Dans ce contexte, la microscopie SHG est un outil primordial pour imager la distribution du collagène dans les tissus, car cette protéine présente un fort signal de seconde harmonique. Cependant, malgré les grandes avancées, depuis deux décennies, dans le domaine de la microscopie multiphoton, plusieurs problématiques perdurent à propos de la SHG du collagène.

1. L'origine même du signal SHG est encore mal connue, notamment en ce qui concerne l'identification d'une sous-structure élémentaire responsable de la forte réponse SHG du collagène.
2. La construction du signal SHG étant intimement liée à sa cohérence (cf. II.2.2), l'organisation spatiale des harmonophores y joue un rôle crucial. Ainsi, il demeure difficile à l'heure actuelle de corrélérer l'intensité SHG détectée avec le nombre (ou la densité) de molécules du tissu. C'est pourquoi la SHG reste aujourd'hui un outil semi-quantitatif.

Cette seconde problématique délimite le sujet de cette thèse qui a pour but une étude quantitative des signaux SHG provenant du collagène :

- d'un point de vue fondamental, pour relier le signal SHG à la densité d'har-

Introduction

nophores et discuter de la nature physique de ces harmonophores dans le cas du collagène fibrillaire

- d'un point de vue phénoménologique, pour développer des méthodes d'analyse d'images quantitatives sur différents systèmes collagéniques (systèmes modèles ou tissus).

Dans ce manuscrit, le premier chapitre introduit les notions biologiques nécessaires à la compréhension de la suite, ainsi que les diverses techniques usuelles de visualisation du collagène. Le deuxième chapitre expose les principes d'optique non-linéaire à l'origine de la SHG et décrit le microscope multiphoton utilisé au laboratoire. Nous présenterons ensuite, dans le troisième chapitre, un projet visant à caractériser et contrôler la fibrillogenèse du collagène, étude qui nous a permis de nous familiariser avec la manipulation de fibrilles de collagène de diamètres variables. Le chapitre quatre décrit, quant à lui, la calibration des signaux SHG, mise en place sur ces systèmes fibrillaires, par corrélation à la microscopie électronique, ainsi que l'interprétation de ces mesures en terme de construction du signal SHG dans les fibrilles. Enfin, le chapitre cinq propose une étude couplée entre mécanique et imagerie de tissus de souris génétiquement modifiées, modèles pour le syndrome d'Ehlers-Danlos, une pathologie génétique des tissus conjonctifs, étude pour laquelle nous avons développé des outils d'analyse d'images quantitative du réseau collagénique.

Les devises Shadok



QUAND ON NE SAIT PAS OÙ L'ON VA,
IL FAUT Y ALLER !!...
... ET LE PLUS VITE POSSIBLE.

Chapitre I

Le collagène

*Si l'on sait exactement ce que l'on va faire,
à quoi bon le faire*
- Pablo Ruiz Picasso

Sommaire

I.1	Les types de collagène	6
I.2	Le collagène I	6
I.2.1	La triple hélice	8
I.2.2	Synthèse	10
I.2.3	Fibrillogenèse	11
I.2.4	Structure hiérarchique dans les tissus	13
I.2.5	Dénaturation du collagène I	15
I.3	Techniques conventionnelles d'imagerie du collagène	15
I.3.1	Microscopie électronique	16
I.3.2	Microscopie à force atomique	18
I.3.3	Colorations histologiques et immunohistochimiques	18
I.3.4	Microscopie de fluorescence	20
I.3.5	Microscopie en lumière réfléchie (OCT, confocal de réflectance)	20
I.3.6	Microscopie en lumière polarisée	21
I.4	Conclusion : place de la microscopie multiphoton	22

Le collagène est une protéine omniprésente dans le règne animal. Chez les vertébrés, il représente près de 30% de la masse protéique, et on le rencontre aussi, dans une bien moindre mesure, chez les insectes ou les arthropodes. Il est localisé dans les tissus conjonctifs qu'il contribue à structurer et est le constituant majoritaire de la matrice extracellulaire (ECM), sécrétée par les cellules, qui confère à ces tissus leur forme, leur résistance mécanique et leur flexibilité. L'ECM est principalement constituée de fibrilles de collagène associées à d'autres types de collagène non fibrillaires [27, 28, 29], d'autres protéines (fibrine, élastine) et des protéoglycanes. Cet ensemble, de composition très variable suivant les tissus considérés, est baigné dans un fluide interstitiel qui contient de l'eau, des ions et différentes macromolécules circulantes.

Nous allons, dans un premier temps, voir les différents types de collagène, puis nous focaliser sur le collagène I, qui nous intéressera particulièrement dans ce manuscrit. Enfin nous introduirons brièvement les principales techniques d'imagerie du collagène pour mettre en exergue les avantages et les inconvénients offerts par la microscopie SHG.

I.1 Les types de collagène

Le terme "collagène" est en fait utilisé pour désigner tout un ensemble de protéines. Jusqu'à présent, 28 types de collagène ont été identifiés et classés dans 8 familles (tables I.1 et I.2) [27, 30]. Tous les collagènes forment des structures supramoléculaires même si leur taille, leur fonction et leur distribution dans les tissus peuvent varier considérablement. Leurs points communs étant la grande régularité de la séquence d'acides aminés et la présence d'un domaine en triple hélice, plus ou moins long. Les différents types de collagène sont caractérisés par la complexité et la variété de leur structure, et la présence de domaines non hélicoïdaux additionnels.

Famille	Caractéristiques
A	Collagène fibrillaire.
B	Collagène formant des réseaux 2D.
C	FACIT : collagène avec des domaines en triple hélice interrompus.
D	Collagène microfibrillaire formant des filaments perlés.
E	Collagène associé aux fibrilles d'ancrage.
F	Collagène transmembranaire.
G	Nouveaux types de collagène partiellement déterminés.
H	Protéine contenant des domaines en triple hélice non définies.

TABLE I.1 – Familles de collagène : *Récapitulatif des différentes familles de collagène [adapté de [27, 30]].*

Le collagène est une protéine structurale majeure des tissus conjonctifs, dans lesquels il remplit le rôle d'armature. En effet, les collagènes fibrillaires (notamment le type I) ont une résistance qui, à poids égal, surpasse celle de l'acier et sont impliqués dans les propriétés biomécaniques (résistance, visco-élasticité...) de tissus tels que le tendon, l'os ou la peau (cf. chapitre V).

I.2 Le collagène I

Les protéines sont des macromolécules biologiques constituées d'un enchaînement linéaire d'acides aminés (structure primaire). Ces séquences peuvent ensuite se replier dans l'espace pour former une molécule plus complexe (structure secondaire et tertiaire). L'agencement 3D spécifique joue un rôle crucial dans l'activité biologique des protéines. Si la synthèse de la séquence d'acides aminés est encodée génétiquement, ses mécanismes de repliement et d'auto-assemblage (structure quaternaire) sont essentiellement guidés par des réactions enzymatiques ou par des interactions physico-chimiques (liaisons hydrogènes, interactions électrostatiques ou de Van der Waals...). De plus, si les phénomènes

I.2. Le collagène I

d'auto-assemblage moléculaires sont bien établis, les processus de formation de structures à l'échelle supra-moléculaire le sont beaucoup moins.

Par la suite, nous nous concentrerons sur les collagènes fibrillaires, et plus particulièrement sur le collagène de type I qui représente 90% des collagènes chez les vertébrés. Néanmoins, la description du domaine hélicoïdal principal est valide pour tous les autres types de collagène, à quelques variations de séquence près.

Type	Isoforme	Famille	Distribution tissulaire	Caractéristiques
I.	$[\alpha_1(I)]_2\alpha_2(I)$	A	Os, derme, cornée...	Majoritaire
	$[\alpha_1(I)]_3$	A	Derme, dentine	Mineur
II.	$[\alpha_1(II)]_3$	A	Cartilage, humeur vitreuse	Fibrilles fines
III.	$[\alpha_1(III)]_3$	A	Derme, paroi des vaisseaux	Associé au type I
IV.	$[\alpha_1(IV)]_2\alpha_{1-6}(IV)$	B	Membranes basales	Non fibrillaire
V.	$\alpha_1(V)\alpha_2(V)\alpha_3(V)$	A	Tissus conjonctifs	Régule la taille des fibrilles de type I
VI.	$\alpha_1(VI)\alpha_2(VI)\alpha_3(VI)$	D	Muscle, poumon, cartilage, derme, paroi des vaisseaux	Filaments perlés
VII.	$[\alpha_1(VII)]_3$	E	Peau, jonction dermo-épidermique, muqueuse	Fibrilles d'ancrage
VIII.	$[\alpha_1(VIII)]_2\alpha_2(VIII)$	B	Endothélium, membrane de Descemet	Non fibrillaire
IX.	$\alpha_1(IX)\alpha_2(IX)\alpha_3(IX)$	C	Cartilage, corps vitré	Associé au type II
X.	$[\alpha_1(X)]_3$	B	Cartilage hypertrophique	Non fibrillaire
XI.	$\alpha_1(XI)\alpha_2(XI)\alpha_3(XI)$	A	Cartilage, corps vitré	Associé au type II
XII.	$[\alpha_1(XII)]_3$	C	Ligaments, tendons	Associé au type I
XIII.	$[\alpha_1(XIII)]_3$	F	Follicules pileux, épiderme jonction neuromusculaire	Transmembranaire
XIV.	$[\alpha_1(XIV)]_3$	C	Derme, tendons, poumon, foie, paroi des vaisseaux	Associé au type I
XV.	$[\alpha_1(XV)]_3$	G	Muscle, pancréas, rein, fibroblaste, vaisseaux	
XVI.	$[\alpha_1(XVI)]_3$	C	Fibroblaste, kératinocyte	Associé au type I
XVII.	$[\alpha_1(XVII)]_3$	F	Jonction dermo-épidermique	
XVIII.	$[\alpha_1(XVIII)]_3$	G	Poumon, foie, rate	Associé au type IV
XIX.	$[\alpha_1(XIX)]_3$	C	Rhabdomyosarcome	Rare
XX.	$[\alpha_1(XX)]_3$	C	Tendon, épithélium cornéen, peau embryonnaire	
XXI.	$[\alpha_1(XXI)]_3$	C	Paroi des vaisseaux	
XXII.	$[\alpha_1(XXII)]_3$	C	Cartilage, follicules pileux	
XXIII.	$[\alpha_1(XXIII)]_3$	F	Jonctions des tissus	Rare
XXIV.	$[\alpha_1(XXIV)]_3$	A	Cornée, os	Expression sélective
XXV.	$[\alpha_1(XXV)]_3$	F	Plaque amyloïde (CLAC)	Associé au type I
XXVI.	$[\alpha_1(XXVI)]_3$	D		
XXVII.	$[\alpha_1(XXVII)]_3$	A	Cartilage, peau	Associé au type I
XXVIII.	$[\alpha_1(XXVIII)]_3$	D	Membrane basale	Nombreuses interruptions

TABLE I.2 – Types de collagène : *Récapitulatif des différents types de collagène, de leurs distributions dans les tissus et de leurs caractéristiques notables [adapté de [27, 30]].*

I.2.1 La triple hélice

I.2.1.1 Structure primaire

Un brin de collagène de type I (appelé chaîne α) est un enchaînement polypeptidique de 1055 acides aminés (figure I.1). Dans la partie hélicoïdale un acide aminé sur trois est une glycine (figure I.2.a). Cette séquence peut donc être schématisée par une série de triplets $[Gly - X - Y]_n$, où X et Y peuvent être n'importe quels acides aminés, mais sont le plus souvent (environ 20 à 30% des résidus) une proline ou une hydroxyproline. Le nombre de répétitions n de ce motif dépend du type de collagène et détermine la longueur du domaine en triple hélice. Les chaînes α pouvant être différentes¹, elles sont indexées par un chiffre arabe et un chiffre romain indiquant le type de collagène. Par exemple, une molécule de collagène de type V est composée de trois chaînes α différentes : $\alpha_1(V)$, $\alpha_2(V)$ et $\alpha_3(V)$.

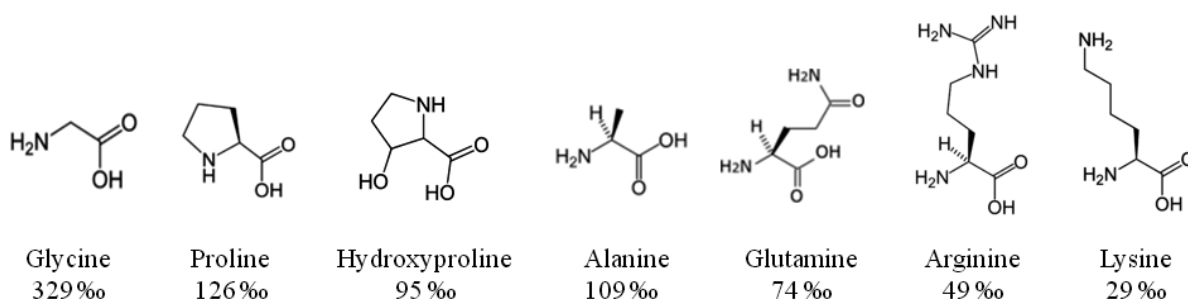


FIGURE I.1 – Principaux acides aminés du collagène : *Fréquence dans les chaînes α de collagène de type I (dans la peau des mammifères), en nombre de résidus pour mille.*

L'analyse de la structure primaire du collagène fait apparaître différents motifs, notamment la répétition périodique de certaines séquences caractéristiques. En particulier, l'agglomération de résidus polaires ou hydrophobes apparaît tous les 234 résidus. Nous verrons plus tard (cf. I.2.3.2) que ces motifs périodiques jouent un rôle dans l'organisation particulière des molécules de collagène à l'intérieur des fibrilles. Enfin, notons que du fait de l'asymétrie de la séquence d'acides aminés et des liaisons peptidiques de ces derniers, qui pointent toutes dans la même direction, la molécule de collagène présente une polarité.

I.2.1.2 Structure secondaire et tertiaire

La structure secondaire traduit le repliement local de la chaîne polypeptidique d'une protéine, tandis que la structure tertiaire décrit l'agencement de la chaîne dans l'espace.

Au vu de la géométrie de la protéine les structures secondaire et tertiaire sont confondues et décrivent l'enroulement en hélice gauche de la chaîne α , grâce à la régularité

1. Un même type de collagène pouvant résulter de la transcription de plusieurs gènes, les chaînes α de ce collagène peuvent présenter des séquences d'acides aminés variées. Par exemple, le collagène IV est synthétisé par 6 gènes, ce qui résulte en 6 séquences différentes (α_{1-6}). A noter que si deux chaînes α_1 d'un même type de collagène présentent des séquences identiques, les chaînes α_1 de deux types de collagène sont différentes.

I.2. Le collagène I

de la séquence de son domaine central, de 1,5 Å de diamètre et de pas 8,4 Å [31, 32] (figure I.2.b). L'arrangement de l'hélice provient principalement de la répulsion stérique entre les résidus de proline et les hydroxyprolines. A noter que contrairement à l'hélice α droite rencontrée dans la plupart des autres protéines, l'hélice du collagène n'est stabilisée par aucune liaison hydrogène intra-chaîne. Les extrémités N- et C-terminales sont respectivement constituées de 150 et 250 acides aminés. Elles servent à la reconnaissance des chaînes α pour l'assemblage en triple hélice.

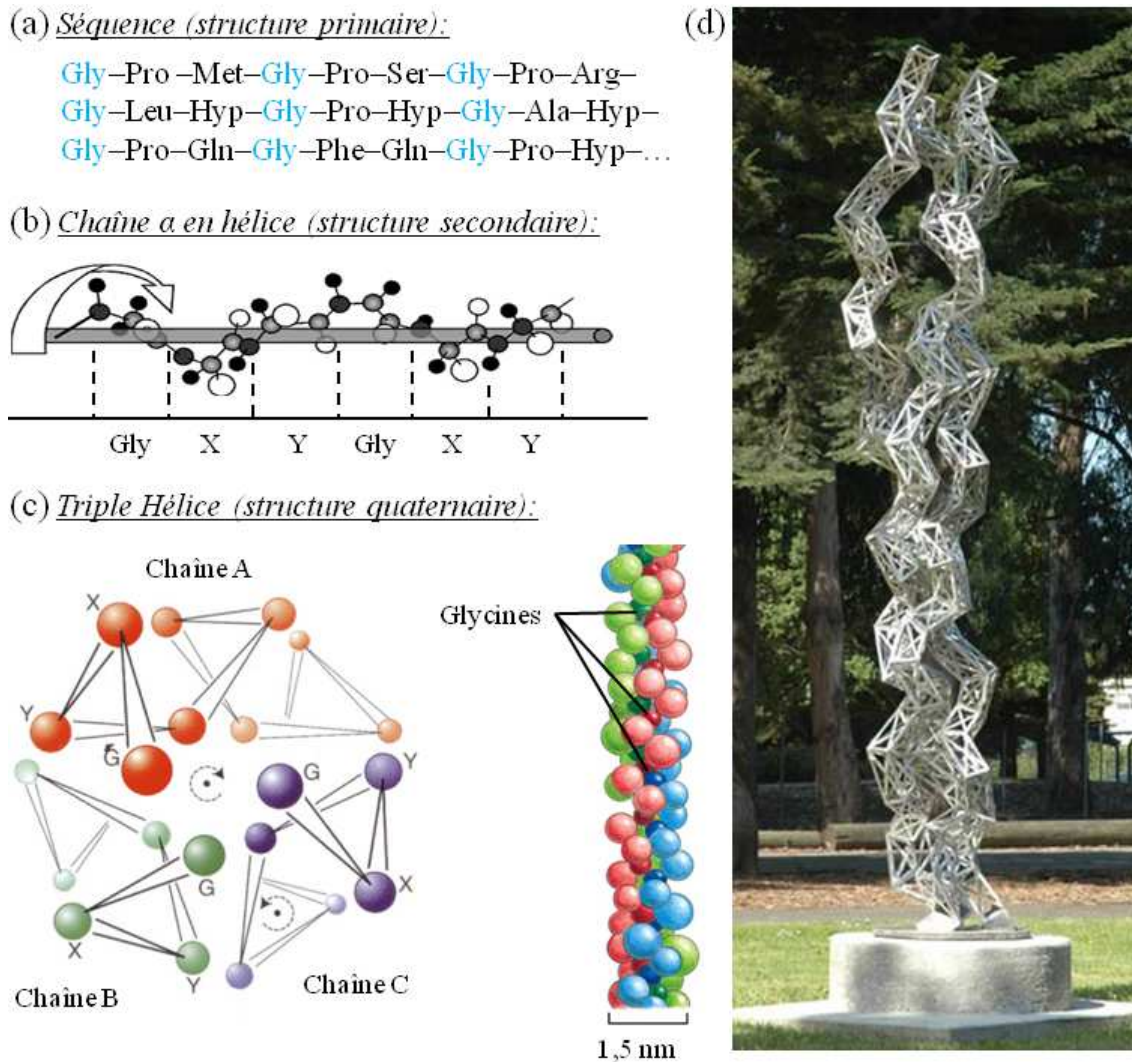


FIGURE I.2 – Structure protéique du collagène : (a) La structure primaire est la séquence d'acides aminés. On observe notamment une glycine tout les trois résidus. (b) Les structures secondaire et tertiaire de la molécule de collagène sont confondues et représentent l'enroulement en hélice gauche de la chaîne α [source : Benoît Leblanc, Université de Sherbrooke]. Enfin (c) la structure quaternaire de la molécule de collagène décrit son enroulement en triple hélice droite [Adapté de Beck et coll. [31]]. (d) Unraveling Collagen par Julian Voss-Andreas, sculpture représentant la triple hélice de collagène et ses lignes de force dominantes.

I.2.1.3 Structure quaternaire

La structure quaternaire des protéines décrit la manière dont différentes chaînes polypeptidiques s'associent pour former une molécule multimérique.

La molécule de collagène a une structure caractéristique atypique en triple hélice droite de $1,5\text{ nm}$ de diamètre et de pas $8,6\text{ nm}$ [31], résultant de l'association de trois chaînes α (figure I.2.c). Les chaînes latérales des acides aminés sont disposées radialement sur la surface cylindrique de la molécule. La glycine, étant le plus petit acide aminé, occupe la position centrale dans la triple hélice et sa chaîne latérale (ne contenant qu'un atome d'hydrogène) pointe vers l'intérieur, ce qui permet un assemblage très compact. À l'opposé les résidus des autres acides aminés (X et Y) pointent vers l'extérieur et sont donc accessibles pour des interactions avec le solvant et/ou les autres molécules de collagène.

La stabilité de la triple hélice est assurée par des liaisons hydrogènes entre les résidus de glycine d'une chaîne et les groupements carboxyles d'une autre ainsi que des liaisons covalentes. Pour les collagènes fibrillaires, le domaine en triple hélice est continu et s'étend sur environ 1011 acides aminés pour le type I, alors que pour les collagènes non-fibrillaires il est interrompu par des séquences non collagéniques. Suivant le type de collagène considéré, la triple hélice peut être constituée de trois chaînes α identiques (forme homotrimérique) ou de chaînes différentes (forme hétéotrimérique), assemblées par un mécanisme de type "fermeture éclair" (*zipper-like*) [33] depuis la région C-terminale jusqu'à la région N-terminale. Dans le cas du collagène de type I qui nous intéresse ici, la forme prédominante de la triple hélice est un hétéotrimère résultant de l'association de deux chaînes $\alpha_1(I)$ et d'une chaîne $\alpha_2(I)$ (table I.2).

I.2.2 Synthèse

Les gènes codant pour le collagène possèdent entre 3 et 17 exons et des sites d'initiation de la transcription variables. Par conséquent un gène est associé à plusieurs chaînes α .

Le collagène est produit dans l'ECM par une famille de cellules appelées fibroblastes. La chaîne α est synthétisée au niveau des ribosomes avant d'être sécrétée dans le réticulum endoplasmique. Le peptide signal à l'extrémité N-terminal est clivé et certains résidus sont hydrolysés (prolines et lysines) ou glycosylés (hydroxylysines). Enfin la formation de ponts disulfures entre les propeptides C-terminaux permet d'aligner trois chaînes α qui s'enroulent dans la direction N-terminale. Ceci permet un assemblage compact de 3 chaînes pour former une triple hélice droite, appelée procollagène, soluble dans le milieu physiologique. Les triples hélices de collagène sont alors empaquetées dans des vésicules, dans l'appareil de Golgi, et excrétées à l'extérieur de la cellule (figure I.3).

Après exocytose, les domaines globulaires N- et C-terminaux (dont la séquence n'est pas constituée d'une répétition de triplets $[Gly - X - Y]_3$) sont excisés par des peptidases spécifiques. La molécule résultant de ces diverses associations et modifications, le tropocollagène, est une protéine semi-flexible d'environ 300 nm de long et de $1,5\text{ nm}$ de diamètre, formant la structure élémentaire du collagène dans les tissus. Elle est constituée d'un long domaine en triple hélice et de deux courts domaines non hélicoïdaux (les télépeptides) aux extrémités du domaine collagénique.

I.2. Le collagène I

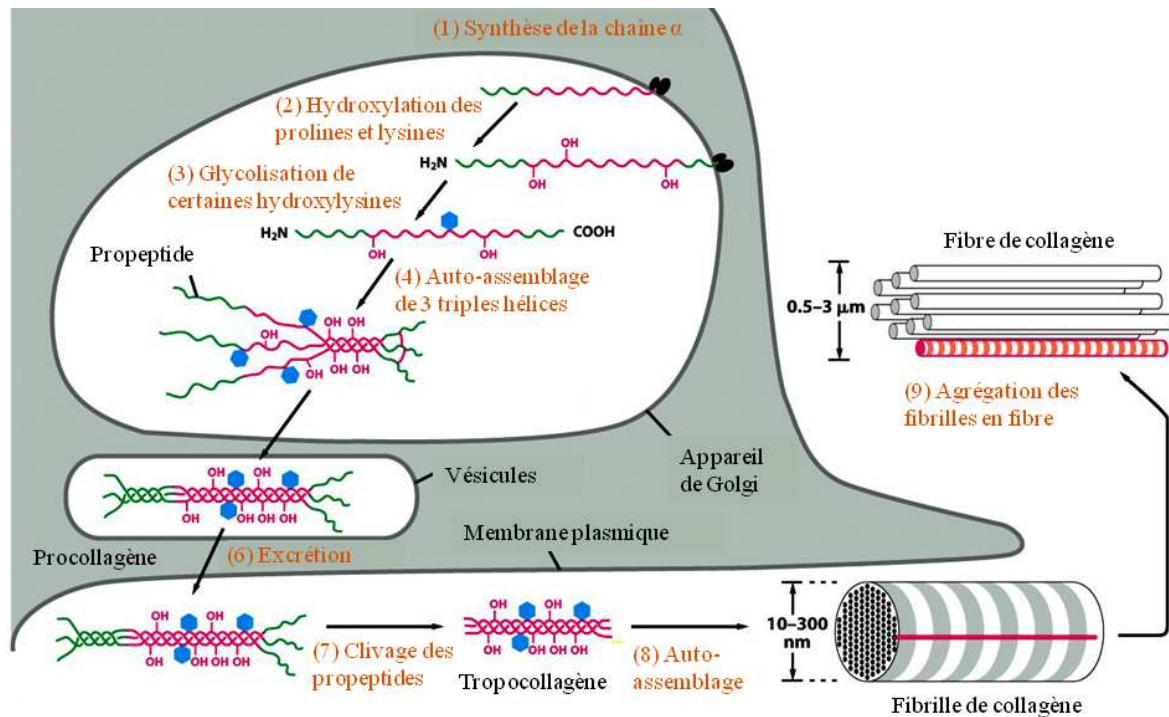


FIGURE I.3 – Synthèse du collagène *in vivo* : Toutes les étapes de structuration se font intra-cellule jusqu'à la formation de triples hélices qui sont alors excrétées dans le milieu physiologique. C'est l'excision des propeptides qui semble enclencher à ce stade la formation des fibrilles [Adapté de [34]].

I.2.3 Fibrillogenèse

Les triples hélices sont stables en solution à pH acide (≤ 5), à basses températures ($\leq 25^\circ\text{C}$) et faible force ionique ($\leq 600\text{ mM}$). À l'inverse, dans les conditions et concentrations physiologiques, le tropocollagène va spontanément s'assembler sous forme d'édifices supramoléculaires (fibrilles et fibres) qui vont charpenter l'ECM. Nous allons maintenant discuter de la structure et de la formation (fibrillogenèse) de ces édifices *in vivo* et *in vitro*.

I.2.3.1 Formation des fibrilles

Le processus de la fibrillogenèse *in vivo* est encore mal compris, d'autant plus qu'il est vraisemblablement intimement lié à la synthèse, au transport et aux modifications posttraductionnelles du collagène [27]. L'hypothèse la plus commune décrit la fibrillogenèse comme un processus extracellulaire d'auto-assemblage de triples hélices de collagène, principalement gouverné par des forces physico-chimiques classiques (électrostatiques). La diminution de la solubilité, liée à la perte des domaines C- et N-terminaux, enclenche le phénomène de fibrillogenèse. En effet, les propeptides ont été décrit comme des inhibiteurs de la fibrillogenèse *in vitro* et empêcheraient donc toute éventuelle formation de fibrilles intracellulaires [35].

Les liaisons hydrogènes permettent l'auto-assemblage en fibrilles et divers processus

biochimiques contribuent à stabiliser la structure par des interactions polaires, hydrophobes et non covalentes, voire par des réticulations covalentes (*cross-link*). Par exemple, une enzyme spécifique, la lysyl-oxydase, oxyde certains résidus près des télépeptides permettant la formation de liaisons covalentes à partir de la chaîne latérale des lysines ou des hydroxylysines [36, 37]. Dans certains type de collagène (III, IV, VI, VII), on trouve aussi des liaisons dissulfures intra- et intermoléculaires. Ces pontages stabilisent les molécules ce qui permet au tropocollagène de s'assembler en fibrilles de diamètres variables (typiquement entre 10 et 300 nm) et lui confèrent une très grande rigidité.

Bien que le collagène en soit le constituant majoritaire, l'ECM contient de nombreuses autres molécules biologiques régulant notamment la fibrillogenèse. Parmi ces molécules, les protéoglycanes² occupent le plus gros volume et forment un gel qui constitue la substance de base de l'ECM. Outre leur rôle mécanique de résistance à la compression, ils jouent un rôle dans la régulation du diamètre des fibrilles et de leur interdistance. Par ailleurs, *in vivo*, les fibrilles de collagène sont majoritairement hétérotypiques, c'est-à-dire qu'elles sont constituées de différents types de collagène associés, et il a été montré *in vitro* que des types de collagène minoritaires, notamment le type V, contribuaient à la régulation du diamètre des fibrilles (cf. V.1.1.3). Par exemple, les fibrilles de collagène dans la peau sont des assemblages des types I, III et V et celles du cartilage des assemblages des types II et XI.

Il est important pour la suite de noter que tous ces processus peuvent être reproduits *in vitro*. A pH acide, usuellement autour de 2, dans de l'acide acétique, le collagène est soluble (les fibrilles sont défaites) sous forme d'une solution de tropocollagène. Lorsque le pH est plus élevé (autour d'un pH neutre) les triples hélices s'arrangent spontanément en fibrilles similaires à celles observées dans les tissus.

I.2.3.2 Structure des fibrilles

Les modèles de structure des fibrilles de collagène ont principalement été proposés à partir de clichés de diffraction de rayons X et d'observations en microscopie électronique [38, 39, 40], permettant de déterminer l'organisation locale des molécules de collagène. La plus remarquable caractéristique structurale des fibrilles de collagène est le décalage axial périodique des triples hélices résultant directement de la structure primaire du collagène. Comme nous l'avons vu (cf. I.2.1.1), la séquence du tropocollagène présente une accumulation de résidus polaires tous les 234 ± 1 acides aminés, ce qui correspond à une période $D = 67$ nm. Ces résidus permettent l'accrétion des triples hélices pour former des fibrilles. Comme la longueur des molécules (300 nm) correspond à $4,48D$, soit une valeur non-entière, il faut un espace vide résiduel entre deux molécules de tropocollagène alignées. Il existe donc des régions distinctes plus ou moins denses, respectivement les *overlaps* (zones de recouvrement de 20 nm de long) et les *gaps* (zones vides de 47 nm de long), régulièrement réparties le long des fibrilles (figure I.4.a-b). Ce décalage périodique axial des triples hélices permet de former des réticulations dans les zones de recouvrement, et confère aux fibrilles de collagène une bonne résistance mécanique à la traction (module d'Young 2 à 7 Gpa) [41, 42, 43, 44].

En microscopie électronique à transmission, ce décalage périodique donne lieu à une

2. Les protéoglycanes résultent de la combinaison d'une protéine et de glycosaminoglycanes (chaînes polysaccharidiques non ramifiées).

I.2. Le collagène I

alternance caractéristique de bandes claires et de bandes sombres. Cette striation est particulièrement visible lorsque l'échantillon a été traité en coloration négative (le plus souvent à l'acétate d'uranyle), du fait de la haute concentration en éléments lourds dans les gaps (cf. I.3.1.2).

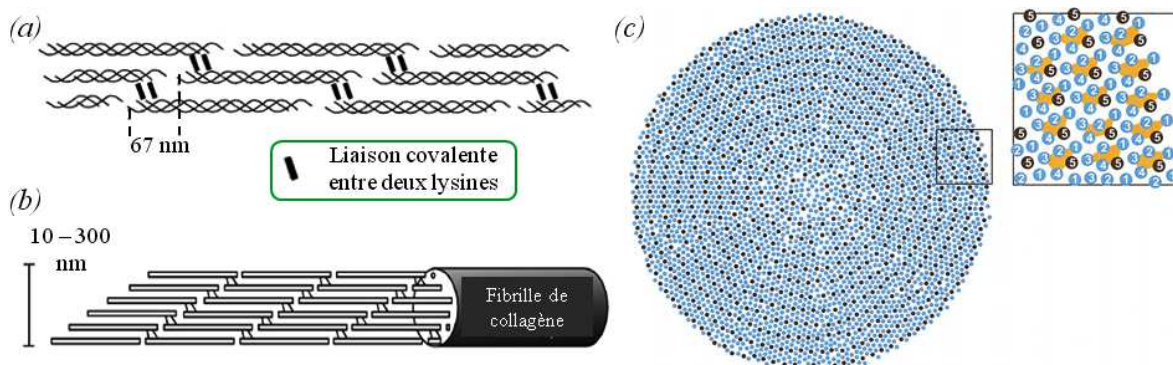


FIGURE I.4 – Assemblage fibrillaire des triples hélices : (a) *Décalage longitudinal des triples hélices permettant de former des réticulations dans les zones de recouvrement* [source : Benoît Leblanc, Université de Sherbrooke], (b) *Arrangement en fibrilles* [ibid.] et (c) *Coupe transverse montrant une répartition quasi-concentrique de triples hélices. Dans ce modèle 5 molécules occupent 12 nm^2 (zone en jaune)* [source : Hulmes et coll.[39]].

L'organisation latérale des molécules de collagène à l'intérieur des fibrilles reste, quand à elle, plus floue. Certaines études montrent que cette organisation a des propriétés cristallines, ce qui a conduit à la proposition de modèles de microfibrilles constituant des sous-unités hélicoïdales formées de 4 ou 5 triples hélices [39] (figure I.4.c). D'autres indiquent que, bien qu'il n'y ait pas d'ordre à grande distance, il y aurait un arrangement des molécules sur un réseau quasi-hexagonal à courte distance [40]. En outre, l'ordre latéral semble dépendre drastiquement du type de tissu étudié.

I.2.4 Structure hiérarchique dans les tissus

Les différentes fibrilles peuvent de plus s'associer entre elles, ainsi qu'à d'autres protéines (comme les protéoglycanes), pour former des entités supramoléculaires : les fibres. Le mécanisme de formation des fibres de collagène, relativement complexe, n'est pas totalement éclairci à ce jour, car quelques aspects de la genèse des fibres sont encore à définir, tels que l'arrangement des fibrilles de différents types de collagène les unes par rapport aux autres ou le contrôle de leurs proportions respectives. Par exemple, *in vivo* le diamètre des fibres est finement contrôlé par des protéoglycanes, tels que la décorine, qui entourent les fibrilles de collagène pour les associer aux autres molécules du tissu conjonctif.

En résumé, l'étude du collagène fait intervenir un grand nombre de niveaux hiérarchiques (figure I.5) depuis la séquence particulière d'acides aminés jusqu'à la formation d'un tissu vivant complexe, tel que l'os ou la cornée, en passant par l'auto-assemblage en fibrilles hautement organisées.

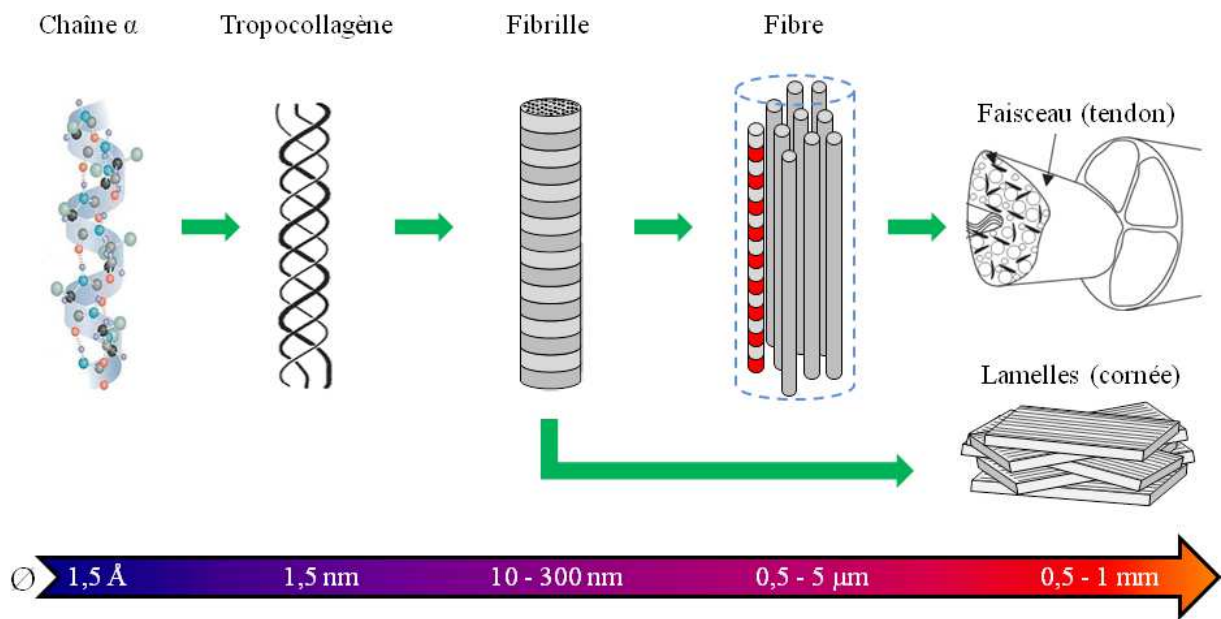


FIGURE I.5 – Structure hiérarchique du collagène fibrillaire dans les tissus : Schéma des différentes structures, de l'échelle nanométrique (chaîne α) à l'échelle millimétrique (lamelles, faisceaux...).

Les fibres de collagène définissent la forme des tissus vivants et sont à l'origine de leur stabilité thermique et de leur résistance mécanique. Elles peuvent atteindre plusieurs millimètres de long et leur diamètre varie de quelques centaines de nanomètres à quelques microns suivant le stade de développement et le tissu considéré.

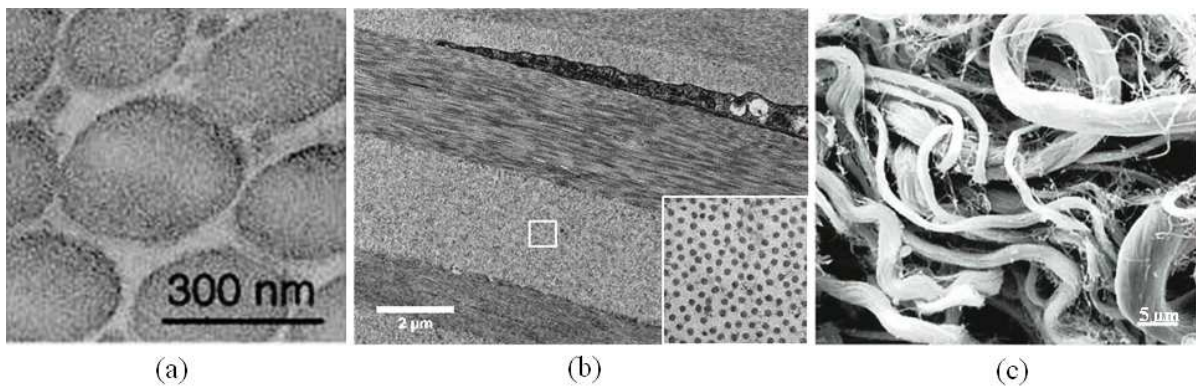


FIGURE I.6 – Exemples d'organisations du collagène dans les tissus : (a) Image TEM de tendon (fibrilles unidirectionnelles) [source : Komai et coll.[45]], (b) Image TEM de cornée (organisation en lamelles superposées) [source : Michèle Salvotelli, Hôpital de l'Hôtel-Dieu], et (c) Image TEM de la peau (structure collagénique très désordonnée) [source : Ushiki et coll. [46]].

On trouve les collagènes fibrillaires principalement dans la peau (40%), les os (10–20%), les cartilages, les tendons, ainsi que dans l'œil. Les fibrilles de collagène sont non seulement

I.3. Techniques conventionnelles d'imagerie du collagène

responsables de la rigidité d'un tissu, mais aussi de son architecture 3D spécifique qui lui confère des propriétés particulières visant à répondre de façon optimale à ses fonctions. On peut citer en exemple la structure unidirectionnelle ondulée des tendons (figure I.6.a), le "contreplaqué" de la cornée (figure I.6.b), contribuant à sa transparence, la structure hélicoïdale de l'os compact ou à l'opposé les fibrilles de collagène très enchevêtrées dans les viscères et le derme (figure I.6.c).

Une mauvaise conformation du collagène peut provoquer des dysfonctionnements dans les phénomènes d'assemblage à l'origine de graves pathologies, souvent d'origines génétiques. Parmi les plus connues, citons le scorbut, l'ostéogenèse imparfaite (ou maladie des "os de verre") ou encore le syndrome d'Ehler-Danlos qui se manifeste par une hyperélasticité des tissus (d'où le nom de syndrome de "l'homme caoutchouc"). De manière plus physiologique, les réticulations de fibrilles de collagène, dont le nombre augmente avec l'âge, participent aux processus de vieillissement des tissus.

I.2.5 Dénaturation du collagène I

A haute température, les liaisons peptidiques ne sont évidemment pas rompues, mais la structure en triple hélice est perdue. Les chaînes α adoptent alors une conformation en pelote statistique³. On obtient ainsi de la gélatine dont les propriétés remarquables ont permis de multiples applications dans des domaines aussi divers que la photographie ou l'agroalimentaire⁴. La gélatine est liquide à haute température et forme un gel quand elle est refroidie. En effet, au-dessus d'une température de transition ($\sim 50^\circ\text{C}$), les chaînes α sont emmêlées mais peuvent facilement glisser les unes par rapport aux autres, tandis qu'en dessous de cette température, des domaines en triples hélices se reforment agissant comme autant de points de blocage. Toutefois, les triples hélices se forment aléatoirement et uniquement localement, sans jamais reformer de véritables molécules de collagène. La dénaturation du collagène est donc irréversible et toutes ses propriétés d'auto-assemblage sont définitivement perdues.

In vivo, la dégradation du collagène est essentiellement réalisée par des métalloprotéases [47] et notamment les collagénases qui digèrent spécifiquement les collagènes fibrillaires et dont le mode d'action est encore mal connu. D'autres métalloprotéases (MMP-2 et MMP-9) ne digèrent quant à elles que les collagènes déjà dénaturés.

I.3 Techniques conventionnelles d'imagerie du collagène

A l'heure actuelle, il existe de nombreuses modalités d'imagerie biomédicale telles que les techniques cliniques (radiographie, scanner X, échographie, IRM, tomographie à émission de positons...), la microscopie électronique ou les microscopies optiques (confocale, multiphoton, OCT...). A partir de ce large panel de procédés d'imagerie disponible (figure I.7), et en fonction de l'application considérée, il est généralement nécessaire de faire un compromis entre l'invasivité et la résolution de la technique utilisée. Ainsi, loin d'être en concurrence ces modalités d'imagerie apparaissent, au contraire, complémentaires.

3. Une pelote statistique est une conformation d'un polymère dans laquelle les unités monomères sont orientées aléatoirement, tout en étant liées aux unités adjacentes.

4. Il suffit de cuire des carcasses animales pour obtenir de la gélatine en grandes quantités. La production mondiale est d'environ 320 000 tonnes par an.

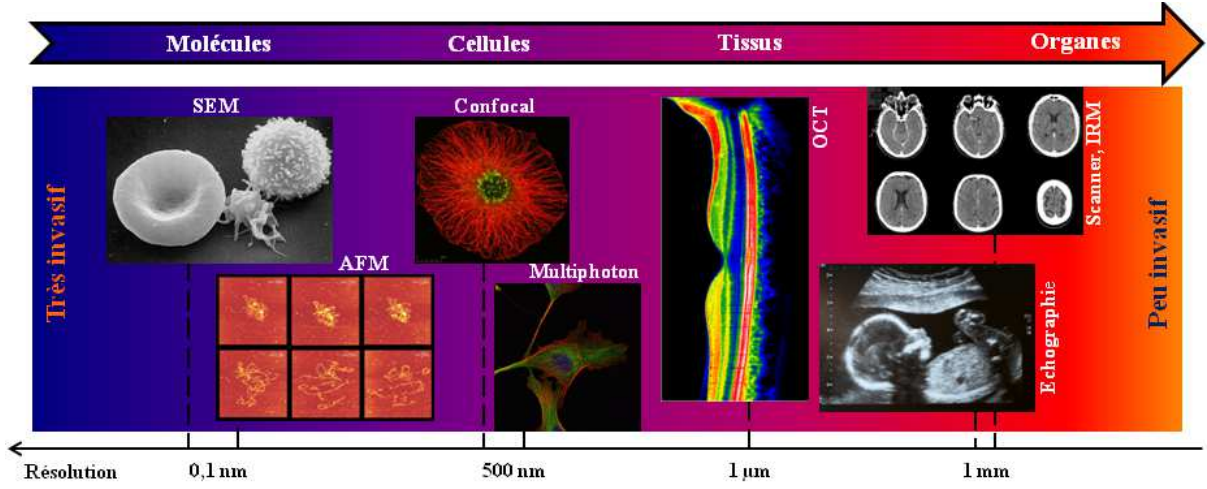


FIGURE I.7 – Imagerie biomédicale : Échelles accessibles par différentes techniques d'imagerie en biologie. Il y a communément un compromis à faire entre l'invasivité d'une technique et sa résolution [adapté de D. Débarre [48]].

Nous nous cantonnerons ici à la description des principales méthodes de visualisation du collagène, en partant des techniques les plus résolutes (TEM, AFM) pour aller vers les techniques d'imagerie optiques permettant des études *in vivo*.

I.3.1 Microscopie électronique

I.3.1.1 Principe

Dans un microscope électronique, un faisceau est généré par un canon à électrons (filament de tungstène, pointe LaB₆...) et accéléré par une différence de potentiel entre la source et une anode, puis focalisé par des lentilles magnétiques (figure I.8.a). Le faisceau d'électrons interagit avec l'échantillon offrant un contraste spatial qui résulte de différences de densité ou de composition chimique et permet d'imager celui-ci. On obtient finalement une image en utilisant, par exemple, un écran phosphorescent couplé à un capteur CCD. L'ensemble est placé sous vide à des pressions variant de 10^{-7} mbar pour le détecteur CCD à 10^{-10} mbar pour la source d'électrons. Il est nécessaire que le vide dans la colonne soit très poussé pour éviter les interactions entre le faisceau électronique et les molécules résiduelles.

Comme pour la microscopie optique, la limite ultime de résolution d'un TEM est donnée par la longueur d'onde des électrons qui est directement reliée à la tension d'accélération U par :

$$\lambda_e = \frac{h}{\sqrt{2m_0eU(1 + \frac{eU}{2E_0})}} \quad (\text{I.1})$$

où h , e , m_0 et E_0 sont respectivement la constante de Planck, la charge, la masse et l'énergie au repos de l'électron ($E_0 = m_0c^2 = 511$ keV). Par exemple, à 100 kV la longueur d'onde du faisceau d'électron est de 3,70 pm. Cependant, contrairement aux microscopes optiques, la résolution n'est pas limitée par la longueur d'onde, mais par les aberrations

I.3. Techniques conventionnelles d'imagerie du collagène

géométriques (sphériques, astigmatisme), chromatiques ou de charge d'espace (dus aux répulsions coulombiennes dans le faisceau). En pratique, la résolution actuelle est de l'ordre de l'angström (jusqu'à 0,8 Å). C'est l'une des seules techniques (avec l'AFM) pour observer des modifications structurales à l'échelle nanométrique.

Les applications de la microscopie électronique sont extrêmement variées, de l'observation d'échantillons biologiques à l'analyse de matériaux industriels dans la métallurgie ou l'industrie des semi-conducteurs. La microscopie électronique est utilisée pour imager le collagène, depuis les années 1940 [49, 50], particulièrement pour étudier sa structure au niveau moléculaire. Elle permet notamment d'observer la striation caractéristique de 67 nm du collagène fibrillaire résultant de l'empaquetage des triples hélices [51, 52] (figure I.8.b-c).

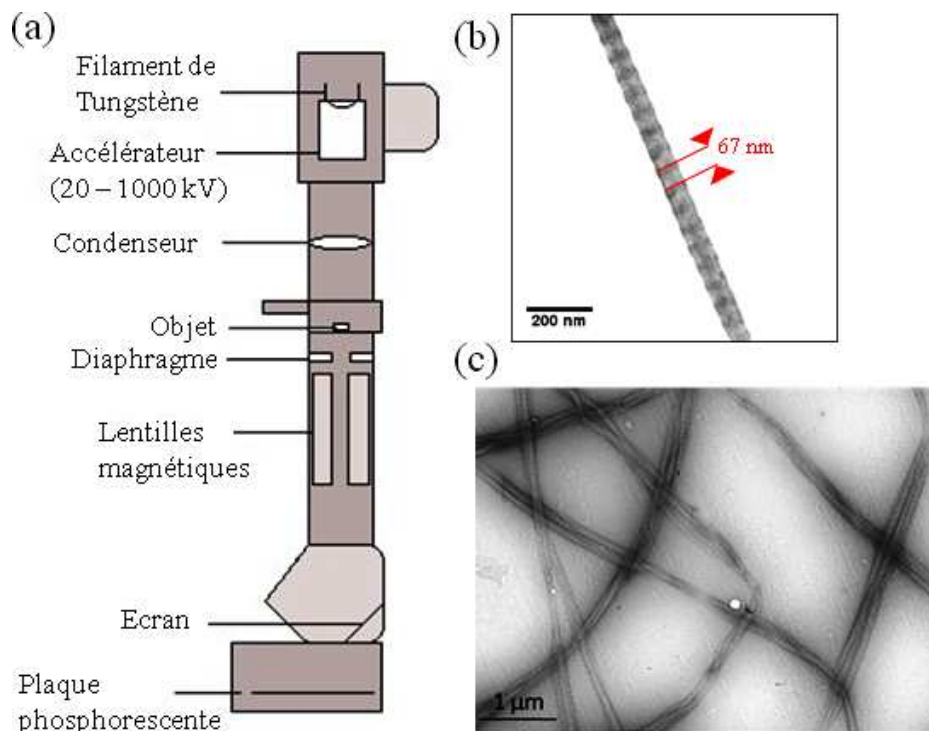


FIGURE I.8 – Microscope électronique : (a) Schéma d'un microscope électronique à transmission (TEM), (b) et (c) images de fibrilles de collagène [source : C. Aimé, LCMCP et L. Howard, Université de Dartmouth, respectivement]. On y distingue bien la striation caractéristique de 67 nm.

I.3.1.2 Préparation des échantillons

En contrepartie l'imagerie TEM impose des contraintes draconiennes à la préparation des échantillons. Tout d'abord, pour être imagé en transmission, l'échantillon doit être quasi-transparent aux électrons et donc ultra-mince. Il n'existe pas de critère simple définissant l'épaisseur critique d'un échantillon. Seulement, pour une bonne observation, le faisceau transmis doit conserver un bon degré de collimation et une dispersion énergétique faible. Pour cela on utilise des tranches d'échantillons très fines (40 à 90 nm) coupées avec un ultramicrotome.

Les échantillons devant être placés sous vide, il est nécessaire de stabiliser leur structure macromoléculaire, soit par congélation (cryofracture et cryo-TEM), soit par fixation chimique (par exemple au formaldéhyde ou au glutaraldéhyde) et déshydratation. Ils sont ensuite intégrés dans des résines (telles que l'époxy) avant d'être, après la polymérisation, sectionnés et éventuellement colorés. Les échantillons sont ensuite déposés sur une grille métallique recouverte d'un film de carbone fin. En outre, l'échantillon doit être conducteur, pour éviter l'accumulation de champs électrostatiques locaux, due à l'irradiation d'électrons au cours de l'imagerie. Pour pallier ce problème, il faut parfois déposer une fine couche conductrice, par évaporation ou pulvérisation sous vide. Enfin, dans le cas d'échantillons biologiques quasi-transparents aux électrons, car composés d'éléments organiques légers, on utilise souvent une coloration négative pour rehausser le contraste des images. Pour cela on métallise la grille en ajoutant des sels d'atomes lourds (tétroxyde d'osmium, acétate d'uranyle...), qui dévient les électrons, faisant apparaître des zones sombres sur le détecteur.

Tous ces processus de fixation interdisent l'étude dynamique des échantillons. De plus, les doses d'irradiation sont rédhibitoires pour tout espoir d'applications *in vivo*. Enfin, la microscopie électronique offre un champ de vue relativement restreint ne permettant d'obtenir que des informations locales.

I.3.2 Microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (AFM) est une technique d'imagerie utilisant une pointe (le cantilever) pour balayer la surface d'un échantillon. Les résolutions obtenues sont similaires à celle de la microscopie électronique (quelques angströms), cependant le champ de vue est plus petit (inférieur à $150\ \mu\text{m}^2$) et la dénivellation dans l'échantillon ne peut excéder quelques micromètres. Néanmoins, contrairement à la microscopie électronique, l'AFM ne nécessite aucune préparation délicate de l'échantillon et permet même de travailler en milieu liquide et/ou sur des échantillons vivants [53].

L'AFM est utilisée pour imager le collagène depuis 1990 [54, 55, 56] et permet des mesures en spectroscopie de force ($\sim$ quelques $p\text{N}$) autorisant l'étude de réponses contrainte-déplacement à l'échelle nanométrique. Elle a notamment été utilisée pour des essais mécaniques sur des molécules de collagène extraites de fibrilles [57]. Comme elle ne nécessite pas de préparation spécifique, l'AFM peut être utilisée pour calibrer des techniques moins résolutes telles que la génération de seconde harmonique (SHG) [58].

I.3.3 Colorations histologiques et immunohistochimiques

Les marquages histologiques utilisent des colorants, qui se fixent spécifiquement sur certaines molécules, permettant la visualisation de différents constituants. Il suffit ensuite de regarder l'échantillon avec un microscope en lumière blanche pour en révéler la structure. Ces techniques demeurent la référence pour évaluer l'état pathologique d'un tissu en milieu hospitalier. Néanmoins ces méthodes s'appliquent presque exclusivement à des coupes minces et obligent à travailler *ex vivo*.

La procédure standard pour observer des lames histologiques est la suivante. L'échantillon est d'abord fixé (le plus souvent dans du paraformaldéhyde) juste après son prélèvement. Il est ensuite inclus dans un bloc de paraffine et coupé en tranches fines (moins

I.3. Techniques conventionnelles d'imagerie du collagène

de 10 μm d'épaisseur), à l'aide d'un microtome⁵. Les lames sont finalement déparaffinées et réhydratées avant d'être observée sous le microscope et conservée.

Pour les tissus conjonctifs, les principaux colorants sont l'Hématoxyline Éosine Safran (HES) [59], le trichrome de Masson [60] et le Picro-Sirius ou rouge Sirius [61]. Pour ce dernier, le Sirius F3B dilué dans de l'acide picrique colore la matrice extracellulaire en rouge sur fond jaune (figure I.9.a). Les molécules de rouge Sirius s'alignent le long des fibres de collagène, et augmentent ainsi leur biréfringence [62]. Il est alors possible de visualiser spécifiquement le collagène fibrillaire avec un système de polariseurs croisés (figure I.9.b) [63].

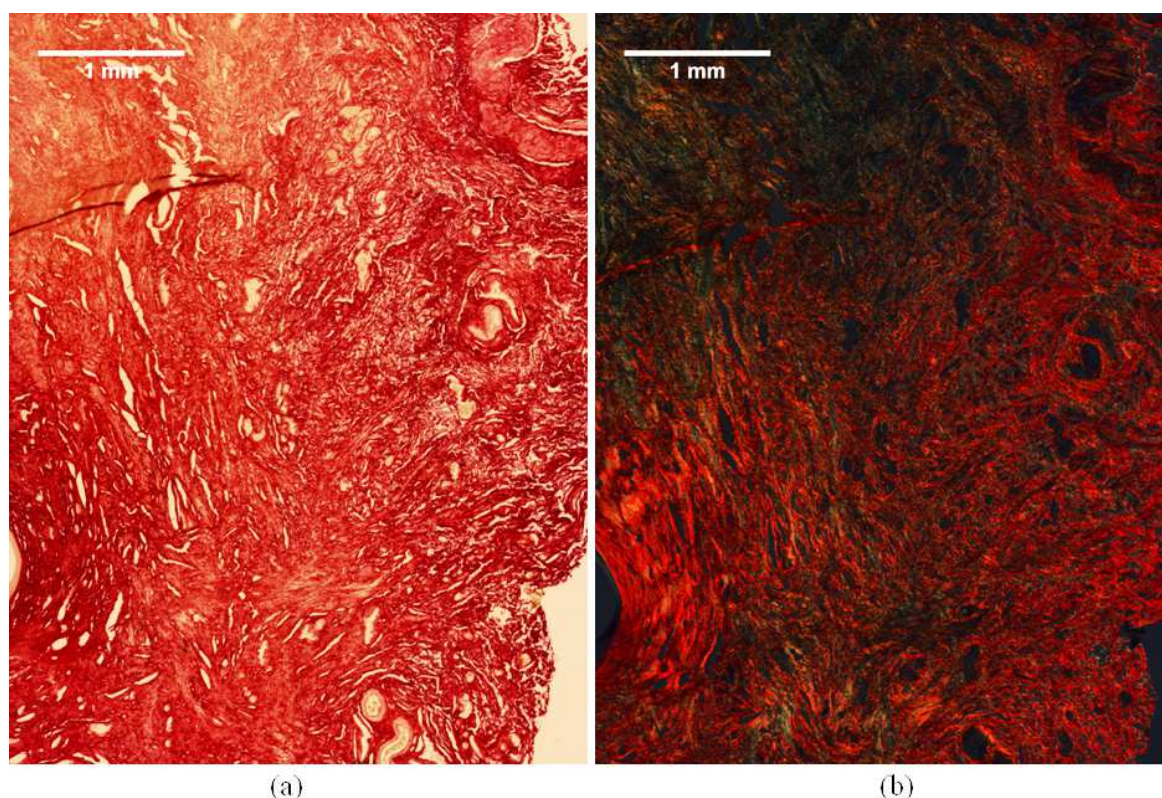


FIGURE I.9 – Coupe histologique : *Images de paroi vaginale marquée au rouge Sirius et observée (a) en lumière blanche et (b) entre polariseurs croisés. [Observation au Zeiss-Axio observer, Objectif A-plan 10x/0.254 NA].*

L'autre technique de marquage usuelle, l'immunohistochimie, consiste à utiliser des anticorps au lieu de colorants chimiques pour marquer spécifiquement des protéines, des carbohydrates ou des lipides. La présence des anticorps dans l'échantillon peut être révélée en y fixant des molécules spécifiques telles que des gènes rapporteurs ou des fluorophores. Dans la plupart des cas cette technique offre une bonne spécificité car des anticorps peuvent être, en théorie, obtenus pour tous les antigènes. Ainsi, il est possible de marquer spécifiquement un type de collagène particulier (par exemple le collagène V). Toutefois, à cause des domaines en triples hélices très similaires, inhérents à tous les types de collagène, cette technique n'est, en pratique, pas toujours spécifique dans les tissus. De surcroît la

5. Une autre technique classique consiste à cryogéniser l'échantillon et à le couper au cryomicrotome.

préparation des échantillons passant par différentes étapes, aux résultats parfois variables, l'immunohistochimie est relativement peu reproductible et donc non quantitative. Elle présente de plus la même limitation que la coloration histologique. En effet, même s'il est possible d'utiliser des anticorps dans les conditions physiologiques, leur coût et leur faible profondeur de pénétration dans les tissus limitent majoritairement cette technique à des coupes minces fixées, ce qui perturbe significativement l'échantillon. Enfin, la fixation au formol étant en général impossible (car les anticorps reconnaissent la structures des protéines, modifiées par le formaldéhyde) les échantillons ne peuvent être conservés sur de longues périodes.

I.3.4 Microscopie de fluorescence

La fluorescence peut-être observée avec différentes techniques optiques : des techniques plein champ, des techniques d'endoscopie (permettant des applications *in vivo*), ou des techniques offrant une localisation 3D comme la microscopie confocale de fluorescence. On ajoute souvent aux microscopes de fluorescence des modules de détection résolus spectralement ou temporellement autorisant des études spectroscopiques qui permettent de discerner différentes molécules fluorescentes. Le confocal demeure aujourd'hui la référence en microscopie optique appliquée à des tissus. En particulier l'apparition récente d'endoscopes confocaux (*Mauna Kea Technologies*) a permis des applications *in vivo in situ* sur des tissus tels que l'œsophage [64], les bronches [65, 66] ou le rein [67], notamment pour des diagnostics cancéreux.

Les fibres de collagène peuvent être visualisées grâce à leur fluorescence intrinsèque, bien qu'il semble que ce soient plus les liaisons covalentes entre molécules que les molécules elles mêmes qui fluorescent [68]. Cependant les signaux de fluorescence endogène restent extrêmement faibles et non spécifiques. En effet, il existe de nombreuses autres molécules fluorescentes dans les tissus (NAD(P)H, élastine...) et il n'est pas toujours évident, même par une mesure spectroscopique, de différencier les signaux émis par le collagène de ceux provenant des autres composants de l'échantillon.

Pour visualiser plus spécifiquement le collagène, il peut être utile d'avoir recours à des fluorophores exogènes, qui se fixent au collagène, tels que la dichlorotriazylène aminofluoresceine (DTAF) [69] ou des anticorps (cf. 1.3.3).

I.3.5 Microscopie en lumière réfléchie (OCT, confocal de réflectance)

Un autre moyen de visualiser le collagène est de mesurer la fraction de lumière réfléchie par les fibrilles (figure I.10.a). Les avantages des techniques de microscopie en lumière réfléchie sont qu'elles ne nécessitent aucune préparation de l'échantillon, permettent une visualisation 3D et peuvent atteindre des vitesses d'acquisition vidéos (dans le cas de l'OCT).

En particulier la tomographie par cohérence optique (OCT) est une technique interférométrique permettant d'obtenir des images 3D de tissus opaques ou translucides. La source de contraste en OCT est la réflectivité de certaines couches de l'échantillon (figure I.10.b). Il est notamment utilisée pour étudier la structure de la cornée ainsi que ses différentes pathologies [70, 20, 19] et propose une alternative prometteuse pour l'étude

I.3. Techniques conventionnelles d'imagerie du collagène

d'autres tissus (tendon, peau...). L'OCT offre une relativement bonne résolution axiale (environ $1\ \mu\text{m}$) sans utiliser de lentilles à forte ouverture numérique (qui imposent une distance de travail courte), ce qui lui donne un avantage par rapport à la microscopie confocale en permettant une imagerie nette d'objets relativement éloignés, tel que la rétine à travers la pupille [71].

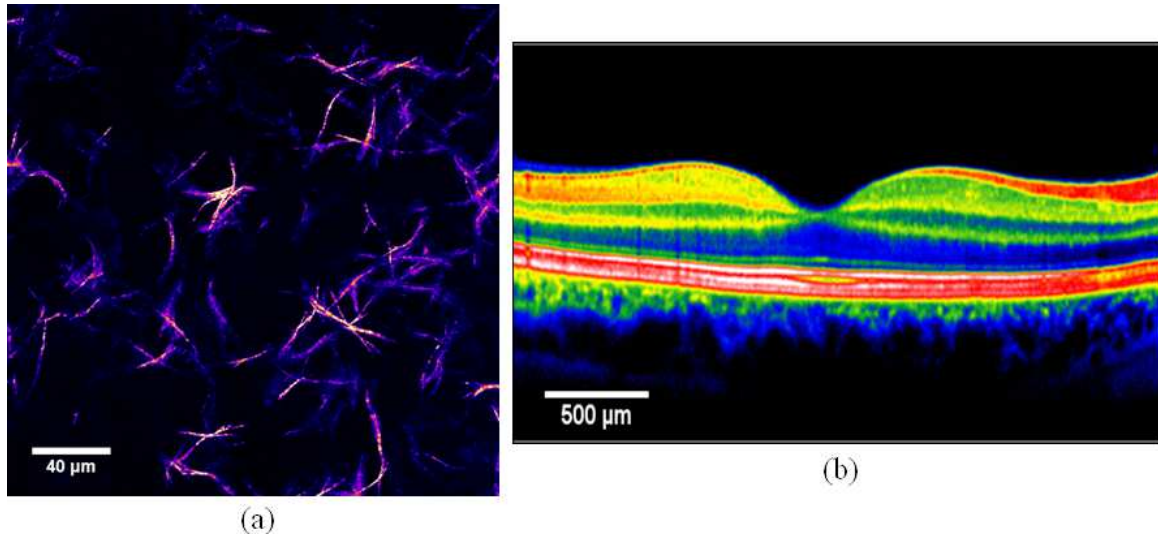


FIGURE I.10 – Microscopie en lumière réfléchie : (a) *Gel de collagène observé en confocal de réflectance [source : C. Aimé, LCMCP et J. Teillon, Collège de France]* et (b) *Rétine humaine imagée en OCT [source : www.oct.ophtalmo.fr/Heidelberg]*.

En contrepartie, la microscopie en lumière réfléchie n'est pas spécifique du collagène fibrillaire. Elle a néanmoins été utilisée pour étudier la fibrillogenèse *in vitro* [72].

I.3.6 Microscopie en lumière polarisée

La microscopie en lumière polarisée (PLM) utilise la variation de biréfringence dans l'échantillon comme source de contraste. Elle est très employée pour étudier différentes phases organisées de cristaux liquides de divers composants, notamment le collagène en solution acide [73, 74]. La PLM est aussi employée pour visualiser et analyser les ondulations caractéristiques (*crimp*) dans les faisceaux de fibrilles des tendons [75]. La PLM a l'avantage de ne nécessiter aucune préparation spécifique et permet d'imager des échantillons d'épaisseurs variables, sans toutefois offrir une résolution axiale. Toutefois, le couplage de la polarimétrie avec des techniques confocales peut permettre de pallier, de manière ampliative, le manque de spécificité ou l'absence de sectionnement optique. Cependant le collagène étant une molécule relativement peu biréfringente, il est parfois inévitable (notamment dans le cas de lames minces) de faire un marquage au rouge Sirius (cf. I.3.3) pour augmenter le contraste en polarisation [76]. Notons enfin que des développements sont en cours pour adapter aux échantillons biologiques des méthodes d'analyse plus poussées telles que l'ellipsométrie de Mueller.

I.4 Conclusion : place de la microscopie multiphoton

Il est finalement possible de situer la microscopie multiphoton par rapport aux autres techniques d'imagerie couramment utilisées dans le domaine biomédical (figure I.7). Par exemple, la microscopie électronique permet d'observer un niveau de détail nanométrique inégalable dans les échantillons, mais n'est pas adaptée pour travailler sur un tissu vivant. A l'opposé, l'échographie est pratiquée quotidiennement sur des patient(e)s de par son faible coût et sa vitesse d'acquisition vidéo, mais ne permet pas d'obtenir une résolution micrométrique. Ceci nous permet donc de délimiter grossièrement les applications pour lesquelles la microscopie non-linéaire sera pertinente. Sa mise en œuvre étant plus complexe que la microscopie confocale, elle est généralement moins adaptée pour l'imagerie cellulaire. En revanche, du fait de sa bonne pénétration dans les tissus (cf. II.1.5.1) et de sa bonne spécificité (dans le cas de la SHG, cf. II.2.3.3), elle permet d'observer des signaux endogènes dans des échantillons épais (organes entiers, petits organismes) avec une résolution tridimensionnelle (cf. II.1.3) meilleure que l'OCT, ou d'autres techniques non optiques (RMN, échographie), tout en demeurant suffisamment peu invasive pour travailler *in vivo in situ* ou observer des phénomènes dynamiques.

Au cours des deux dernières décennies, la microscopie multiphoton est devenue une technique classique pour l'imagerie de tissus biologiques. Nous allons maintenant nous attacher à décrire les processus de génération de seconde harmonique dans les tissus et notamment à partir du collagène fibrillaire.

Les devises Shadok



IL VAUT MIEUX POMPER MÊME S'IL NE SE PASSE
RIEN QUE RISQUER QU'IL SE PASSE QUELQUE CHOSE
DE PIRE EN NE POMPANT PAS.

Chapitre II

Microscopie multiphoton

Les miroirs feraient bien de réfléchir un peu plus avant de renvoyer les images

- Jean Cocteau

Sommaire

II.1 Microscopie non-linéaire : fluorescence excitée à deux photons	26
II.1.1 Principe	26
II.1.2 Pré-requis	27
II.1.3 Résolution spatiale	28
II.1.4 Signaux	30
II.1.5 Avantages et inconvénients	31
II.2 Génération de seconde harmonique (SHG)	38
II.2.1 Principes et mécanismes	39
II.2.2 Rôle de la cohérence	47
II.2.3 Origine de la SHG du collagène	53
II.3 Dispositif expérimental	59

La microscopie multiphoton (MPM), ou microscopie optique non-linéaire, est un ensemble de techniques d'imagerie optique utilisant des processus non-linéaires comme sources de contraste dans des échantillons biologiques. Le mécanisme à l'origine du développement de la MPM est la fluorescence excitée à deux photons (2PEF). Depuis son introduction en 1990 dans un papier séminal de W. Denk, J. Strikler et W. Webb [1] la 2PEF s'est considérablement développée et est devenue aujourd'hui un outil de premier choix pour l'imagerie *in vivo* en biologie [77, 78]. Avec le temps, la MPM s'est enrichie de nouveaux modes de contraste s'appuyant sur différents processus non-linéaires. Tout d'abord, la génération de seconde harmonique (SHG), mise en évidence en 1961 par P. Franken [79] a été appliquée au collagène en 1979 par S. Roth et I. Freund [80] et développée pour l'imagerie en 1986 [81]. En 1997, Y. Sylberberg [82] a mis en œuvre la génération de troisième harmonique (THG). Enfin, même si elle fut démontrée initialement en 1982 par M. Duncan [83], la diffusion Raman anti-Stokes cohérente (CARS) n'a pris son essor que récemment en microscopie.

La MPM connaît un grand nombre d'applications notamment en neurosciences [84] ou en biologie du développement [7, 85, 86]. L'utilisation de processus non-linéaires pré-

sente différents avantages tels qu'une faible invasivité, la capacité à détecter des signaux endogènes variés, une résolution 3D intrinsèque et une grande profondeur de pénétration dans les tissus.

II.1 Microscopie non-linéaire : fluorescence excitée à deux photons

L'absorption simultanée de deux photons par une molécule a été prédite théoriquement en 1931 par M. Goeppert-Mayer [87] et les principes d'optique non-linéaire sous-jacents sont aujourd'hui amplement détaillés dans les livres de R. Boyd [88] et Y.-R. Shen [89]. Cependant seuls les développements technologiques récents, notamment des sources laser à impulsions ultrabrèves, ont permis l'avènement de la microscopie biphotonique (i.e. à deux photons) [1], particulièrement intéressante pour l'imagerie biologique. La fluorescence excitée à 2 photons est de loin la technique non-linéaire la plus répandue et a été commercialisée la première par Bio-Rad en 1996. Aujourd'hui de nombreux constructeurs (Zeiss, Leica, Nikon, Olympus...) produisent des microscopes bi-photons commerciaux.

Dans tout ce manuscrit, nous allons nous concentrer sur les interactions non-linéaires dites bi-photoniques, qui sont de deux natures possibles : fluorescence excitée à deux photons (régie par un $\chi^{(3)}$) ou génération de seconde harmonique (régie par un $\chi^{(2)}$). En tant que technique d'imagerie optique 3D, nous les comparerons tout naturellement à la microscopie confocale.

II.1.1 Principe

Les microscopes de fluorescence conventionnels (1PEF) reposent sur l'absorption d'un photon dont l'énergie $\hbar\omega$ fait passer ($\sim 10^{-15}$ s) un fluorophore de son état fondamental ($|g\rangle$) à un état électronique d'énergie supérieure ($|e\rangle$), dans un état vibrationnel excité. Pour que cette transition ait lieu, l'énergie du photon incident doit être ajustée à l'énergie de la transition moléculaire entre $|g\rangle$ et $|e\rangle$ (figure II.1.a). Une fois dans cet état excité, la molécule va relaxer ($\sim 10^{-10}$ s) au plan vibrationnel, puis se désexciter ($\sim 10^{-9}$ s), et retourner à son niveau fondamental $|g\rangle$, soit par l'émission d'un photon de fluorescence, soit par un effet non radiatif. Les chromophores utilisés habituellement en biologie s'excitent dans le proche UV ou le bleu (autour de 480 nm) alors que leur fluorescence est plutôt dans la partie verte à rouge du spectre (500–700 nm). Dans certains cas, la molécule peut passer dans un état triplet, avant de retourner au niveau fondamental, et on parle alors de phosphorescence (figure II.7). Au final, l'intensité de fluorescence est proportionnelle à l'intensité du faisceau excitateur et à la concentration locale de fluorophores :

$$I_{1PEF} \propto CI_{exc} \quad (\text{II.1})$$

Dans le cas de la 2PEF, ce n'est pas un seul mais deux photons qui vont être absorbés simultanément par la molécule, chacun d'eux apportant la moitié de l'énergie nécessaire à la transition électronique (figure II.1.b). L'énergie des photons incidents doit, là encore, être bien adaptée à la transition mise en jeu. Après l'absorption, la molécule se désexcite en émettant un unique photon de fluorescence portant une énergie un peu plus faible que l'énergie combinée des deux photons excitateurs, à cause de la relaxation de la molécule

II.1. Microscopie non-linéaire : fluorescence excitée à deux photons

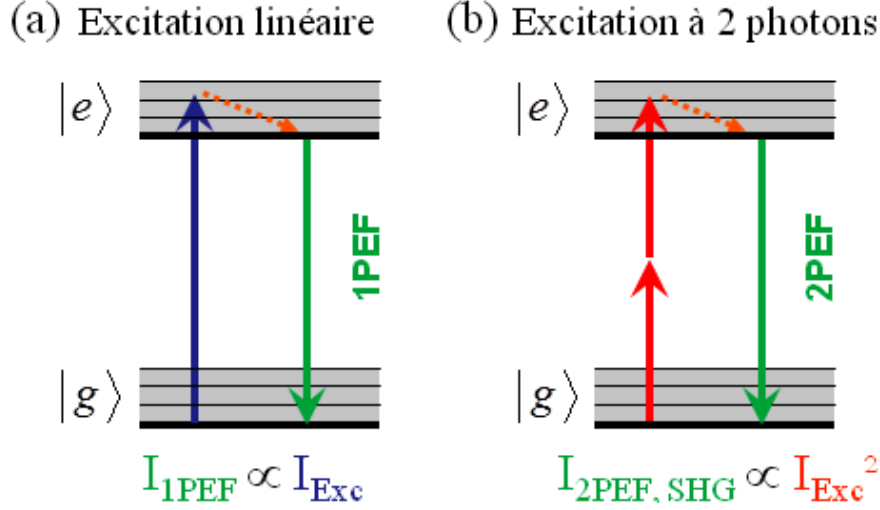


FIGURE II.1 – Fluorescence excitée à 1 et 2 photons : Diagrammes de Jablonski simplifiés des processus de fluorescence excitée à (a) 1 photon et (b) 2 photons. En particulier le signal 1PEF est proportionnel à l'intensité incidente tandis que l'intensité 2PEF croît avec le carré de l'intensité incidente.

dans son état excité. Le rayonnement correspondant est donc proche de la moitié de la longueur d'onde excitatrice mais décalé vers le rouge (décalage de Stokes).

Ce processus dépend de la partie imaginaire du tenseur de susceptibilité non-linéaire d'ordre 3 ($\chi^{(3)}$), que l'on peut aussi exprimer en terme de section efficace d'absorption à deux photons (σ_{2PEF}), et du carré de l'intensité incidente. De cette dépendance non-linéaire résulte le confinement de l'excitation au volume focal. Notons au passage que les règles de sélection relatives à la transition vers l'état excité sont différentes de celles pour la fluorescence excitée à un photon [87]. Cela peut notamment se répercuter sur les spectres d'absorption de la molécule.

II.1.2 Pré-requis

Le phénomène d'absorption à 2 photons est peu efficace car la probabilité d'absorber simultanément deux photons reste faible. C'est pourquoi l'excitation bi-photon nécessite une intensité crête élevée, obtenue grâce à l'utilisation d'impulsions lasers ultra-brèves (figure II.2) focalisées à la limite de diffraction par des objectifs de grandes ouvertures numériques ($NA > 0,6$).

En pratique, un laser pulsé de 100 mW donnant des impulsions de 100 fs, à un taux de répétition de 80 MHz, permet d'atteindre de grandes intensités crêtes ($P_{crête} \sim kW$), tout en gardant une puissance moyenne compatible avec des échantillons biologiques ($P_{moy} \sim mW$). De plus, la forte focalisation du faisceau laser permet d'atteindre une intensité considérable dans le volume focal ($I_{pic} \sim 10^{11} - 10^{12} W/cm^2$) avec des impulsions contenant très peu d'énergie ($E_{pulse} \sim nJ$). Une telle intensité permet d'obtenir une probabilité non négligeable d'absorption simultanée de deux photons.

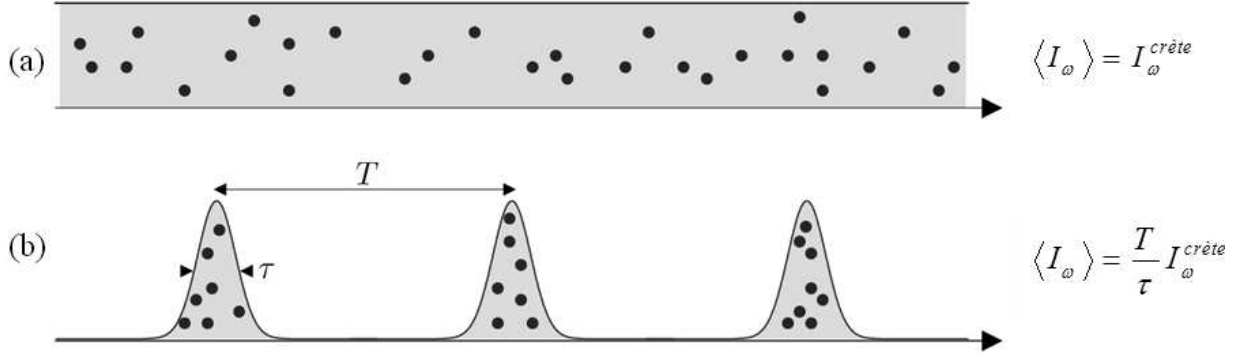


FIGURE II.2 – Laser impulsif : Comparaison de l'intensité moyenne et de l'intensité crête pour a) un laser continu et b) un laser impulsif [thèse de Delphine Débarre].

II.1.3 Résolution spatiale

La résolution spatiale correspond à la distance minimale qui permet de distinguer deux objets lumineux. En microscopie optique on distingue usuellement la résolution latérale (dans le plan focal) de la résolution axiale (selon la direction de propagation du laser). Si les microscopes de fluorescence classique offrent une bonne résolution latérale ($\sim 200 \text{ nm}$), ils ne permettent pas de sectionnement optique. En effet, avec une excitation à un photon, la fluorescence est générée sur tout le trajet de l'illumination et le signal de fluorescence au foyer est noyé dans le bruit de fond provenant de la fluorescence générée en dehors du plan focal (figure II.3.a). Toutefois, dans le cas de la microscopie confocale où l'excitation demeure linéaire, un diaphragme (*pinhole*) est introduit dans la voie de détection, réalisant un filtrage spatial qui permet de ne détecter que les photons émis au voisinage du plan focal. Combinée avec une forte focalisation, cette technique permet une bonne résolution 3D, et notamment axiale ($\sim 600 \text{ nm}$).

Une des propriétés intéressantes de la MPM est sa résolution axiale intrinsèque. En effet, du fait du confinement des effets non-linéaires au foyer de l'objectif (figure II.3.b), la MPM permet d'obtenir des images fondamentalement 3D. Il est ainsi possible de cartographier un échantillon épais à partir de coupes successives. De plus cette résolution 3D de l'excitation augmente significativement le rapport signal sur bruit (S/N) dans un milieu épais. Plus quantitativement, on peut relier l'extension spatiale du volume d'excitation au carré de la distribution d'intensité de l'onde incidente au voisinage du foyer de l'objectif. Ce volume focal correspond à la réponse impulsionnelle du microscope, c'est-à-dire, à l'image d'une source ponctuelle ou PSF (*Point Spread Function*). Les dimensions latérale w_{xy} et axiale w_z de cette PSF (largeur à $1/e$) peuvent se calculer selon les expressions suivantes [77] :

$$\begin{cases} w_{xy} = \frac{0,320 \cdot \lambda}{\sqrt{2} \cdot \text{NA}}, & \text{NA} \leq 0,7 \\ w_{xy} = \frac{0,325 \cdot \lambda}{\sqrt{2} \cdot \text{NA}^{0,91}}, & \text{NA} > 0,7 \end{cases} \quad \text{et} \quad w_z = \frac{0,532 \cdot \lambda}{\sqrt{2}} \left[\frac{1}{n - \sqrt{n^2 - \text{NA}^2}} \right] \quad (\text{II.2})$$

où n est l'indice de réfraction du milieu, NA l'ouverture numérique de l'objectif¹ et λ la

1. $\text{NA} = n \cdot \sin \theta$, avec θ le demi-angle d'ouverture du cône lumineux

II.1. Microscopie non-linéaire : fluorescence excitée à deux photons

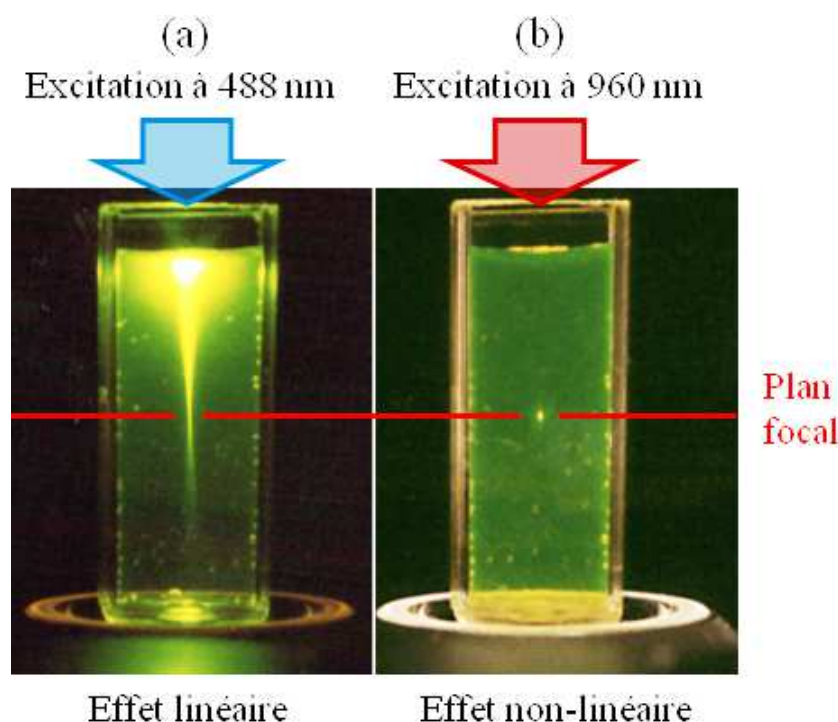


FIGURE II.3 – Distribution spatiale de l'intensité : *Cas d'un phénomène d'absorption à (a) 1 photon et (b) 2 photons dans une solution de fluorescéine. On voit notamment la propriété de sectionnement optique intrinsèque de la microscopie multiphoton [source : Zipfel et coll. [77]].*

longueur d'onde d'excitation. Ainsi plus l'ouverture numérique est grande, plus le volume d'excitation est petit.

En pratique, l'image observée étant la convolution de la distribution de fluorophores avec la PSF, celle-ci est mesurée en faisant l'image d'une nanoparticule fluorescente de taille très inférieure au volume focal (usuellement inférieure à 100 nm). La résolution est alors estimée expérimentalement comme la largeur à mi-hauteur (FWHM) du profil (latéral ou axial) du signal détecté ($\text{FWHM}_i = 2\sqrt{\ln 2} \cdot w_i$). Cependant une telle mesure de la résolution ne tient pas compte de la dégradation du volume focal lors d'une excitation en profondeur à travers un tissu biologique (due aux aberrations) et, par conséquent, surestime toujours la résolution spatiale effective du microscope. De plus cette définition ne tient pas compte des effets de cohérence dans les processus tels que la SHG, la THG ou le CARS, mais permet néanmoins d'obtenir une estimation des capacités de sectionnement de ces techniques. En pratique, pour des ouvertures numériques autour de 1, les résolutions latérale et axiale sont de $300 - 400\text{ nm}$ et de $1 - 2\text{ }\mu\text{m}$ respectivement, ce qui correspond à un volume focal d'environ $1\text{ }\mu\text{m}^3$. A noter, en guise de comparaison, que la taille typique d'une cellule est généralement supérieure à $10\text{ }\mu\text{m}$.

Les longueurs d'onde utilisées en microscopie confocale (visible) étant généralement deux fois plus basse qu'en 2PEF (infrarouge), la résolution théorique est deux fois meilleure. Néanmoins expérimentalement, la résolution axiale d'un confocal est limitée dans un milieu diffusant. En effet, la diffusion conduit à des signaux de fluorescence plus faibles ce qui oblige à ouvrir le *pinhole*, pour collecter plus de photons et donc améliorer le

rapport signal sur bruit (S/N), ce qui diminue la résolution axiale du microscope. Ainsi la résolution d'un microscope confocal est rapidement dégradée en profondeur dans un échantillon diffusant. La microscopie 2PEF présente l'avantage d'utiliser, pour adresser la même transition énergétique, une excitation dans l'infrarouge (au lieu du visible) où la diffusion est sensiblement plus faible, ce qui résulte en une PSF mieux conservée en profondeur. En pratique, pour une transition électronique et une ouverture numérique fixées la résolution 2PEF est similaire à celle observée en microscopie confocale.

II.1.4 Signaux

II.1.4.1 Ordre de grandeur des signaux mesurés

Dans le cas de la fluorescence excitée à 2 photons, le flux de photons émis F (photons.s^{-1}) varie quadratiquement avec l'intensité incidente I ($\text{photon.s}^{-1}.\text{cm}^{-2}$) :

$$F = \frac{1}{2}\sigma_{2PEF}I^2 \quad (\text{II.3})$$

où σ_{2PEF} est un paramètre moléculaire appelé section efficace d'absorption à deux photons et exprimé en Goeppert-Mayer ($1GM = 10^{-50} \text{ cm}^4.\text{s.photons}^{-1}$)². Notons que la section efficace est plus compliquée qu'une simple aire et dépend, notamment, de la longueur d'onde d'excitation. Pour les fluorophores organiques utilisés communément en microscopie biologique la section efficace d'absorption à 2 photons se situe entre 1 et 100 GM et en particulier autour de 10 GM pour les protéines fluorescentes (GFP ...).

Considérons le cas d'une molécule placée au point focal d'un laser Titane:Saphir émettant, à une longueur d'onde de $\lambda = 860 \text{ nm}$, des impulsions de $\tau = 100 \text{ fs}$, à un taux de répétition $R = 80 \text{ MHz}$, donnant une puissance moyenne de 1 mW . Le faisceau est focalisé sur une surface de $1 \mu\text{m}^2$ créant ainsi une intensité moyenne au point focal de $I_0 = 10^5 \text{ W.cm}^{-2}$, soit $5.10^{23} \text{ photons.s}^{-1}.\text{cm}^{-2}$. En notant I_c l'intensité crête dans le volume focal, le flux de photons de fluorescence généré pendant la durée de l'impulsion vaut $F_{pulse} = \frac{1}{2}\sigma_{2PEF}I_c^2$. La fluorescence générée par impulsion valant τF_{pulse} , le flux moyen de fluorescence vaut $F_0 = R\tau F_{pulse}$. Il est souvent préférable de réécrire ceci en termes d'intensité moyenne $I_0 = R\tau I_c$ du faisceau laser. Finalement,

$$F_0 = \frac{1}{2} \frac{\sigma_{2PEF}}{R\tau} I_0^2 \quad (\text{II.4})$$

On voit tout de suite l'intérêt d'utiliser un laser impulsionnel pour générer de la fluorescence excitée à 2 photons. En effet, dans notre cas le rapport cyclique³ vaut $R\tau \sim 10^{-5}$. Cependant, la durée de vie de l'état excité d'une molécule fluorescente dans l'eau est typiquement de 1 ns , ce qui implique que, pour un tel taux de répétition, la molécule est 90% du temps en attente d'excitation. Expérimentalement, une molécule (par exemple de la fluorescéine) ayant, dans l'eau, une section efficace d'absorption $\sigma_{2PEF} = 10 \text{ GM}$, excitée (avec 1 mW) autour de $1 \mu\text{m}$ de longueur d'onde, émettra alors :

$$F_0 \sim 1000 \text{ photons.s}^{-1} \quad (\text{II.5})$$

2. Le facteur 1/2 est inséré par convention

3. A comparer au cas d'un laser continu où $R\tau = 1$

II.1. Microscopie non-linéaire : fluorescence excitée à deux photons

Notons que ce calcul est idéal dans la mesure où nous avons supposé que la molécule se situe exactement au point focal, où l'intensité du faisceau laser est maximale, ce qui n'est pas le cas pour des molécules en solution.

Plus généralement, dans le cas d'une solution de concentration $C = 1 \mu M$, et d'un volume d'excitation $V = 1 \mu m^3$, le nombre moyen de molécules excitées à un instant donné vaut :

$$\bar{N} = CV \approx 600 \text{ molécules} \quad (\text{II.6})$$

Ces molécules étant distribuées aléatoirement dans le volume d'excitation, le taux de fluorescence par molécule doit être corrigé par un facteur de contraste (γ) dépendant de la distribution des molécules et de la forme du faisceau. Pour un faisceau gaussien, ce facteur est typiquement compris entre 0,2 et 0,3 [90]. Le flux de fluorescence provenant des molécules est alors :

$$\bar{F}_{total} = \bar{N}\gamma F_0 \approx 2.10^5 \text{ photons.s}^{-1} \quad (\text{II.7})$$

Ainsi, en intégrant le signal durant $10 \mu s$, on détecte de l'ordre de 2 photons par pixel. C'est pourquoi la détection du flux de photons produit par l'échantillon s'effectue à l'aide de détecteurs sensibles, typiquement des tubes photomultiplicateurs (PMT), en régime de comptage de photons.

II.1.4.2 Signaux endogènes

Les fluorophores endogènes les plus communs dans les tissus biologiques sont les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phenylalanine), les porteurs d'électrons (NADH, FAD) et les protéines structurales telles que l'élastine ou le collagène (bien que ce dernier soit beaucoup plus efficacement imagé en SHG). Grâce à sa faible phototoxicité, la 2PEF permet d'augmenter l'intensité incidente et ainsi d'exciter efficacement la fluorescence endogène de ces objets, qui est généralement bien plus faible que celle de fluorophores exogènes spécifiques.

II.1.4.3 Signaux exogènes

La majorité de la large gamme de fluorophores disponibles en confocal peut être utilisée telle quelle en 2PEF. Cependant, pour la plupart des fluorophores, le spectre d'absorption à 2 photons diffère sensiblement de celui à 1 photon, à cause de règles de sélection différentes entre les transitions à un et deux photons. De plus, les spectres d'excitation à deux photons sont généralement plus larges. Cependant, comme les spectres d'émission correspondant restent relativement distincts, cela permet l'excitation simultanée de plusieurs fluorophores avec une seule longueur d'onde et une bonne sélectivité, en choisissant une fenêtre spectrale adéquate pour la détection.

II.1.5 Avantages et inconvénients

II.1.5.1 Profondeur de pénétration augmentée dans les tissus diffusants

Dans les tissus la profondeur de pénétration est limitée par trois facteurs principaux, l'absorption, la diffusion et les aberrations, résultant tous de la propagation du faisceau

dans l'échantillon. Ces phénomènes, qui affectent autant la lumière incidente que les photons émis par les fluorophores, dépendent directement de la longueur d'onde d'excitation. En particulier l'utilisation d'une longueur d'onde plus élevée (proche infrarouge) entraîne une réduction de la diffusion et des aberrations sphériques [91], ce qui conduit à une meilleure pénétration du faisceau, ainsi qu'à un volume focal mieux préservé en profondeur. Cependant, la probabilité d'excitation bi-photonique variant avec le carré de l'intensité incidente, la fluorescence excitée à 2 photons reste très sensible à la distribution spatiale et temporelle de l'intensité du laser excitateur.

Absorption - A l'échelle macroscopique, l'absorption dans les tissus peut-être caractérisée par le libre parcours moyen d'absorption (l_a) représentant la distance moyenne parcourue par un photon avant d'être absorbé. L'absorption dans un tissu conduit à une atténuation du profil d'intensité qui, pour un effet d'ordre 2, peut être modélisée par :

$$I_{2PEF}(z) = I_{2PEF}^{(0)} \cdot e^{-2\frac{z}{l_a}} \quad (\text{II.8})$$

Les fluorophores usuellement utilisés en biologie ou dans le domaine biomédical absorbent

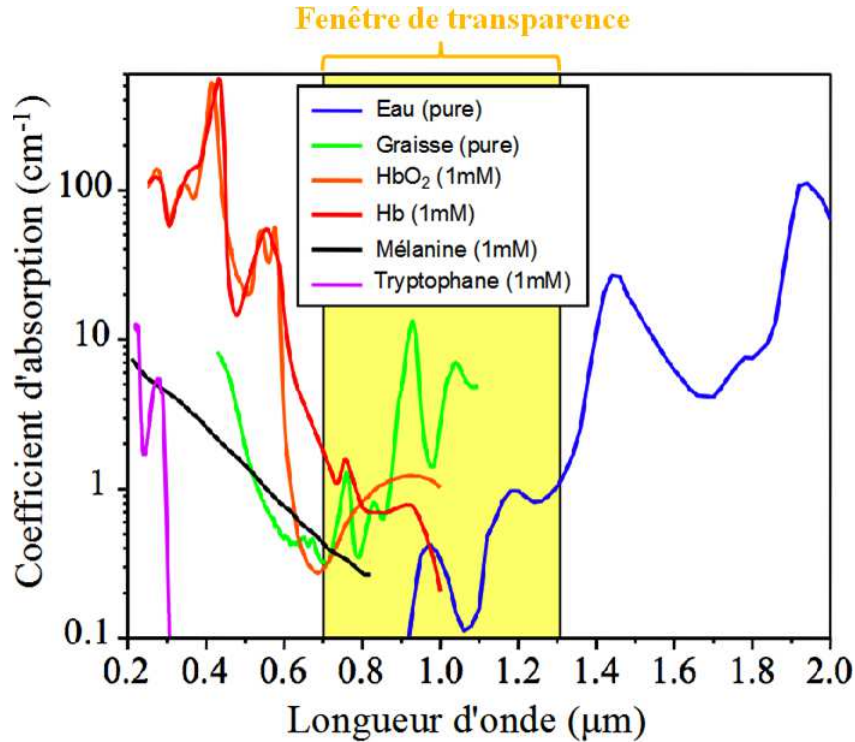


FIGURE II.4 – Fenêtre de transparence dans les tissus : *Evolution des coefficients d'absorption en fonction de la longueur d'onde pour différents constituants des tissus biologiques [Source des données : <http://omlc.orgi.edu/>].*

entre 350 et 600 nm. Dans le cas d'une excitation à 2 photons, les photons étant 2 fois moins énergétiques que pour une excitation linéaire (pour adresser une même transition électronique), les longueurs d'ondes d'excitation sont situées entre 700 et 1200 nm. Or il existe une fenêtre de transparence (figure II.4) entre 700 et 1300 nm, pour laquelle

II.1. Microscopie non-linéaire : fluorescence excitée à deux photons

l'absorption des tissus est minimale, ce qui fait de la microscopie non-linéaire un outil particulièrement adapté à l'étude de tissus épais.

Diffusion - La diffusion est le principal phénomène qui limite la profondeur d'observation [92]. Dans le régime de Rayleigh, où la taille des diffuseurs est supposée petite devant la longueur d'onde, la diffusion varie en $1/\lambda^4$. L'utilisation de longueurs d'ondes décalées dans le proche infrarouge procure donc un avantage en réduisant la diffusion dans les échantillons.

Tout d'abord, la diffusion a pour effet de diminuer l'intensité du faisceau excitateur au niveau du volume focal (figure II.5). En effet, celle-ci est directement proportionnelle à la quantité de photons balistiques (les seuls qui arrivent au point focal sans diffusion). Pour une intensité incidente donnée, le nombre de photons balistiques au point focal est d'autant plus faible que l'épaisseur de tissu traversée est importante. Ainsi le signal 2PEF, qui est proportionnel au carré de l'intensité excitatrice, diminue rapidement avec la profondeur.

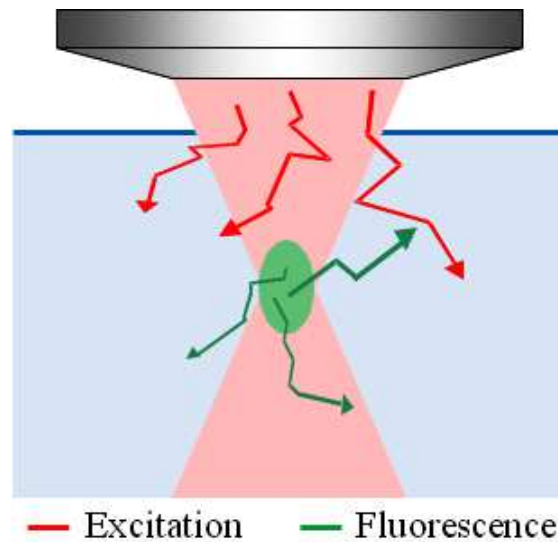


FIGURE II.5 – Schéma de diffusion dans l'échantillon : *Tant les photons excitateurs que le signal émis sont affectés par la diffusion.*

Pour des profondeurs d'imagerie inférieures au libre parcours moyen de diffusion (l_d), il est à nouveau possible de modéliser l'atténuation d'intensité selon la loi (valable pour un processus du second ordre) :

$$I_{2PEF}(z) = I_{2PEF}^{(0)} e^{-2\frac{z}{l_d}} \quad (\text{II.9})$$

On peut alors compenser cet effet en augmentant progressivement l'intensité incidente avec la profondeur afin d'obtenir un niveau de signal constant. Dans ces conditions, il existe malgré tout une profondeur où l'intensité dans les régions superficielles du tissu devient importante et peut générer un signal 2PEF parasite qui dégrade l'image [92]. A force d'augmenter l'intensité incidente avec la profondeur, il arrive même que l'intensité en surface devienne supérieure à l'intensité au niveau du volume focal. De plus, il existe

une différence de distance parcourue à travers le tissu entre les rayons paraxiaux et les rayons marginaux qui, pour des raisons géométriques, augmente avec la profondeur et peut devenir non-négligeable devant le libre parcours moyen de diffusion. Ainsi, le tissu agit comme un filtre qui atténue plus les composantes marginales du faisceau excitateur que les composantes paraxiales. Ce phénomène entraîne une baisse de l'ouverture numérique effective au point focal, augmentant la taille du volume focal et aboutissant à une baisse de la résolution en profondeur. Si une augmentation de l'intensité incidente permet de maintenir un niveau de signal constant, elle ne compense pas la perte de résolution en profondeur.

Les photons émis au niveau du volume focal sont aussi affectés par la diffusion. Cependant en microscopie multiphoton, la fluorescence ne provenant que du point focal, on peut collecter tous les photons qu'ils aient été diffusés ou non. A l'opposé, en microscopie confocale, les photons provenant d'autres plans, proches du plan focal, peuvent par diffusion être sélectionnés par le *pinhole* confocal. Ils créent alors un bruit de fond de plus en plus intense à mesure que l'on s'enfonce dans le tissu.

Aberrations - Un autre effet limitant la profondeur de pénétration est la déformation du front d'onde du faisceau excitateur dans les tissus. Ceux-ci sont généralement optiquement inhomogènes (en terme d'indice de réfraction) et induisent donc des aberrations qui vont détériorer la focalisation du faisceau, particulièrement en profondeur, et ainsi diminuer le niveau de signal et dégrader la résolution de l'image obtenue. De plus, leur influence peut être plus complexe dans le cas des microscopies cohérentes. Récemment de nombreuses équipes [93] ont étudié la possibilité d'appliquer à la microscopie non-linéaire des méthodes d'optique adaptative⁴ et ainsi de corriger le front d'onde excitateur. Ces techniques permettent de limiter les aberrations créées par l'échantillon et de préserver la résolution des microscopes multiphoton à des profondeurs encore plus grandes [11, 94].

Finalement la MPM permet de pénétrer plus profondément dans les tissus, tout en conservant une bonne résolution 3D. Toutefois la profondeur de pénétration reste très dépendante des caractéristiques du tissu. Par exemple pour des tissus peu diffusant et peu absorbant, tels que la cornée ou le cerveau, il est possible d'approcher des profondeurs de l'ordre du millimètre, alors que dans le rein il sera difficile de dépasser les 100 μm .

II.1.5.2 Microscopie point par point

Comme nous l'avons vu précédemment, en microscopie non-linéaire le signal provient d'un volume restreint autour du point focal, correspondant à la zone de plus forte intensité, ce qui induit une résolution 3D intrinsèque. Ce volume d'excitation peut être considéré comme un pixel en trois dimensions (ou *voxel*) déterminant la précision de l'image réalisée. En contrepartie, un inconvénient majeur de la microscopie multiphoton, par rapport à une microscopie en champ large, est la nécessité de balayer le point de focalisation du faisceau pour reconstruire une image (*Raster scanning*). Malgré de nombreux développements, cette nécessité de parcourir l'échantillon point par point limite fortement la dynamique temporelle accessible par ces techniques.

4. Développées à l'origine pour les instruments d'observation astronomique.

II.1. Microscopie non-linéaire : fluorescence excitée à deux photons

En pratique, il est possible de générer une image 3D, soit en déplaçant l'échantillon, soit en déplaçant le point focal du faisceau incident. En général, pour des raisons de vitesse et de commodité expérimentale, il est préférable de balayer le point focal. Le balayage latéral du point focal dans l'échantillon est le plus souvent réalisé à l'aide de deux miroirs galvanométriques ($\sim 100 \times 100 \mu m^2$ en environ $10 ms$), conduisant à l'acquisition d'une coupe de l'échantillon. Le déplacement axial est ensuite obtenu en translatant l'objectif, ce qui permet une focalisation plus ou moins profonde dans l'échantillon (figure II.6).

Pour chaque position du volume d'excitation, le signal est enregistré sur un détecteur ponctuel (tube photomultiplicateur) de sorte que la vitesse d'acquisition est limitée par le balayage mais surtout par le temps nécessaire pour collecter un niveau de signal donné par pixels. En conséquence il reste très difficile d'obtenir une cadence d'acquisition vidéo et il peut ainsi se révéler impossible d'échantillonner convenablement des phénomènes à dynamique rapide.

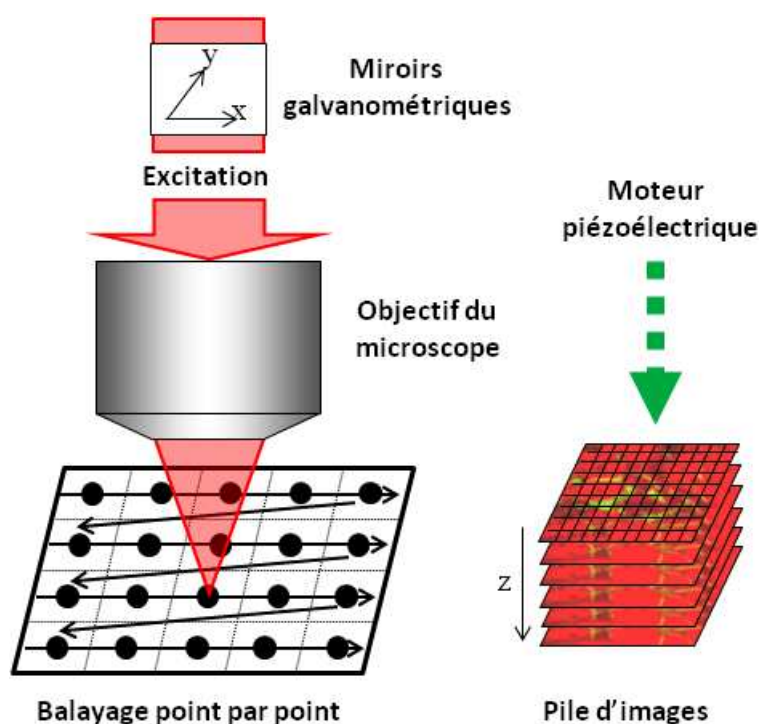


FIGURE II.6 – Raster scan : Le faisceau d'un laser impulsif est focalisé par un objectif à forte ouverture numérique pour produire efficacement des effets non-linéaires dans les tissus. Les images sont ensuite reconstruites point par point en balayant le volume focal dans un plan. Le déplacement vertical de l'objectif permet alors de focaliser le faisceau plus en profondeur pour acquérir une pile d'images de l'échantillon.

Pour pallier cet effet, plusieurs géométries d'excitation et de détection sont encore en cours d'exploration. Ces méthodes reposent par exemple sur le balayage de plusieurs faisceaux simultanément pour réaliser une mosaïque de l'échantillon [95, 96, 97] ou sur l'utilisation d'un profil d'illumination en ligne qui réduit le balayage à une seule dimension (nappe de lumière) [98, 99, 100]. Dans les deux cas, le détecteur ponctuel (photomultipli-

cateur ou photodiode à avalanche) utilisé habituellement est remplacé par un détecteur pixelisé (caméra CCD) afin d'acquérir en parallèle les signaux des différents points illuminés simultanément dans l'échantillon. Cependant, si ces techniques peuvent effectivement augmenter la cadence d'acquisition des images par rapport à une stratégie point par point, ce gain est contrebalancé, non seulement par la puissance excitatrice nécessaire mais surtout par la perte de sélectivité de la détection due à la diffusion et aux aberrations en profondeur dans l'échantillon. En effet, à cause de celles-ci un photon créé par un faisceau peut-être reçu par le détecteur d'un autre. Ainsi le signal provenant d'un volume élémentaire dans l'échantillon devient une tâche qui peut couvrir plusieurs pixels du détecteur, brouillant les signaux obtenus simultanément (le long d'une ligne ou en plusieurs points), ce qui conduit à une dégradation du contraste et de la résolution en profondeur. En pratique si ces techniques permettent d'atteindre des profondeurs plus élevées que le confocal, leur utilisation restent limitées à l'étude d'échantillons peu épais ou peu diffusants, pour lesquels la microscopie non-linéaire n'est pas forcément avantageuse, comparée, par exemple, à la microscopie confocale. En revanche la microscopie multiphoton en nappe de lumière, utilisant de faibles NA, est moins sensible aux aberrations et permet de réduire, dans une large mesure, les photodommages dans l'échantillon [100].

II.1.5.3 Phototoxicité et photoblanchiment réduit

La microscopie multiphoton est souvent décrite comme une technique "non-invasive", c'est-à-dire ne perturbant pas l'échantillon observé. Cette affirmation repose sur plusieurs propriétés de la fluorescence excitée à 2 photons.

Tout d'abord, il est possible d'obtenir un contraste endogène, donc de travailler sans marquage. Le tissu étudié n'est alors pas perturbé par la présence de fluorophores exogènes. De plus, pour les longueurs d'onde utilisées, l'absorption à 1 photon est faible (on est dans la fenêtre de transparence des tissus) si bien que seuls les processus à plusieurs photons contribuent à la photo-toxicité⁵. Comme la probabilité d'absorption de deux photons simultanément reste très faible en dehors du volume focal, les effets phototoxiques, pouvant perturber l'imagerie des échantillons, sont intrinsèquement confinés à la zone observée, contrairement à la microscopie confocale où tout le cône de focalisation est excité inutilement. Les mêmes arguments restent valables pour les effets thermiques.

Une molécule fluorescente à l'état excité peut soit émettre un photon, soit être engagée dans une réaction photochimique empêchant son retour à un état excitable (figure II.7.a). Le photo-blanchiment est la perte de la capacité de fluorescence d'une molécule résultant de ces réactions. Plus on excite un échantillon, plus la proportion de fluorophores photoblanchis est grande, ce qui induit une diminution drastique du signal provenant de la zone illuminée (figure II.7.b). Comme pour les photodommages, du fait de son confinement optique intrinsèque, la microscopie non-linéaire permet également la réduction des effets de photoblanchiment des protéines fluorescentes puisque seul le plan imagé est affecté. Ainsi, l'excitation est ici optimisée pour que tous les fluorophores excités contribuent au signal d'intérêt, ce qui rend possible des observations sur de longues durées.

Il est important de souligner dès à présent que, comme nous le verrons plus loin (cf. II.2.1.2), le processus de génération de seconde harmonique n'implique pas de dépôt d'énergie dans l'échantillon (les photons incidents sont diffusés et non absorbés) et ne

5. Libération de radicaux libres toxiques pour le tissu.

II.1. Microscopie non-linéaire : fluorescence excitée à deux photons

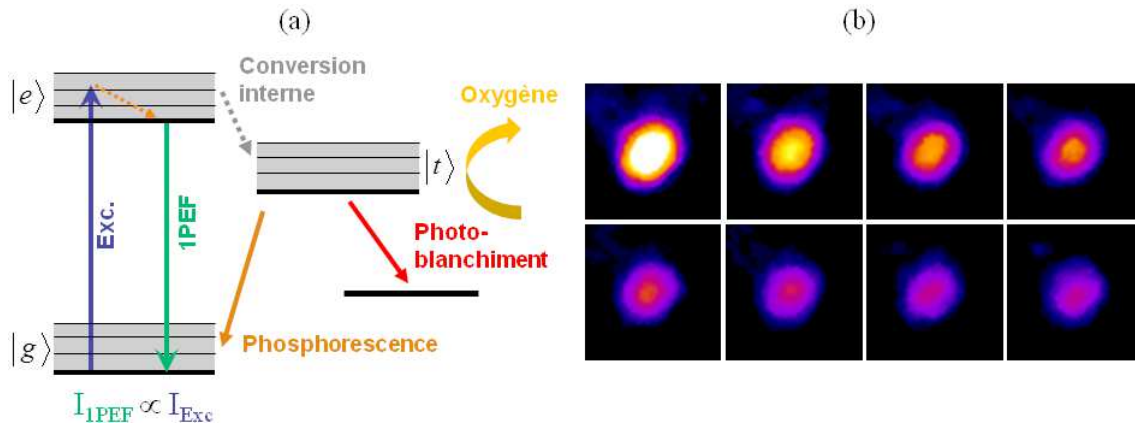


FIGURE II.7 – Principe du photo-blanchiment : (a) Perte de la capacité de fluorescence d'une molécule, résultant de réactions photochimiques, après plusieurs cycles d'excitations/désexcitations. (b) Photo-blanchiment d'une nanoparticule de Silice 300 nm, colorée au FITC, durant 1 minutes.

provoque donc ni photo-blanchiment ni photo-toxicité. En conséquence, le processus de génération de seconde harmonique est, en lui-même, non-invasif, toutefois les puissances requises peuvent être rédhibitoires. En effet, en tant que phénomène non résonnant, la SHG présente une très faible efficacité dans les tissus. Ainsi, pour obtenir un signal détectable, et un bon rapport signal sur bruit, il faut utiliser non seulement des impulsions ultra-brèves, et donc des énergies crêtes considérables, mais aussi une puissance moyenne importante (10 – 20 mW). Finalement, l'absence de phototoxicité de l'imagerie SHG n'a rien d'évident *a priori*, et il importe de bien définir les conditions dans lesquelles on ne perturbe pas l'échantillon. Ceci dit plusieurs études ont montré [7, 101, 48, 17, 16] que la 2PEF, la SHG et même la THG sont compatibles avec l'imagerie 3D de tissus *in vivo*.

II.1.5.4 Diversité des modes de contrastes

Un autre avantage de la fluorescence excitée à 2 photons est la possibilité d'utiliser simultanément différents modes de contraste non-linéaires, tels que la SHG, la THG, voire le FWH (*Four-Wave mixing*), le SRS (*Stimulated Raman scattering*) ou le CARS (figure II.8). En effet le dispositif expérimental pour ces différentes techniques est quasiment identique, à l'exception de la source lumineuse et des filtres utilisés pour la détection du signal. Ces différents types de signaux non-linéaires peuvent fournir des informations complémentaires sur les échantillons.

La fluorescence permet d'évaluer la concentration et la localisation de fluorophores exogènes ou endogènes. La génération de seconde harmonique, qui sera plus longuement discutée par la suite (cf. II.2), provient quant à elle de structures denses et non centrosymétriques, entre autres les fibrilles de collagène. La microscopie par diffusion Raman (CARS, SRS) est un processus non-linéaire d'ordre 3, reposant sur un mélange à 4 ondes résonnant, qui permet de sonder des vibrations moléculaires, et donc des espèces chimiques, avec une très bonne spécificité [83, 102]. Elle est particulièrement utilisée pour imager les lipides dans les tissus. La génération de troisième harmonique (THG) est, là

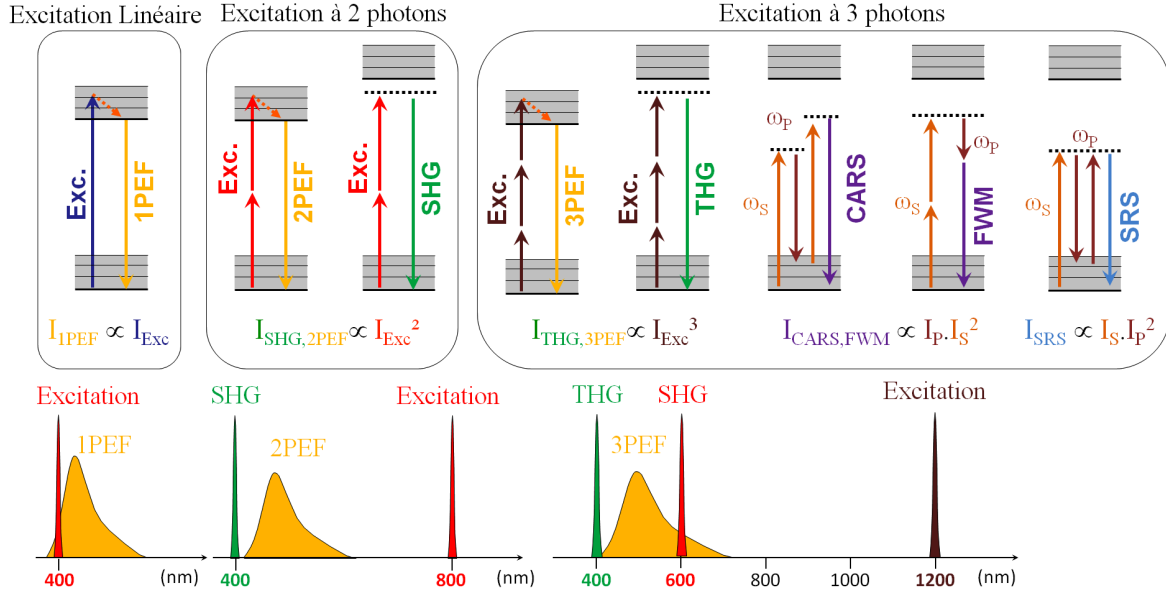


FIGURE II.8 – Modes de contraste : Diagrammes de Jablonski simplifiés des différents signaux excités à 1, 2 et 3 photons et les spectres d'émission correspondants.

encore, un processus non-linéaire cohérent d'ordre 3, généré par les variations⁶ du tenseur de susceptibilité non-linéaire $|\Delta\chi^{(3)}|$ à l'échelle du volume focal. Par conséquent de bons contrastes sont observés à l'interface entre deux milieux présentant des $\chi^{(3)}$ différents ou des inhomogénéités sub-micrométrique [103, 104, 105]. Par exemple la THG permet d'imager la double couche lipidique à la surface des cellules ou des organelles plus petites telles que les mitochondries [104]. Enfin le mélange à quatre ondes non-résonnant (FWM), sensible lui aussi au $\chi^{(3)}$, fournit des informations morphologiques sur les échantillons et peut être utilisé pour affiner l'interprétation d'image THG [106].

II.2 Génération de seconde harmonique (SHG)

La génération de seconde harmonique (SHG) a été le premier effet optique non-linéaire mis en évidence expérimentalement par Franken et coll. [79] en 1961, juste après l'apparition des premiers lasers. La SHG présente plusieurs applications dans différents domaines de la physique et est, par exemple, fréquemment utilisée pour le doublage de fréquence des lasers, comme source d'une nouvelle longueur d'onde. Cependant, nous nous cantonnerons ici à l'application de la SHG comme source de contraste en MPM et donc pour l'imagerie de tissus.

6. En effet il n'y a pas de THG dans un échantillon massif, présentant un $\chi^{(3)}$ uniforme, à cause de la phase de Gouy qui provoque des interférences destructives entre les différentes parties du volume focal [101, 88].

II.2. Génération de seconde harmonique (SHG)

II.2.1 Principes et mécanismes

II.2.1.1 Rappel du cas linéaire

Considérons un atome individuel au repos comportant deux niveaux d'énergie $|g\rangle$ et $|e\rangle$. On soumet cet atome à une onde électromagnétique monochromatique de pulsation ω , telle que $\hbar\omega$ soit petit devant la différence d'énergie $E_e - E_g$ entre l'état fondamental et l'état excité. Dans ces conditions, l'excitation est hors résonance mais l'atome peut rayonner une onde à la même pulsation ω selon un processus linéaire de diffusion élastique (figure II.9.a). Le rayonnement émis, est dans ce cas composé d'un pic étroit, centré autour de la pulsation incidente, la lumière diffusée étant cohérente vis-à-vis de l'excitation.

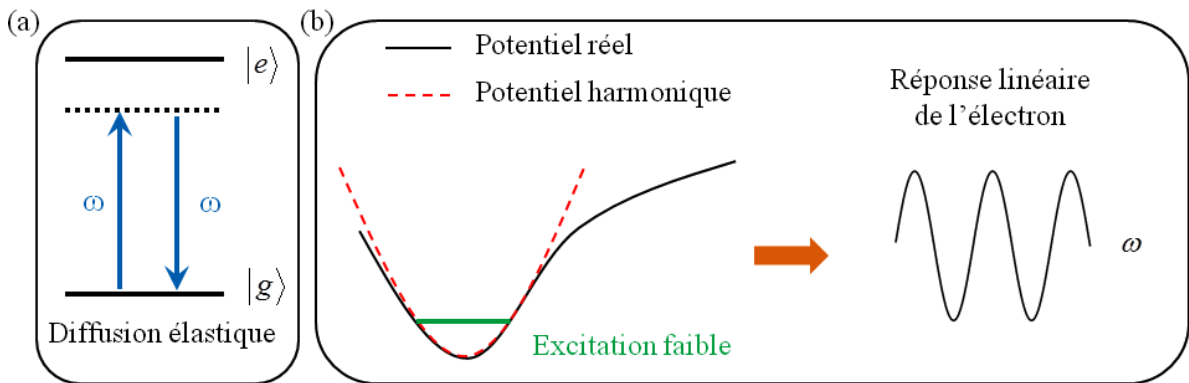


FIGURE II.9 – Diffusion élastique : (a) *Diagramme de Jablonski simplifié de la diffusion Rayleigh* et (b) *modèle de réponse linéaire de l'oscillation électronique dans un puits de potentiel harmonique.*

La diffusion élastique peut-être illustrée par un modèle classique de l'interaction lumière/matière que l'on considère composée de particules chargées (des électrons et des noyaux). Si l'on applique un champ électrique $\mathbf{E}$ les charges se déplacent sous l'action de la force de Lorentz. Les charges positives se déplacent dans le sens du champ électrique et les charges négatives dans le sens contraire. Prenons le cas d'un électron soumis à une onde électromagnétique $\mathbf{E}$. Sous l'action de la force de Lorentz celui-ci se met à osciller et génère alors un rayonnement. Pour un champ électrique relativement peu intense, l'électron reste localisé autour de sa position d'équilibre et on peut considérer qu'il est dans un puits de potentiel harmonique (figure II.9.b). Cela signifie que l'oscillation de l'électron est sinusoïdale à la fréquence d'excitation ω . Ainsi l'électron peut être décrit comme un simple dipôle électrique ($\mathbf{p}$) composé d'un moment dipolaire permanent éventuel ($\mathbf{p}_0$), inhérent à la molécule considérée, ainsi que d'un moment dipolaire induit par le champ électrique incident :

$$\mathbf{p} = \mathbf{p}_0 + \alpha : \mathbf{E} + o(\mathbf{E}) \quad (\text{II.10})$$

où α est appelée polarisabilité de l'électron. Ici, et dans toute la suite, les $(:)$ représente l'action d'un tenseur d'ordre n sur $n - 1$ vecteurs.

Dans le cas d'un milieu diélectrique, les particules sont liées les unes aux autres par des interactions électrostatiques ou covalentes. On considère ainsi l'ensemble des particules constituant la matière comme un réseau de dipôles électriques oscillants. La déformation

de ce nuage d'électrons sous l'action d'une onde électromagnétique est décrite par la polarisation du milieu. En première approximation, la réponse du milieu est proportionnelle à l'excitation, et la polarisation s'écrit :

$$\mathbf{P}^{(1)} = \varepsilon_0 \chi^{(1)} : \mathbf{E}$$

où ε_0 est la permittivité diélectrique du vide et $\chi^{(1)}$ la susceptibilité électrique qui, dans le cas général, est un tenseur d'ordre deux. Toutefois, cette déformation linéaire n'est valable que dans l'approximation de champs faibles et donc de petits déplacements de charges.

II.2.1.2 Cas non-linéaire

Fort de ces rappels d'optique linéaire, nous allons maintenant voir les principes du cas non-linéaire. La génération de seconde harmonique est un processus cohérent du deuxième ordre, où par diffusion non-linéaire un faisceau incident à la fréquence ω est "converti" en un faisceau à la fréquence harmonique 2ω (figure II.10.a).

Lorsqu'elle est soumise à un rayonnement suffisamment intense de fréquence ω , une molécule non-linéaire partant de son état fondamental $|g\rangle$, peut "virtuellement absorber" deux photons, d'énergie $\hbar\omega$, ne correspondant pas à une transition de la molécule, et revenir instantanément à l'état $|g\rangle$ en émettant un unique photon d'énergie 2ω , sous forme de diffusion harmonique. Il est important de noter dès à présent que, bien qu'excitée par deux photons, la SHG diffère fondamentalement de la 2PEF. En effet pour générer de la fluorescence une molécule absorbe l'énergie des photons incidents et la libère après un temps indéterminé ($\sim 10^{-9}$ s) sous la forme d'un photon de fluorescence. En revanche, dans le cas de la SHG, une molécule n'absorbe pas l'énergie incidente mais la diffuse de manière non-linéaire (en convertissant deux photons en un) ce qui n'induit pas de dépôt d'énergie dans le milieu. Contrairement à la 2PEF, la SHG est un processus cohérent et quasi-instantané ($\sim 10^{-15}$ s), ce qui implique, en outre, que le photon émis conserve la phase du champ incident.

Comme pour le cas linéaire, la génération de seconde harmonique peut être illustrée par le modèle de Lorentz traitant de l'interaction entre une onde électromagnétique et un électron lié. Pour des excitations intenses, les électrons s'éloignent fortement de leur position d'équilibre et le potentiel vu par l'électron devient anharmonique (figure II.10.b). La réponse de l'électron se fait alors non seulement à la fréquence fondamentale ω mais contient aussi des contributions de toutes les harmoniques (2ω , 3ω ...), émises plus ou moins efficacement.

De manière générale, on considère une onde électromagnétique incidente

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = A(\mathbf{r}) e^{i(\mathbf{k} \cdot \mathbf{r} - \omega t)} \boldsymbol{\epsilon} \quad (\text{II.11})$$

dont l'enveloppe est supposée lentement variable :

$$\frac{\partial^2 A}{\partial z^2} \ll k \frac{\partial A}{\partial z} \quad (\text{II.12})$$

Ceci équivaut à dire que les variations spatiales sont très faibles à l'échelle de la molécule et permet ainsi de se placer dans l'approximation dipolaire. Le dipôle oscillant ($\mathbf{p}$) induit dans une molécule peut alors s'écrire :

$$\mathbf{p} = \mathbf{p}_0 + \mathbf{p}(\mathbf{E}) \quad (\text{II.13})$$

II.2. Génération de seconde harmonique (SHG)

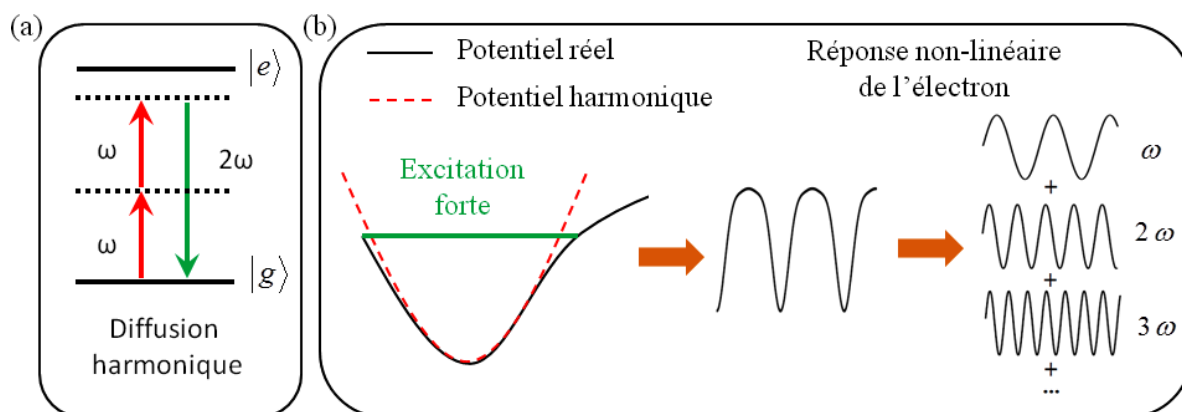


FIGURE II.10 – Diffusion harmonique : (a) *Diagramme de Jablonski simplifié de la diffusion harmonique* et (b) *modèle de réponse non-linéaire de l'oscillation électronique dans un puits de potentiel anharmonique.*

où $\mathbf{p}(\mathbf{E})$ décrit la déformation du nuage électronique en réponse au champ incident. Si l'on effectue un développement en série entière de cette partie variable, en fonction du champ électrique appliqué à la molécule, on obtient :

$$\mathbf{p} = \mathbf{p}_0 + \alpha : \mathbf{E} + \beta : \mathbf{E}\mathbf{E} + \gamma : \mathbf{E}\mathbf{E}\mathbf{E} + \dots \quad (\text{II.14})$$

Ainsi, lorsque le champ appliqué est fort (ce qui est le cas pour des lasers pulsés), des termes d'ordres supérieurs apparaissent (E^2 , E^3 ...), dépendant des première β et seconde γ hyperpolarisabilités. Le premier terme ($\propto E$) décrit la réponse linéaire (diffusion élastique), le second ($\propto E^2$) est à l'origine de la SHG et le troisième ($\propto E^3$) de la THG. Dans le cas général, α , β et γ sont des tenseurs à 2, 3 et 4 dimensions respectivement.

Les effets non-linéaires mis en jeu sont nombreux (redressement optique, génération de somme de fréquences, effet Pockels, effet Kerr...), surtout dans le cas où plusieurs faisceaux excitateurs à des fréquences différentes interagissent dans le milieu. Ici, nous allons nous restreindre au cas de la génération de seconde harmonique par un unique faisceau de pulsation ω .

II.2.1.3 Origine physique à l'échelle moléculaire

Les molécules capables d'émettre un rayonnement SHG sont caractérisées par une forte hyperpolarisabilité du second ordre β [107]. Cette réponse va fortement dépendre de la symétrie moléculaire puisque les composantes du tenseur d'ordre 3 (β) sont fixées par la géométrie de la molécule considérée.

Nous allons dans un premier temps considérer le cas de molécules ne possédant qu'une seule composante non-nulle (ou du moins non-négligeable) d'hyperpolarisabilité β_{uuu} , l'axe $\mathbf{u}$ représentant la direction de l'axe moléculaire. Un bon exemple d'entités avec un β élevé est celui des molécules à transfert de charge (*push-pull*) en bâtonnets, fortement unidirectionnelles, composées d'un donneur et d'un accepteur d'électrons à chaque extrémité d'un pont électronique et dans lesquelles le transfert de charge est spécifiquement possible dans une unique direction (figure II.11). La polarisabilité et les hyperpolarisabilités ont alors toutes une seule composante (α_{uu} , β_{uuu} , γ_{uuuu} ...) dans le référentiel associé

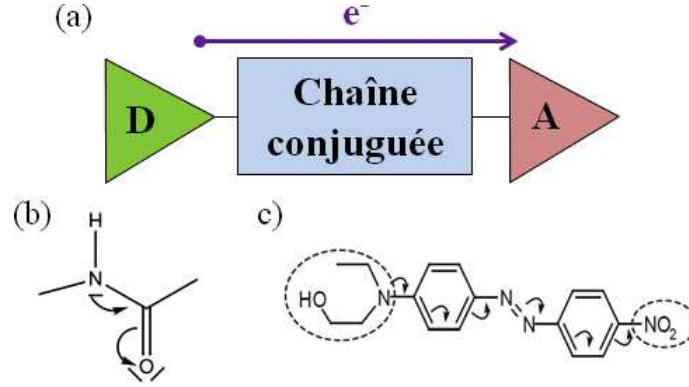


FIGURE II.11 – Molécules push-pull : (a) *Modèle de molécules à transfert de charge*, (b) *exemple de la liaison peptidique* et (c) *exemple de la molécule DR1 (Dispersed Red 1)*.

à la molécule. En particulier ce modèle de molécules *push-pull* peut être appliqué pour décrire quantitativement la réponse SHG d'une liaison peptidique dans une molécule de collagène (cf. II.2.3.2).

Pour ce type de molécule en considérant un modèle quantique à deux niveaux [108], le champ étant traité classiquement, on peut effectuer un calcul de perturbation et exprimer la norme du tenseur d'hyperpolarisabilité sous la forme :

$$\beta(2\omega) = \underbrace{\frac{3p_{ge}^2 \Delta p}{2(\hbar\omega_0)^2}}_{\beta_0} \underbrace{\frac{\omega_0^4}{(\omega_0^2 - 4\omega^2)(\omega_0^2 - \omega^2)}}_{F(\omega, \omega_0)} \quad (\text{II.15})$$

avec p_{ge} le moment dipolaire de transition de l'état fondamental $|g\rangle$ vers l'état excité $|e\rangle$, $\hbar\omega_0 = E_e - E_g$ l'énergie de transition entre les deux états et $\Delta p = p_{ee} - p_{gg}$ la différence de moment dipolaire entre l'état excité et l'état fondamental⁷. Le terme β_0 , appelé hyperpolarisabilité à fréquence nulle, caractérise la non-linéarité intrinsèque de la molécule, tandis que le terme $F(\omega, \omega_0)$, qui dépend de la pulsation incidente ω et de la pulsation de résonance ω_0 , est un facteur d'exaltation de la non-linéarité d'autant plus important que l'on est proche de la résonance.

L'expression de l'hyperpolarisabilité à fréquence nulle (β_0) montre qu'une molécule est d'autant plus efficace que le terme $(p_{ge})^2 \Delta p$ est grand. Il faut pour cela qu'un fort transfert de charge soit possible au sein de la molécule. Ceci est typiquement le cas des molécules asymétriques de type *push-pull* car les deux formes conjuguées de la molécule, qui correspondent approximativement aux états $|g\rangle$ et $|e\rangle$, présentent des moments dipolaires très différents.

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent le dipôle induit à 2ω par un champ polarisé selon $\mathbf{u}$, pour une telle molécule s'écrit :

$$\mathbf{p}^{(2)}(2\omega) = \beta E_\omega^2 \mathbf{u} \quad (\text{II.16})$$

7. L'existence d'un Δp non nul correspond à la propriété de non centrosymétrie de la molécule.

II.2. Génération de seconde harmonique (SHG)

où $\mathbf{E}_\omega$ est le champ d'excitation. En première approximation, le champ rayonné ($\mathcal{E}$) est proportionnel au dipôle induit :

$$\mathcal{E} \propto (\mathbf{p}^{(2)} \times \mathbf{u}_r) \times \mathbf{u}_r \quad (\text{II.17})$$

II.2.1.4 Non centrosymétrie

Dans le cas d'un potentiel symétrique, le développement en série entière (eq. II.14) ne contient que des termes impairs et donc des harmoniques impaires. Ainsi, contrairement à la THG qui peut se produire dans tous les types de molécules, l'émission de seconde harmonique (et de quatrième, sixième...) ne peut avoir lieu que dans des systèmes présentant une brisure de symétrie. En effet, dans le cas d'une molécule présentant une symétrie centrale, l'inversion des axes et donc de la polarisation induite conduit à :

$$\beta(-2\omega; \omega, \omega) = -\beta(-2\omega; \omega, \omega) \quad (\text{II.18})$$

Par conséquent une molécule centrosymétrique aura une hyperpolarisabilité β nulle et ne pourra émettre de rayonnement harmonique.

De plus, au niveau macromoléculaire, les champs électriques des différents dipôles induits vont interférer. Considérons par exemple deux molécules non-centrosymétriques séparées d'une distance petite devant la longueur d'onde, de sorte qu'elles "voient" le même champ incident (même intensité, même phase). Comme la phase du champ diffusé à 2ω dépend de l'orientation de l'harmonophore, les émissions de deux molécules orientées parallèlement interféreront constructivement :

$$\mathcal{E} \propto ((\mathbf{p}_1^{(2)} + \mathbf{p}_2^{(2)}) \times \mathbf{u}_r) \times \mathbf{u}_r \propto (2\mathbf{p}_1^{(2)} \times \mathbf{u}_r) \times \mathbf{u}_r \quad (\text{II.19})$$

L'intensité diffusée étant le carré du champ, on obtient ainsi un signal SHG quatre fois plus élevé que pour une unique molécule (figure II.12). Au contraire, les champs créés par

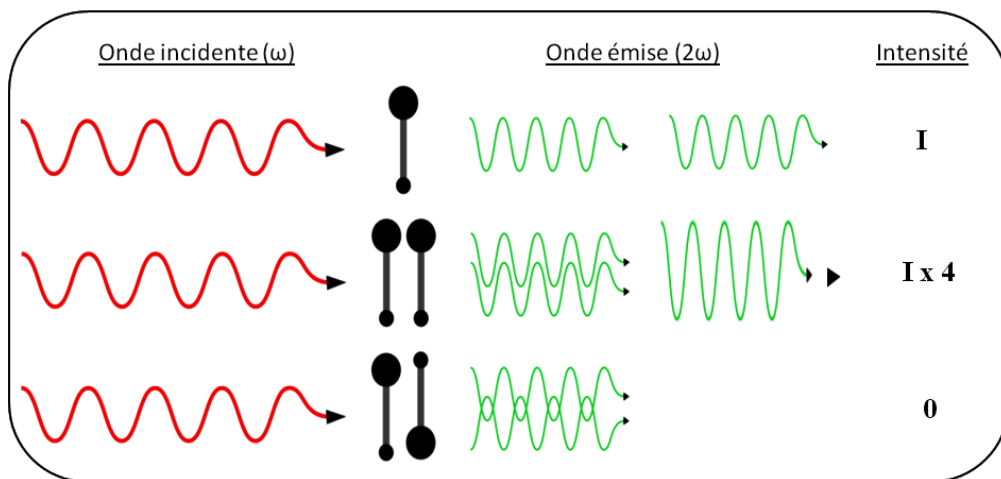


FIGURE II.12 – Conditions de non centrosymétrie : Génération de seconde harmonique par deux molécules parallèles (interférences constructives) ou anti-parallèles (interférences destructives).

deux molécules anti-parallèles seront émis en opposition de phase et interféreront donc destructivement :

$$\mathcal{E} \propto ((\mathbf{p}_1^{(2)} + \mathbf{p}_2^{(2)}) \times \mathbf{u}_r) \times \mathbf{u}_r = ((\mathbf{p}_1^{(2)} - \mathbf{p}_1^{(2)}) \times \mathbf{u}_r) \times \mathbf{u}_r = \mathbf{0} \quad (\text{II.20})$$

Il n'y a alors pas de génération de seconde harmonique. Par conséquent, pour obtenir un important signal SHG, les molécules doivent non seulement présenter une asymétrie au niveau moléculaire (potentiel anharmonique) mais aussi une répartition spatiale non-centrosymétrique à l'échelle du volume focal. En effet, chaque dipôle induit dans le volume focal rayonnant de manière anisotrope, leur répartition et leur orientation va créer des interférences constructives dans certaines directions et destructives dans d'autres.

II.2.1.5 Formalisme tensoriel

Dans le paragraphe précédent nous avons exposé la notion de dipôle non-linéaire induit par une molécule, sous une excitation par une champ incident à ω , en nous limitant à des molécules *push-pull*. Cependant, la réponse SHG est intrinsèquement tensorielle. Pour un diffuseur arbitraire, l'hyperpolarisabilité β est un tenseur d'ordre 3 comportant 27 composantes indépendantes. Dans le cas général, ce tenseur décrit comment la j^e et la k^e composantes de deux champs excitateurs aux fréquences ω_1 et ω_2 contribuent à créer la i^e composante du champ diffusé à la fréquence $\omega_1 + \omega_2$, selon l'expression :

$$E_i(\omega_1 + \omega_2) = \beta_{ijk}(-(\omega_1 + \omega_2); \omega_1, \omega_2) E_j(\omega_1) E_k(\omega_2) \quad (\text{II.21})$$

Par extension, le moment dipolaire induit dans la direction i par une molécule soumise à un unique champ excitateur $\mathbf{E}(\omega)$, s'écrit :

$$\begin{aligned} p_i = & \sum_j \alpha_{ij}(\omega) E_j(\omega) + \sum_{j,k} \beta_{ijk}(-2\omega; \omega, \omega) E_j(\omega) E_k(\omega) \\ & + \sum_{j,k,l} \gamma_{ijkl}(-3\omega; \omega, \omega, \omega) E_j(\omega) E_k(\omega) E_l(\omega) + \dots \end{aligned} \quad (\text{II.22})$$

Or tout comme dans le cas de molécules *push-pull*, la phase du champ diffusé à 2ω dépend de l'orientation du dipôle induit. Ceci implique que deux diffuseurs identiques avec des orientations différentes $\mathbf{u}$ et $\mathbf{u}'$ auront des tenseurs d'hyperpolarisabilités β_{uuu} et $\beta_{u'u'u'}$ identiques dans leur référentiel propre, mais différents dans le référentiel du laboratoire. Cet effet est encore plus marqué dans le cas d'un tenseur comportant 27 composantes.

Les tenseurs sont des objets géométriques transformés de manière spécifique lors d'un changement de référentiel. Plus précisément, un tenseur $\mathcal{T}_{a_1 a_2 \dots a_n}$ dans une nouvelle base est transformé selon :

$$\mathcal{T}_{a'_1 a'_2 \dots a'_n} = \mathcal{T}_{a_1 a_2 \dots a_n} \mathcal{P}_{a'_1}^{a_1} \mathcal{P}_{a'_2}^{a_2} \dots \mathcal{P}_{a'_n}^{a_n}$$

où $\mathcal{P}_{a'}^a$ est la matrice de passage entre les deux référentiels. Ici les indices supérieurs et inférieurs désignent respectivement l'ancien et le nouveau référentiel.

II.2.1.6 Susceptibilité non-linéaire

S'il est possible de définir un tenseur d'hyperpolarisabilité pour une molécule, ou même pour une unique liaison peptidique, en tant que diffuseur élémentaire, ce tenseur

II.2. Génération de seconde harmonique (SHG)

microscopique n'est que très difficilement mesurable optiquement. En effet, même en utilisant un faisceau très fortement focalisé la situation la plus courante en microscopie multiphoton n'est évidemment pas celle où l'on regarde une ou deux molécules, mais celle où tout un ensemble de molécules sont excitées simultanément par le champ incident. Leur nombre, leur répartition et leur direction respective vont être déterminants dans le processus de génération de seconde harmonique.

Considérons le cas où N molécules non-linéaires sont réparties dans un volume de dimension caractéristique ΔL , supposé très petit à l'échelle de la longueur d'onde d'émission (ie $\Delta L \ll \lambda$). On repère les orientations de ces différentes molécules par les trois angles d'Euler $\Omega_n = (\theta_n, \varphi_n, \psi_n)$ (figure II.13).

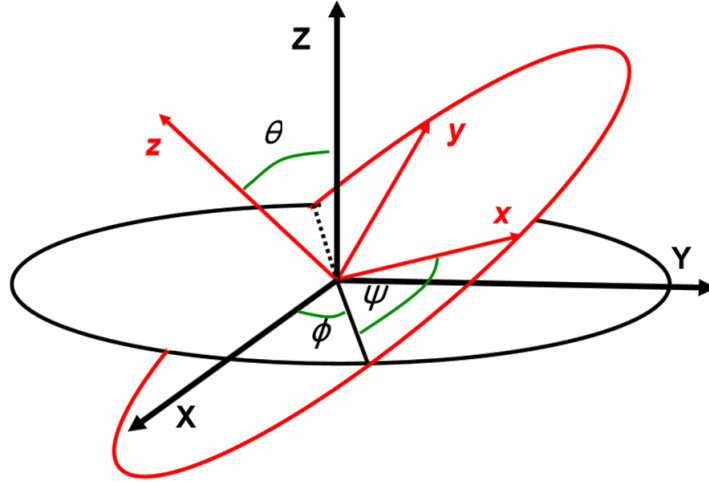


FIGURE II.13 – Angles d'Euler : θ nutation , φ rotation propre et ψ précession.

Le volume occupé par les molécules peut alors être considéré comme un point où se trouve un dipôle macroscopique $\mathbf{P}^{(2)}$, appelé polarisation induite, rayonnant à la pulsation 2ω et tel que :

$$\mathbf{P}^{(2)} = \frac{1}{V} \sum_{n=1}^N \mathbf{p}_n^{(2)}(\Omega_n) \quad (\text{II.23})$$

Cette somme peut être calculée à partir de la moyenne statistique des moments dipolaires $\mathbf{p}_n^{(2)}$ contenus dans le volume d'interaction :

$$\sum_{n=1}^N \mathbf{p}_n^{(2)}(\Omega_n) = N \langle \mathbf{p}_n^{(2)}(\Omega_n) \rangle_N \quad (\text{II.24})$$

où $\langle \rangle_N$ représente la moyenne sur l'ensemble des molécules (*i.e.* l'ensemble des orientations). Ce passage à la limite statistique permet de considérer des ensembles moléculaires caractérisés aussi bien par des fonctions de distribution continues (cas des polymères) que par des fonctions de distribution discrètes (cas des milieux cristallins). Le volume d'interaction étant considéré comme ponctuel, toutes les molécules voient le même champ local $\mathbf{E}_{loc}$ avec le même déphasage :

$$\mathbf{E}_{loc} = \mathbf{E}_0 \cdot e^{-i\omega t}$$

Ainsi, les champs rayonnés par les différents dipôles seront exactement en phase et l'expression du dipôle macroscopique $\mathbf{P}^{(2)}$ se simplifie :

$$\mathbf{P}^{(2)} = \frac{N}{V} \langle \beta(\Omega_n) \rangle_N : \mathbf{E}_{loc} \mathbf{E}_{loc} \quad (\text{II.25})$$

avec

$$\langle \beta(\Omega_n) \rangle_N = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N \beta(\Omega_n) \quad (\text{II.26})$$

Toutefois, il est généralement plus maniable d'écrire la réponse globale du milieu en fonction du champ macroscopique appliqué ($\mathbf{E}$) et non du champ local ($\mathbf{E}_{loc}$).

$$\mathbf{P} = \mathbf{P}^{(0)} + \mathbf{P}^{(1)}(\omega) + \mathbf{P}^{(2)}(2\omega) + \mathbf{P}^{(3)}(3\omega) + \dots$$

soit

$$\begin{aligned} \mathbf{P} = & \mathbf{P}^{(0)} + \varepsilon_0 \chi^{(1)}(\omega) : \mathbf{E} + \varepsilon_0 \chi^{(2)}(-2\omega; \omega, \omega) : \mathbf{E}(\omega) \mathbf{E}(\omega) \\ & + \varepsilon_0 \chi^{(3)}(-3\omega; \omega, \omega, \omega) : \mathbf{E}(\omega) \mathbf{E}(\omega) \mathbf{E}(\omega) + \dots \end{aligned} \quad (\text{II.27})$$

où $\mathbf{P}^{(0)}$ est la polarisation du milieu en l'absence de champ électrique, $\chi^{(1)}$ la susceptibilité linéaire du milieu, $\chi^{(2)}$ la susceptibilité non-linéaire d'ordre 2 (ou première susceptibilité non-linéaire), $\chi^{(3)}$ la susceptibilité non-linéaire d'ordre 3... Dans le cas général, les susceptibilités $\chi^{(n)}$ (de même que les hyperpolarisabilités) sont des tenseurs d'ordre $n + 1$. Contrairement au tenseur β dont les valeurs sont difficilement mesurables⁸, les susceptibilités non-linéaires (et notamment $\chi^{(2)}$) peuvent-être mesurées directement.

En outre si l'on identifie la polarisation non-linéaire d'ordre deux :

$$\mathbf{P}^{(2)} = \varepsilon_0 \chi^{(2)} : \mathbf{E} \mathbf{E} \quad (\text{II.28})$$

avec l'équation II.25, on voit que le tenseur $\chi^{(2)}$ résulte de la sommation des réponses élémentaires dans le volume focal [109] :

$$\varepsilon_0 \chi_{ijk}^{(2)} = \frac{1}{V} \sum_{n \in V} f^{2\omega} f^\omega f^\omega \beta_{ijk,n} = \rho f^{2\omega} f^\omega f^\omega \langle \beta(\Omega_n) \rangle_\Omega \quad (\text{II.29})$$

où $\langle \beta(\Omega_n) \rangle_\Omega$ est la moyenne statistique des tenseurs d'hyperpolarisabilités élémentaires dans le référentiel du laboratoire, ρ la densité moléculaire et les f^α les facteurs de champ locaux⁹. Dans toute la suite, et par souci de simplification, on omettra ces facteurs de champs locaux.

Cette relation relie l'hyperpolarisabilité microscopique (β) à la susceptibilité non-linéaire macroscopique ($\chi^{(2)}$), plus appropriée pour des milieux continus et qui décrit la densité volumique de dipôles induits (polarisation du milieu)¹⁰. Schématiquement,

8. Elles le sont en HRS (cf. annexe A).

9. D'après le modèle de Lorentz-Lorenz, les facteurs de champs locaux sont tels que $f^\omega = \frac{n_\omega^2 + 2}{3}$ où n_ω représente l'indice de réfraction du milieu à ω . Le champ local s'écrit alors $E_{loc}(\omega) = f^\omega E(\omega)$. En pratique les facteurs de champ locaux sont de l'ordre de 1 dans les milieux qui nous intéressent.

10. A noter que la première hyperpolarisabilité s'exprime en $m^4.V^{-1}$ alors que la susceptibilité non-linéaire d'ordre 2 s'exprime en $m.V^{-1}$.

II.2. Génération de seconde harmonique (SHG)

l'hyperpolarisabilité décrit l'interaction d'un diffuseur unique avec le champ local alors que la susceptibilité décrit l'interaction d'un milieu non-linéaire continu avec le champ moyen.

Cette susceptibilité non-linéaire $\chi^{(2)}$, tout comme le tenseur d'hyperpolarisabilité β , est un tenseur de rang 3 et possède un certain nombre de propriétés [88]. En particulier, comme nous l'avons déjà évoqué, ses composantes s'annulent dès que le milieu possède une symétrie centrale (milieu centrosymétrique). En considérant les propriétés de symétrie du système étudié, le nombre de composantes indépendantes de ces tenseurs peut largement être réduit. Pour commencer, nous ne sommes pas intéressés ici par la somme de deux fréquences arbitraires, mais uniquement par la génération de seconde harmonique (donc à partir d'un unique faisceau) où $\omega_1 = \omega_2 = \omega$. Dans ce cas,

$$\chi_{ijk}^{(2)}(-(\omega_1 + \omega_2); \omega_1, \omega_2) = \chi_{ijk}^{(2)}(-2\omega; \omega, \omega) \quad (\text{II.30})$$

qui est invariant par permutation des deux derniers indices ($\chi_{ijk}^{(2)} = \chi_{ikj}^{(2)}$). Le nombre de composantes indépendantes du tenseur $\chi^{(2)}$ est donc réduit à 18, au lieu de 27. En outre dans le cas d'un milieu sans perte, toutes les composantes du tenseur sont réelles.

II.2.2 Rôle de la cohérence

La cohérence est un effet crucial en SHG car elle détermine l'ensemble des propriétés du signal créé. Insistons sur le fait que, contrairement à la fluorescence où la phase du photon émis est aléatoire, l'oscillation du dipôle induit et son rayonnement se font de manière cohérente avec le champ excitateur et qu'ainsi les photons émis conservent la phase incidente. Il est alors nécessaire de considérer les amplitudes lumineuses et non les intensités.

Pour obtenir une réponse macroscopique de génération de seconde harmonique à partir d'un ensemble de molécules non-linéaires, il est nécessaire que les ondes harmoniques rayonnées par les différentes molécules interfèrent constructivement. A noter que ce pré-requis est équivalent à la propriétés de non-centrosymétrie des harmonophores nécessaires pour obtenir un $\chi^{(2)}$ non nul (cf. II.2.1.4). La cohérence permet d'augmenter sensiblement le signal à partir d'une structure ordonnée et alignée, en contrepartie cette propriété significative entrave l'interprétation des images en compromettant même la notion de résolution en SHG (cf. II.2.2.4). Elle est notamment à l'origine de la spécificité de la SHG, dans les tissus, pour des éléments tels que le collagène, la tubuline ou la myosine.

Pour illustrer plus précisément le rôle de la cohérence, reprenons notre exemple "simple" de diffusion non-linéaire par N molécules réparties dans un volume de dimension caractéristique $\Delta L \ll \lambda$ (figure II.14). Dans le cadre de cette approximation il n'est pas nécessaire de prendre en compte le couplage entre les ondes incidentes et harmoniques au travers d'une équation de propagation, ce traitement étant réservé à l'étude de la réponse non-linéaire d'un milieu optiquement épais¹¹ [88]. Nous supposons de plus que toutes ces molécules voient le même champ local $\mathbf{E}_{loc}$ que l'on écrira sous la forme :

$$\mathbf{E}_{loc} = \mathbf{E}_0 \cdot e^{i\mathbf{k}_\omega \cdot \mathbf{r}} \quad (\text{II.31})$$

11. Il est important de noter qu'en pratique, en MPM, la lumière collectée étant émise dans le volume focal, ayant un diamètre caractéristique d'environ 400 nm, cette hypothèse n'est que rarement valide. Nous verrons dans le chapitre 4 comment traiter le cas d'un milieu continu de taille comparable ou supérieure au volume focal.

où $\mathbf{k}_\omega$ représente le vecteur d'onde à la pulsation ω dans le milieu non-linéaire.

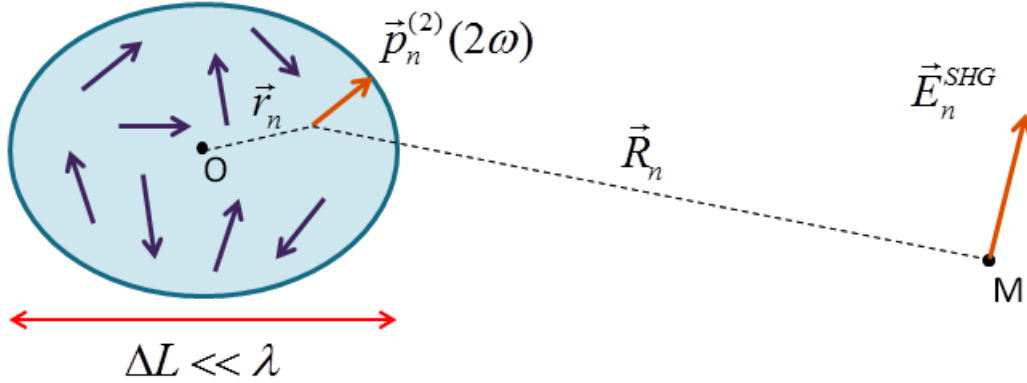


FIGURE II.14 – Rayonnement en champ lointain : Cas d'un ensemble de dipôles non-linéaires $\mathbf{p}_n^{(2)}(2\omega)$ dans un volume de dimension caractéristique $\Delta L \ll \lambda$.

Ainsi, le moment dipolaire induit dans la $n^{\text{ième}}$ molécule, caractérisée par sa position $\mathbf{r}_n$ et son orientation, définie par les trois angles d'Euler Ω_n , s'écrit :

$$\mathbf{p}_n^{(2)}(\mathbf{r}_n, \Omega_n) = \beta(\Omega_n) : \mathbf{E}_0 \mathbf{E}_0 e^{2i\mathbf{k}_\omega \cdot \mathbf{r}_n} \quad (\text{II.32})$$

Comme la SHG est un processus cohérent, la phase du rayonnement émis par cette molécule est déterminée par la phase du champ incident au point $\mathbf{r}_n$. En première approximation on peut alors considérer que le champ rayonné à 2ω est tel que :

$$\mathcal{E}_n^{(2)}(M, t) \propto \beta(\Omega_n) : \mathbf{E}_0 \mathbf{E}_0 e^{2i\mathbf{k}_\omega \cdot \mathbf{r}_n} \quad (\text{II.33})$$

Ainsi, le champ total rayonné par la distribution des dipôles induits à la pulsation 2ω s'écrit :

$$\mathcal{E}^{(2)}(M, t) = \sum_{n=1}^N \mathcal{E}_n^{(2)} \propto \sum_{n=1}^N \beta(\Omega_n) : \mathbf{E}_0 \mathbf{E}_0 e^{2i\mathbf{k}_\omega \cdot \mathbf{r}_n} \quad (\text{II.34})$$

On en déduit l'expression de l'intensité totale émise :

$$\mathcal{I} \propto \left| \mathcal{E}^{(2)}(M, t) \right|^2 = \sum_{n=1}^N \sum_{n'=1}^N \mathcal{E}_n^{(2)} \mathcal{E}_{n'}^{(2)*} \quad (\text{II.35})$$

Cette dernière expression peut se décomposer en deux termes :

$$\mathcal{I} \propto \underbrace{\sum_n \mathcal{E}_n^{(2)} \mathcal{E}_n^{(2)*}}_{I_1} + \underbrace{\sum_n \sum_{n' \neq n} \mathcal{E}_n^{(2)} \mathcal{E}_{n'}^{(2)*}}_{I_2} \quad (\text{II.36})$$

Il est important de noter que si le premier terme (I_1) n'est jamais nul, le second (I_2), dépendant de l'orientation relative des molécules non-linéaires constituant l'échantillon, peut s'annuler. Nous allons donc différencier deux cas, suivant que I_2 est nulle ou non.

II.2. Génération de seconde harmonique (SHG)

II.2.2.1 Cas de l'émission incohérente : diffusion hyper-Rayleigh

Dans le cas où les molécules sont orientées aléatoirement (figure II.15), par exemple lorsqu'elles sont en solution, l'orientation du dipôle induit $\mathbf{p}_n^{(2)}(2\omega)$, et donc la phase du champ $\mathcal{E}_n^{(2)}(2\omega)$, sont aléatoires pour chaque molécule. Ainsi, dans un tel milieu :

$$I_2 \propto \sum_n \mathcal{E}_n^{(2)} \underbrace{\sum_{n'} \mathcal{E}_{n'}^{(2)*}}_{V_{n'}} \quad (\text{II.37})$$

où les $V_{n'}$ sont orientés aléatoirement par rapport à $\mathcal{E}_n^{(2)}$. Ainsi en passant à la limite statistique le terme I_2 s'annule et l'intensité totale I s'identifie au terme I_1 correspondant à la somme incohérente des intensités diffusées par tous les dipôles indépendamment. Cette somme s'écrit alors :

$$I \propto \sum_n |\beta(\Omega_n) : \mathbf{E}_0 \mathbf{E}_0|^2 \propto N \langle |\beta(\Omega_n)|^2 \rangle_N |E_0 E_0|^2 \quad (\text{II.38})$$

Dans ce cas :

$$I_{HRS} \propto N \langle |\beta|^2 \rangle I_{las}^2 \quad (\text{II.39})$$

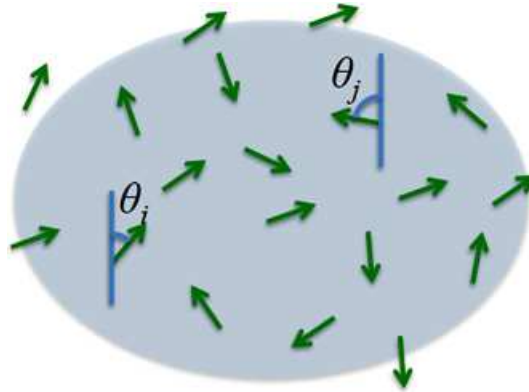


FIGURE II.15 – Diffusion Hyper-Rayleigh : *Distribution isotrope des moments dipolaires dans le volume focal.*

Ainsi l'intensité est proportionnelle au nombre de diffuseurs (N), comme dans le cas de la fluorescence à deux photons, ce qui est caractéristique d'une émission incohérente.

Nous avons considéré ici un désordre structural caractérisé par la disposition spatiale des molécules. En pratique, on peut observer cette diffusion Hyper-Rayleigh (HRS) dans les milieux liquides en exploitant les fluctuations temporelles de densités et d'orientations moléculaires [110, 111]. En effet, le temps d'intégration des détecteurs ($\sim 10^{-5}$ s) étant largement supérieur au temps caractéristique de rotation des molécules en solution ($\sim 10^{-12}$ s), le signal résulte d'une moyenne temporelle de l'orientation moléculaire, ce qui, en vertu du théorème d'ergodicité, permet de faire le même raisonnement. L'intensité détectée avec un tel échantillon permet de mesurer l'hyperpolarisabilité β de molécules non-linéaires en solution (cf. annexe A) [112, 113, 114, 115].

II.2.2.2 Cas de l'émission cohérente : génération de seconde harmonique

Dans le cas simple où tous les harmonophores sont orientés de manière unidirectionnelle (figure II.16), le dipôle induit $\mathbf{p}_n^{(2)}(2\omega)$ est identique pour chaque molécule. Les amplitudes et les phases des champs $\mathcal{E}_n(2\omega)$ dépendent donc uniquement du champ électrique $\mathbf{E}(\omega)$ du faisceau laser incident.

$$\mathcal{E}_n(2\omega) \propto \beta : \mathbf{E}(\omega)\mathbf{E}(\omega) \quad (\text{II.40})$$

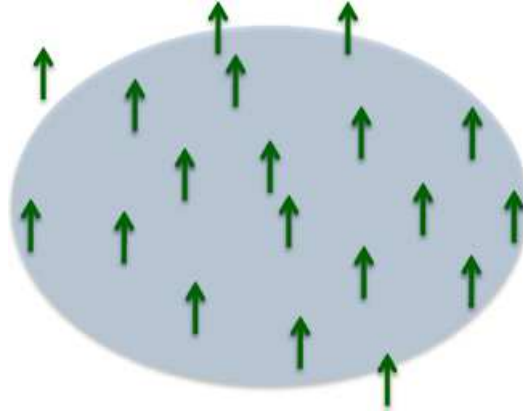


FIGURE II.16 – Génération de seconde harmonique : *Distribution non centrosymétrique des harmonophores dans le volume focal.*

En sommant ces champs nous obtenons un terme I_2 non-nul et l'intensité totale émise s'écrit :

$$I \propto \sum_n \sum_{n'} \mathcal{E}_n^{(2)} \mathcal{E}_{n'}^{(2)*} \propto \sum_n \sum_{n'} \mathbf{E}(\omega)^2 \mathbf{E}^*(\omega)^2 \propto N^2 |E|^4 \quad (\text{II.41})$$

et finalement

$$I_{SHG} \propto N^2 |\beta|^2 I_{las}^2 \quad (\text{II.42})$$

On peut voir que l'intensité varie avec le carré du nombre de molécules (N) présentes dans la zone d'excitation. Ce résultat est caractéristique d'un rayonnement cohérent et c'est ce type de somme cohérente des ondes à 2ω que l'on désigne sous le nom de génération de seconde harmonique. A noter que l'on retrouve ici la notion de susceptibilité non-linéaire introduite au paragraphe II.2.1.6.

II.2.2.3 SHG dans les tissus

Les équations II.39 et II.42 montrent que pour un grand nombre (N) de molécules non-linéaires, les signaux HRS sont négligeables devant l'intensité SHG. En pratique, les volumes focaux et les temps d'acquisition utilisés en microscopie sont beaucoup trop petits pour obtenir des niveaux de signaux détectables pour une distribution isotrope d'harmonophores. Cette propriété peut être interprétée comme une illustration du fait que la SHG n'existe pas dans les milieux possédant une symétrie centrale. En effet comme toutes les positions et orientations sont équiprobables, un tel milieu isotrope possède une

II.2. Génération de seconde harmonique (SHG)

symétrie centrale (en supposant que les molécules sont achirales¹²). Ainsi là où le signal de fluorescence nous renseigne sur le nombre total de molécules excitées, le signal SHG nous fournit une information complémentaire sur le degré d'asymétrie de la distribution moléculaire.

Ainsi, les molécules responsables du signal SHG doivent présenter non seulement une asymétrie électronique mais aussi une asymétrie dans leur répartition spatiale. Cependant, cette contrainte importante est aussi un avantage car, l'origine des signaux étant extrêmement spécifique, elle permet de visualiser une composante moléculaire précise, éventuellement invisible par des techniques de fluorescence.

Comme nous venons de le voir, la génération de seconde harmonique repose sur 3 critères :

- une molécule avec une première hyperpolarisabilité β élevée
- une haute densité de molécules dans le volume focal
- une organisation adéquate des molécules.

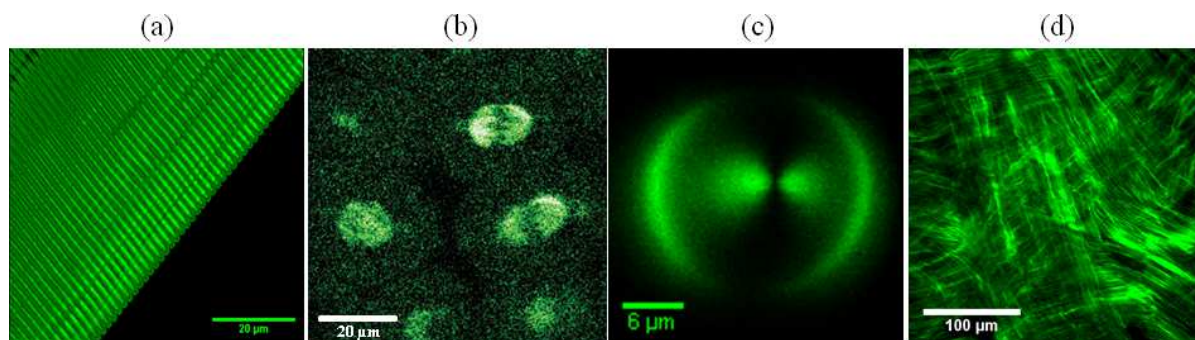


FIGURE II.17 – SHG dans les tissus : (a) *Muscle strié de souris* [source : Zeiss, LSM7 MP], (b) *Microtubules, observable uniquement lors de division cellulaire* [source : thèse de Nicolas Olivier], (c) *Amidon, principale source de SHG chez les végétaux* [source : Anisha Thayil et coll. [116]] et (d) *Cornée humaine* [source : Gaël Latour, Laboratoire d'Optique et Biosciences].

De fait, peu d'entités biologiques présentent ces caractéristiques simultanément. Les fibres musculaires et plus précisément les filaments de myosine constituent une source de signal SHG endogène permettant d'étudier la dynamique de contraction musculaire et de réaliser de l'imagerie fonctionnelle sur le muscle squelettique (figure II.17.a) [117]. Les microtubules sont un autre exemple de polymères linéaires orientés, source de SHG endogène [118, 119]. Toutefois bien que ces polymères soient abondants dans les tissus biologiques, il existe peu de structures dans lesquelles les microtubules s'organisent en "fibres" orientées, nécessaires à la formation d'un signal assez intense pour être détecté. Seuls les microtubules présents dans les axones, les fuseaux mitotiques, qui permettent la séparation des deux groupes de chromosomes lors de la mitose, ou les cils cellulaires présentent des organisations suffisamment asymétriques pour émettre des signaux SHG détectables (figure II.17.b). Chez les végétaux, les arrangements quasi-cristallins d'amidon [120, 116] (figure II.17.c) ou la cellulose [121], génèrent très efficacement un signal de seconde harmonique. Néanmoins, la plus importante source de seconde harmonique dans les tissus reste le collagène fibrillaire (figure II.17.d). Ce signal, bien que mis en évidence

12. Une molécule et son miroir ne diffèrent alors qu'en orientation.

dès 1979 par des études réalisées sur des tendons de queue de rat [80], n'est exploité pour l'imagerie que depuis la mise au point de la microscopie multiphoton à balayage. Enfin, il est également possible d'avoir recours à des harmonophores exogènes développés pour la microscopie SHG, principalement sous la forme de sondes du potentiel électrique membranaire [122, 123, 124]. La difficulté, mais aussi l'intérêt d'avoir recours à ce type de sondes, est qu'il n'est possible de générer un signal de seconde harmonique que si les molécules exogènes s'insèrent de façon unidirectionnelle dans la membrane cellulaire.

II.2.2.4 Propriétés du rayonnement et résolution

De même que dans le cas de la 2PEF, le signal SHG est proportionnel au carré de l'intensité incidente. Ainsi lorsqu'un faisceau est focalisé dans un échantillon, l'émission du signal est confinée au volume focal, et la résolution 3D reste "virtuellement" la même que celle de la fluorescence bi-photonique.

En réalité, la situation est plus complexe pour la SHG, puisque comme nous venons de le voir, la phase est un critère déterminant pour la génération de seconde harmonique. Le signal détecté dépend non seulement de l'intensité produite par les diffuseurs individuels, mais aussi de leur orientation relative. En conséquence, la distribution spatiale d'harmonophores ne peut pas être directement déduite du signal et requiert des hypothèses sur les conditions d'accord de phase dans l'échantillon.

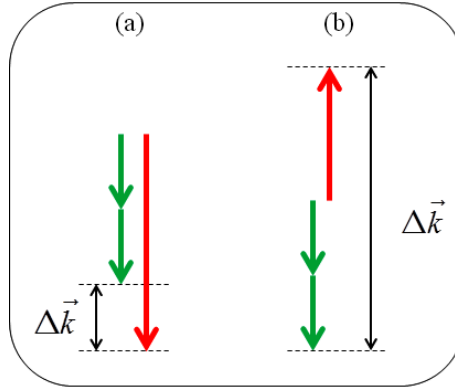


FIGURE II.18 – Accord de phase : (a) En transmission et (b) En épi-détection.

Dans un microscope, la SHG peut-être détectée soit vers l'avant (en transmission) soit vers l'arrière (épi-détection), conduisant à des conditions d'accord de phase différentes (figure II.18). Au lieu de parler de résolution en microscopie SHG, il est plus juste de regarder la longueur de cohérence, qui est la distance caractéristique de variation de la phase du signal, définie par :

$$l_c = \frac{\pi}{||\mathbf{k}_{2\omega} - 2\mathbf{k}_\omega||} \quad (\text{II.43})$$

où $\mathbf{k}_{2\omega}$ désigne le vecteur d'onde de la seconde harmonique dans la direction d'observation, et $\mathbf{k}_\omega$ le vecteur d'onde du champ excitateur, orienté dans le sens de propagation du laser. Cette formule donne une bonne approximation de l_c dans le cas de la SHG vers l'arrière (épi-détection). Dans le cas du signal transmis il est nécessaire d'introduire

II.2. Génération de seconde harmonique (SHG)

explicitement la phase de Gouy, qui décrit la variation de phase au foyer de l'objectif du microscope, et de tenir compte de la dispersion d'indice dans le milieu ($n_{2\omega} - n_\omega$) reflétant la différence de vitesses entre les ondes fondamentales et harmoniques. En pratique on peut estimer la longueur de cohérence (l_c) vers l'avant à partir de simulations de la distribution de phase dans le volume focal¹³. Pour une ouverture numérique de 0,95 on obtient $l_c^{trans} \approx l_{Rayleigh} \approx 3\lambda/2$ pour la SHG transmise et $l_c^{epi} \approx \pi/4k_\omega = \lambda/8$ pour la SHG émise vers l'arrière (avec $\mathbf{k}_{2\omega} \approx -2\mathbf{k}_\omega$). Ainsi, pour des raisons d'accord de phase, la longueur de cohérence est plus importante dans le sens de propagation du faisceau excitateur, ce qui rend la SHG généralement plus efficace vers l'avant.

Finalement, pour rendre compte rigoureusement des effets de phase dans le volume focal il est nécessaire d'introduire un modèle numérique permettant, de plus, un calcul vectoriel des champs incident et émis (cf. IV.1.2).

II.2.3 Origine de la SHG du collagène

La génération de seconde harmonique par le collagène pose en premier lieu un problème de vocabulaire. Comme nous l'avons vu au paragraphe précédent, la réponse non-linéaire microscopique associée à une molécule est décrite par l'hyperpolarisabilité. À partir des tenseurs β de chaque molécule et de leur arrangement spatial, il est possible de définir la susceptibilité non-linéaire $\chi^{(2)}$ décrivant la réponse macroscopique.

Dans le cas du collagène, la molécule de tropocollagène ayant une longueur d'environ 300 nm, non négligeable devant la longueur d'onde, on ne peut plus rigoureusement parler de β . De plus, d'après les modèles actuels, c'est le domaine en triple hélice qui est responsable de la génération de seconde harmonique et il semble peu probable que la délocalisation des électrons se fasse sur toute la longueur de la molécule. Le tenseur macroscopique de susceptibilité non-linéaire $\chi^{(2)}$ est lui aussi mal défini car d'une part la façon dont les molécules de collagène s'assemblent entre elles pour former des fibrilles n'est pas parfaitement connue (plusieurs modèles coexistent : structures quasi-cristalline, enroulement en supra-hélice...), et d'autre part il existe une variabilité à la fois intra- et inter-tissulaire de l'organisation et de la taille des fibrilles. Par exemple, la cornée est constituée de petites fibrilles de 35 nm de diamètre, espacées d'environ 50 à 80 nm, tandis que le tendon est formé de fibrilles alignées de quelques centaines de nanomètres de diamètre et que dans la peau, les fibrilles sont très désordonnées et de taille variable.

En outre, il n'est pas réaliste de passer directement de la réponse élémentaire des diffuseurs à un milieu continu suivant la formule II.38, qui équivaut à faire une sommation directe sur tous les acides-aminés dans le volume focal, et ce pour deux raisons :

1. le collagène étant un système intrinsèquement hétérogène, il est nécessaire de tenir compte de la structure hiérarchique à chaque échelle, qui va déterminer *in fine* la réponse SHG des structures observables telles les agrégats de fibrilles de collagène
2. l'usage d'objectifs à fortes ouvertures numériques (requis en microscopie multiphoton) impose un régime très focalisé induisant des variations de phase dans le volume focal à l'échelle de la molécule de collagène.

Il est alors plus pertinent de séparer la sommation en plusieurs étapes, en calculant des tenseurs intermédiaires à chaque échelle, c'est-à-dire pour une triple hélice puis une

13. Pour plus de détails voir la thèse d'Ivan Gusachenko, LOB 2012.

fibrille. Durant ces étapes de transformation on doit passer du microscopique (β) au macroscopique ($\chi^{(2)}$), alors même que cette transition n'est pas clairement définie. Par souci de clarté, dans la suite, nous parlerons toujours d'hyperpolarisabilité β jusqu'à l'échelle des fibrilles et de susceptibilité non-linéaire $\chi^{(2)}$ pour les fibres et au-dessus.

Cette démarche multi-échelle permet de choisir l'approche la plus appropriée pour le problème considéré. A chaque échelle hiérarchique, il est nécessaire de considérer non seulement le tenseur approprié pour interpréter les mesures du signal, mais aussi le tenseur de l'échelle inférieure pour mieux comprendre les variations du premier. Par exemple, pour étudier les signaux HRS du collagène, les tenseurs utiles sont celui de la triple hélice β_{TH} et celui d'une liaison peptidique β_{pept} [115]. Ensuite, pour étudier la formation de fibrilles individuelle, l'échelle fibrillaire β_{fib} et l'échelle moléculaire β_{TH} entrent en compte...

En résumé, pour pouvoir interpréter totalement le signal SHG du collagène, il faudrait connaître la position et l'orientation des sous-unités du collagène responsables du signal SHG à toutes les échelles jusqu'à la taille du volume focal ($\sim 1 \mu m$), tâche extrêmement ardue. Toutefois, des modèles simplifiés nous permettent déjà d'appréhender certaines caractéristiques de la génération de seconde harmonique par le collagène.

II.2.3.1 Symétries du collagène et réponse non-linéaire

L'approche la plus ancienne a été proposée par Freund [80, 125, 126, 127, 128] lors des premières expériences réalisées sur la génération de seconde harmonique par le collagène et se place à l'échelle des fibres. Deux hypothèses de symétrie sont formulées :

- on se place dans le cadre de la symétrie de Kleinman
- le tenseur non-linéaire possède une symétrie cylindrique C_∞ .

Symétrie de Kleinman - La symétrie de Kleinman s'applique dès lors que toutes les fréquences impliquées (ω et 2ω) sont loin des résonances. Dans le collagène, les bandes d'absorption sont situées en-dessous de 240 nm [129, 130] alors que l'on travaille usuellement à $\lambda = 860 \text{ nm}$ et que la SHG émet à $\lambda/2 = 430 \text{ nm}$, ce qui fait qu'en première approximation l'hypothèse¹⁴ ($\omega \ll \omega_0$) est vérifiée et que la susceptibilité non-linéaire devient indépendante de la fréquence d'excitation :

$$\chi_{ijk}^{(2)}(-2\omega; \omega, \omega) = \chi_{ijk}^{(2)} \quad (\text{II.44})$$

Lorsque la symétrie de Kleinman est valide, les composantes du tenseur sont indépendantes de la fréquence ce qui permet d'interchanger tout les indices [133] :

$$\chi_{ijk}^{(2)} = \chi_{ikj}^{(2)} = \chi_{jik}^{(2)} = \chi_{jki}^{(2)} = \chi_{kij}^{(2)} = \chi_{kji}^{(2)} \quad (\text{II.45})$$

Cette hypothèse de symétrie réduit donc les composantes indépendantes du tenseur de 18 à 10 (cf. annexe B) en excluant explicitement les composantes chirales. A noter que la symétrie de Kleinman reste valide à l'échelle moléculaire ce qui autorise à faire les mêmes simplifications sur β .

¹⁴. Certaines études montrent que dans le cas du collagène fibrillaire la symétrie de Kleinman est valable à quelques pourcents près [131], alors que d'autres auteurs [132] questionnent son applicabilité dans les tissus biologiques.

II.2. Génération de seconde harmonique (SHG)

Symétrie du collagène - Après ces simplifications, qui découlent directement des propriétés générales de la génération de seconde harmonique, il y a celles découlant de la symétrie spatiale du milieu :

- *Échelle moléculaire* : La molécule de tropocollagène consistant en trois hélices quasi-identiques, elle possède une symétrie rotationnelle C_3 et le tenseur β en hérite. Usuellement, pour plus de simplicité, on approxime cette propriété par une symétrie C_∞
- *Échelle macro-moléculaire* : Les fibrilles de collagène présentent une géométrie cylindrique conférant une symétrie C_∞ au tenseur $\chi^{(2)}$.

De plus, la symétrie de Kleinman excluant les composantes chirales, le milieu possède en réalité une symétrie $C_{\infty,v}$. L'invariance par rotation, due à la symétrie $C_{\infty,v}$ réduit finalement le tenseur β à 2 coefficients indépendants (cf. annexe B). On peut alors directement écrire la polarisation induite $\mathbf{P}^{(2)}$ sous la forme :

$$\begin{pmatrix} P_x(2\omega) \\ P_y(2\omega) \\ P_z(2\omega) \end{pmatrix} = \varepsilon_0 \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & \chi_{xyy}^{(2)} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \chi_{xyy}^{(2)} & 0 & 0 \\ \chi_{xyy}^{(2)} & \chi_{xyy}^{(2)} & \chi_{xxx}^{(2)} & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} E_x(\omega)^2 \\ E_y(\omega)^2 \\ E_z(\omega)^2 \\ E_y(\omega)E_z(\omega) \\ E_x(\omega)E_z(\omega) \\ E_x(\omega)E_y(\omega) \end{pmatrix} \quad (\text{II.46})$$

avec $\chi_{xyy}^{(2)} = \chi_{yyx}^{(2)} = \chi_{yyx}^{(2)} = \chi_{xzz}^{(2)} = \chi_{zxx}^{(2)} = \chi_{zzx}^{(2)}$.

Cependant, la génération de seconde harmonique par le collagène ne peut pas être expliquée en totalité par une modélisation aussi simple. En 2002, Campagnola et coll. [118] évoquaient la possibilité que la structure en hélice de la molécule de collagène, qui fait d'elle une molécule chirale, puisse être responsable d'une partie de l'effet non-linéaire du second ordre, alors que les composantes chirales sont considérées comme nulles dans la symétrie de Kleinman. En effet, Pena et coll. ont montré, par des expériences sur des films minces de molécules de collagène, un effet non négligeable de la chiralité dans la SHG de surface du collagène [134]. Même si d'après ces expériences l'augmentation de la SHG par les composantes chirales serait au maximum d'un facteur 2, il semble nécessaire d'utiliser un tenseur chiral pour modéliser correctement la réponse non-linéaire du collagène. Toutefois, par souci de simplicité nous nous restreindrons dans ce manuscrit au modèle d'un tenseur non-chiral permettant une bonne appréhension de la SHG du collagène et expliquant la majorité des observations.

II.2.3.2 Structure hiérarchique

Nous allons maintenant explorer la nature tensorielle de la réponse du collagène, en prenant en compte sa structure hiérarchique.

Liaison peptidique - La source élémentaire de la SHG du collagène semble être la liaison peptidique (figure II.19) dans la séquence protéique [115, 135, 136]. Par souci de simplicité, celle-ci est approximée par un modèle de molécule *push-pull*, ne présentant donc qu'une seule composante $\beta_{\text{pept},uuu}$ (dans le référentiel associé à la liaison) dans la direction de la liaison peptidique $\mathbf{u}$.

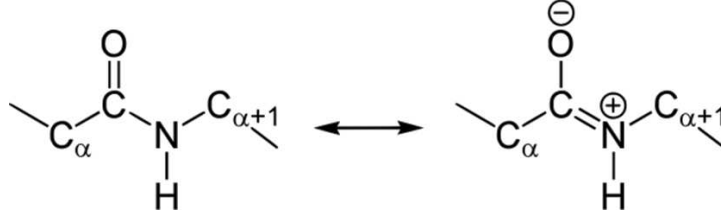


FIGURE II.19 – Liaison peptidique : Dans les modèles actuels, c'est l'harmonophore majoritaire dans les tissus à l'origine de la génération de seconde harmonique.

Triple hélice - Le tenseur d'hyperpolarisabilité d'une triple hélice β_{TH} est obtenu à partir de la réponse élémentaire de la liaison peptidique [136]. Le terme $\beta_{pept,uuu}$ étant la seule composante tensorielle du "bloc" élémentaire, la sommation est directement faite sur les différentes liaisons peptidiques de la molécule :

$$\beta_{TH,ijk} = \sum_n \beta_{pept,uuu} \mathcal{P}_i^u(\varphi_n, \theta_n) \mathcal{P}_j^u(\varphi_n, \theta_n) \mathcal{P}_k^u(\varphi_n, \theta_n) \quad (\text{II.47})$$

où $\mathcal{P}$ est la matrice de passage du référentiel de chaque liaison peptidique au référentiel de la triple hélice (cf. II.2.1.5). L'angle de la liaison peptidique pour différents acides aminés n'est pas le même puisque leur position au sein des triplets $[Gly - X - Y]_3$ n'est pas équivalente (figure II.20.a). La matrice de passage $\mathcal{P}_i^u$ est ici simplifiée car pour une molécule *push-pull* l'angle de précession (ψ) n'est pas pertinent et peut donc être choisi arbitrairement. La symétrie $C_{\infty,v}$ de la molécule de tropocollagène (figure II.20.b) limite de plus le nombre de composantes indépendantes à 2 ($\beta_{TH,xxx}$ et $\beta_{TH,xyy}$), où x est l'axe de la triple hélice.

Cependant, malgré la prise en compte de la symétrie du tenseur moléculaire, le modèle de SHG résultant de liaisons peptidiques *push-pull* sans interaction n'est pas parfait. Des simulations numériques basées sur la connaissance de la structure moléculaire du tropocollagène ont récemment été publiées par Tuer et coll. [135, 137]. Ils montrent que la segmentation du tropocollagène en acides aminés conduit parfois à des résultats irréalistes. Aussi, il est possible d'améliorer le modèle et de rendre compte de plus d'effets en segmentant la molécule en "blocs" plus larges contenant 3 à 5 acides aminés.

Fibrille - L'hyperpolarisabilité du tropocollagène (β_{TH}) peut ensuite être utilisée pour calculer le tenseur d'une fibrille de collagène. Dans un modèle simple de fibrilles, on peut négliger l'angle (*pitch angle*) entre les molécules de tropocollagène au sein de la fibrille [56]. Les référentiels propres des triples hélices coïncident alors avec le référentiel de la fibrille (figure II.20.c), ce qui permet d'écrire directement l'hyperpolarisabilité d'une fibrille formée de N molécules de tropocollagène (modèle additif) :

$$\beta_{fib,ijk} = N\beta_{TH,ijk} \quad (\text{II.48})$$

Dans le cas général, on est obligé d'effectuer un moyennage sur les différentes orientations des triples hélices. En outre le tenseur β_{fib} possède lui aussi la symétrie $C_{\infty,v}$

II.2. Génération de seconde harmonique (SHG)

permettant de réduire le nombre de composantes indépendantes à 2. Cette symétrie découle des images de fibrilles de collagène en microscopie électronique où l'on constate que les molécules s'alignent pour former des fibrilles cylindriques.

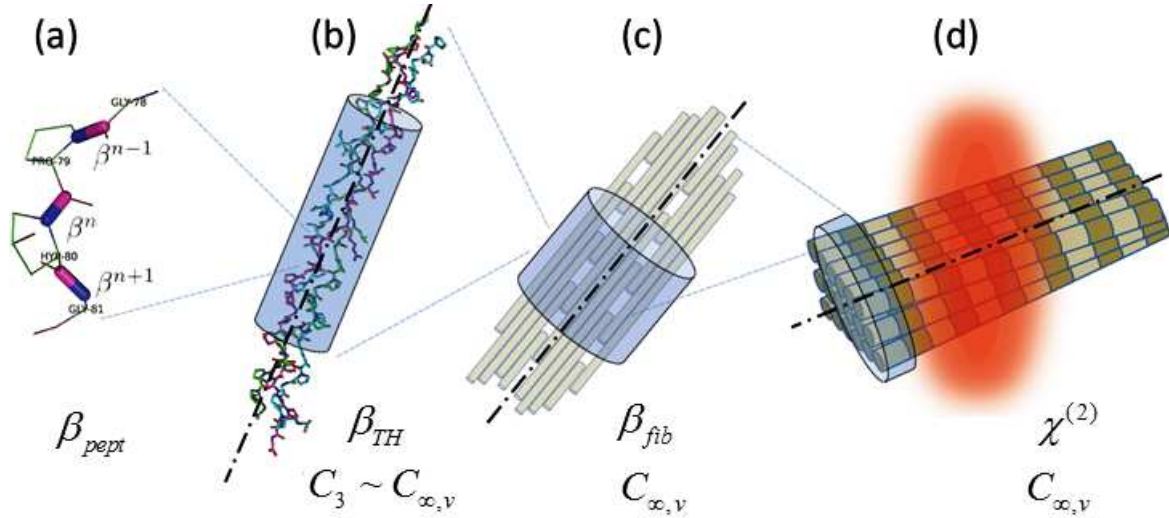


FIGURE II.20 – Structure hiérarchique du collagène : (a) *Liaison peptidique*, (b) *Triple hélice*, (c) *Fibrille* et (d) *Fibre* [thèse d'Ivan Gusachenko].

Fibre - Finalement, on atteint l'échelle macroscopique en sommant la contribution de toutes les fibrilles dans le volume focal (figure II.20.d), pour définir la susceptibilité non-linéaire d'une fibre de collagène, ou aux échelles supérieures (lamelles, faisceaux...) :

$$\chi_{IJK}^{(2)} = \frac{1}{V} \sum_n \beta_{fib,ijk} \mathcal{P}_i^I(\varphi_n, \theta_n, \psi_n) \mathcal{P}_j^X(\varphi_n, \theta_n, \psi_n) \mathcal{P}_k^X(\varphi_n, \theta_n, \psi_n) = c_{fib} \langle \beta_{fib,ijk} \rangle_\Omega \quad (\text{II.49})$$

où c_{fib} est la densité de fibrilles dans la fibre et $\langle \rangle_\Omega$ la moyenne sur les orientations de toutes les fibrilles contribuant au signal. Ici, et dans toute la suite, les lettres minuscules désignent le référentiel propre d'une fibrille de collagène alors que les lettres majuscules correspondent au référentiel associé à la fibre.

Finalement les champs incident et rayonné sont directement reliés par la susceptibilité non-linéaire du matériau. Ainsi, connaissant le $\chi^{(2)}$ du milieu il est possible de calculer les propriétés du signal SHG à partir de celles du champ incident. A l'inverse, la connaissance des champs rayonné et incident peut nous donner des informations sur le tenseur de susceptibilité et ainsi sur la structure sub-micrométrique de l'échantillon.

SHG résolue en polarisation - Pour une fibre de collagène alignée selon l'axe x (le plan (x,y) étant orthogonal à l'axe optique z) on peut définir, à partir des deux composantes indépendantes, un unique paramètre ratiométrique caractérisant le tenseur à un facteur près :

$$\rho = \frac{\chi_{xxx}^{(2)}}{\chi_{xzz}^{(2)}} \quad (\text{II.50})$$

Ce paramètre détermine l'anisotropie de la réponse en polarisation du collagène et donc le degré d'organisation dans le volume focal [22]. Il peut être défini aux différentes échelles hiérarchiques d'organisation. Par exemple, dans un tissu (eq. II.50) ou pour une unique fibrille :

$$\rho_{fib} = \frac{\beta_{xx, fib}}{\beta_{yy, fib}} \quad (\text{II.51})$$

Ce paramètre peut être sondé par des techniques de SHG résolue en polarisation (P-SHG) consistant à analyser le signal dans le tissu en changeant la direction de polarisation incidente.

La valeur actuelle de ρ , mesurée dans des tendons [22, 135], est de 1,4 bien que des mesures antérieurs fassent état d'une importante disparité des résultats [80, 81, 129, 138]. Ces valeurs expérimentales sont bien en accord avec les hypothèses de symétrie de Kleinman et $C_{\infty, v}$. Toutefois, comme il n'est pas possible de tester l'ensemble des coefficients du tenseur $\chi^{(2)}$ avec ces techniques, la question de la symétrie du tenseur n'est pas définitivement résolue.

Quoi qu'il en soit, ce formalisme donne un cadre de travail intéressant pour analyser la réponse du collagène. La P-SHG a été utilisée avec succès, par exemple, pour déterminer l'orientation locale de fibrilles dans des tissus [139, 140], en particulier dans la cornée où ces fibrilles ne sont pas résolues optiquement [16]. D'autres études ont utilisé la valeur de ρ pour déterminer l'angle des liaisons peptidiques dans une molécule de collagène (46° à 50°) [136, 141], ce qui permet de faire un lien entre les réponses SHG à l'échelle de la liaison peptidique et à l'échelle du tissu.

II.2.3.3 Spécificité pour le collagène fibrillaire

Nous avons vu qu'à l'échelle du tropocollagène, la partie de la molécule de collagène responsable de la SHG est très certainement son domaine en triple hélice. Cependant, comme cette triple hélice est le point commun de toutes les protéines de la famille des collagènes¹⁵, tous les types devraient générer du signal de seconde harmonique. Des travaux menés antérieurement par Pena et coll. ont d'ailleurs démontré que les molécules de collagène de type I et de type IV présentent des signaux non-linéaires du même ordre de grandeur [134] lorsqu'ils sont agencés sous forme de films minces. Ainsi la différence observée entre les collagènes I et IV (figure II.21) dans les tissus ne se situe pas au niveau moléculaire. Comme nous l'avons vu précédemment, du fait du caractère cohérent de la SHG, l'organisation 3D des molécules de collagène est elle aussi cruciale pour que les champs rayonnés par les différents dipôles interfèrent constructivement. Dans le cas des collagènes fibrillaires (type I, II, III, V...), la structure spécifique permet un accroissement significatif des signaux SHG alors que dans le cas du collagène IV, organisé en réseau 2D (centrosymétrique), les signaux interfèrent destructivement.

Ainsi, c'est le domaine en triple hélice qui est responsable de la SHG au niveau moléculaire, mais c'est l'organisation macromoléculaire qui détermine l'efficacité de la génération de seconde harmonique. C'est pourquoi la SHG offre une excellente spécificité pour le collagène fibrillaire, notamment dans les tissus.

¹⁵. Bien que les domaines collagéniques soient plus ou moins longs suivant le type considéré.

II.3. Dispositif expérimental

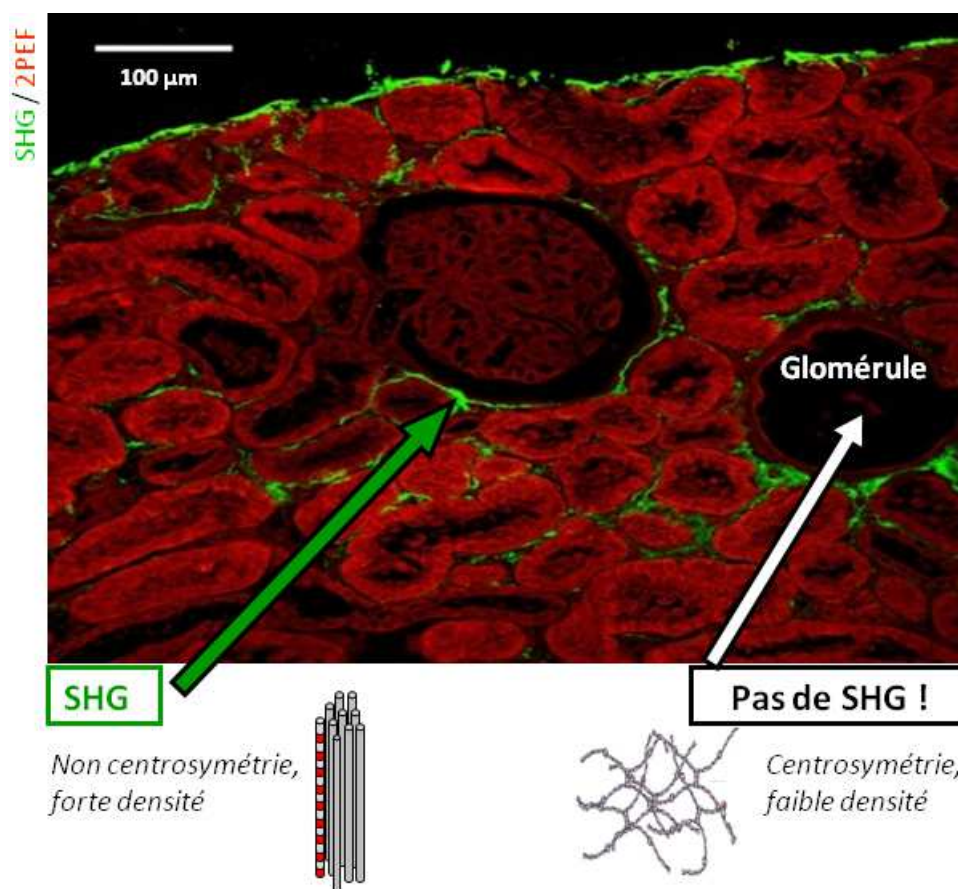


FIGURE II.21 – Spécificité de la SHG pour le collagène fibrillaire : Image de rein humain fibrosé. La SHG (en vert) dénote la présence de collagène fibrillaire. A l'opposé, il n'y a pas de signal provenant de l'intérieur du glomérule alors même que l'on sait, par des techniques de marquage histologique, qu'il y a du collagène IV [source : Strupler et coll. [26]].

II.3 Dispositif expérimental

Dans toute la suite de ce manuscrit, l'imagerie combinée SHG/2PEF est réalisée à l'aide d'un microscope droit à balayage laser conçu au LOB par Emmanuel Beaurepaire (figure II.22). Une source d'intensité modulable est réfléchi sur des miroirs galvanométriques, permettant de déplacer le point de focalisation du laser dans l'échantillon, et focalisée à travers un objectif à forte ouverture numérique. Pour une position donnée du spot laser, les signaux 2PEF et SHG sont collectés vers l'avant (transmission) ou vers l'arrière (épi-détection). L'image est alors réalisée pixel par pixel en déplaçant le point focal. L'ensemble du système est commandé par un programme Labview développé au laboratoire.

Source - L'excitation est basée sur un laser femtoséconde Titane:Saphir (Tsunami pompé par un Millennia 5 W, Spectra-Physics), accordable dans une gamme de longueurs d'onde de 700 à 990 nm délivrant des impulsions de 150 fs avec un taux de répétition

de 76 MHz . La puissance moyenne en sortie de laser varie autour de 750 mW pour des longueurs d'onde entre 730 et 860 nm . En sortie du laser la polarisation est quasi-linéaire ($\epsilon \sim 98\%$).

Contrôle de la puissance - La puissance injectée dans le microscope est contrôlée par une lame demi-onde ($\lambda/2$) achromatique, montée sur un moteur pas-à-pas et couplée avec un prisme de Glan positionné de sorte à ce qu'une polarisation incidente parallèle à l'un des axes neutres du cristal soit totalement réfléchi. La lame $\lambda/2$, en tournant la polarisation incidente avant le prisme de Glan, va permettre de moduler la fraction de lumière transmise par celui-ci. Ce système autorise une extinction totale (0%) du faisceau à toutes les longueurs d'onde, et une transmission quasi-totale ($\sim 100\%$). Un obturateur mécanique bloque le faisceau juste après le prisme de Glan, ne s'ouvrant que lors de l'acquisition d'une image, dans le but de limiter les photo-dommages et le photo-blanchiment de l'échantillon.

Balayage - Le balayage du faisceau se fait grâce à deux miroirs galvanométriques (GSI-Lumonics) qui, en modifiant leurs angles par rapport au laser, permettent de changer l'angle d'incidence du faisceau sur la face arrière de l'objectif et donc la position du point de focalisation.

Télescope - Le faisceau passe ensuite au travers d'un système afocal (télescope), conjuguant optiquement les miroirs galvanométrique avec la pupille arrière de l'objectif, qui permet d'augmenter le diamètre du faisceau pour couvrir toute la surface de l'objectif. Cette étape est cruciale car elle permet d'utiliser l'intégralité de l'ouverture numérique (NA) disponible et donc d'obtenir la résolution maximale, au détriment toutefois du champ de vue et de la puissance d'excitation. Dans notre cas le système afocal augmente la taille du faisceau d'un facteur 7 pour couvrir les 2 cm de diamètre de la pupille arrière de notre objectif (20x, 0,95 W) sans toutefois perdre trop de puissance.

Polarisation - La polarisation incidente est contrôlée juste avant l'objectif. Différentes configurations sont utilisées en fonction de l'usage.

Polarisation linéaire - Malgré la présence du prisme de Glan en entrée du microscope, la polarisation en pupille arrière de l'objectif est relativement elliptique ($\epsilon \approx 86\%$)¹⁶. On utilise une lame quart-d'onde achromatique pour corriger l'ellipticité résiduelle et obtenir une polarisation "plus" linéaire ($\epsilon \approx 95\%$). Une lame $\lambda/2$ est placée ensuite pour faire tourner la polarisation incidente sur l'échantillon. Cette configuration permet de faire de la microscopie SHG résolue en polarisation (P-SHG).

Polarisation circulaire - On peut aussi utiliser la lame $\lambda/4$ pour obtenir une polarisation circulaire. Cependant, l'ellipticité obtenue reste relativement haute ($\epsilon \approx 12\%$). Pour obtenir une polarisation circulaire "plus propre", la lame $\lambda/4$ est placée de sorte à donner une polarisation linéaire et on ajoute une seconde lame $\lambda/4$ à la place de la lame demi-onde. Ce montage permet aussi de différencier une polarisation circulaire droite ($\epsilon \approx 2\%$) ou gauche ($\epsilon \approx 0\%$). Ce type de polarisation permet de s'affranchir en partie de la dépendance en orientation de la SHG. En effet, dans le cas d'une polarisation linéaire,

16. Principalement à cause du miroir dichroïque d'injection et des miroirs galvanométriques.

II.3. Dispositif expérimental

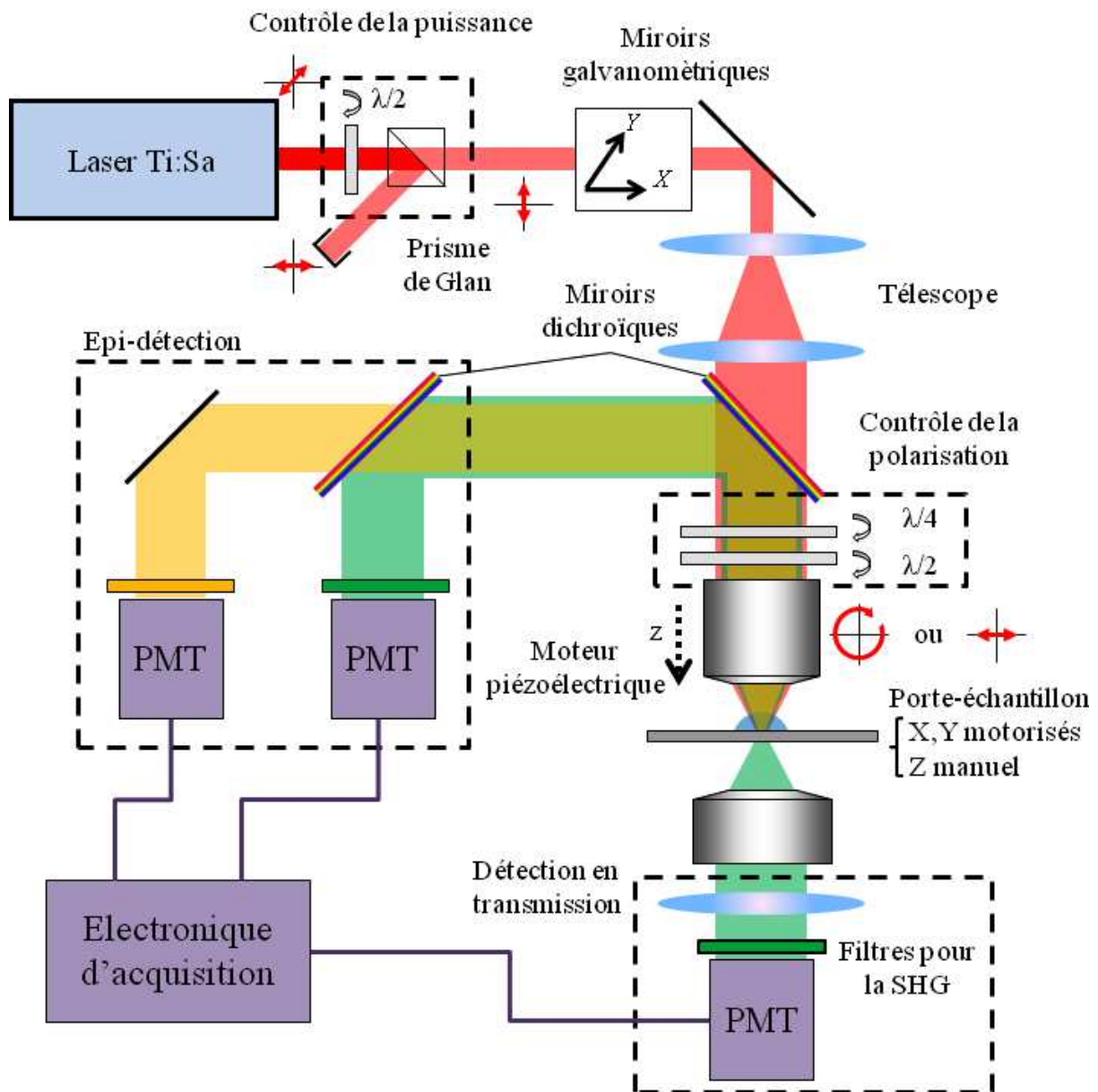


FIGURE II.22 – Schéma du microscope.

les fibres de collagène orientées dans la direction de la polarisation donneront plus de signal que celles orientées perpendiculairement. Au contraire une polarisation incidente circulaire permet d'éviter de favoriser une direction du plan focal dans l'échantillon.

Objectifs - Le faisceau est focalisé sur l'échantillon par un objectif. Pour des échantillons biologiques épais, les objectifs à immersion et à grande distance de travail sont privilégiés. En effet, pour générer efficacement des processus non-linéaires, l'objectif doit avoir une grande ouverture numérique, typiquement supérieure à 0,6 (cf. II.1.3), permettant d'obtenir de bonnes résolutions axiale (figure II.23.a-c-e) et latérale (figure II.23.b-c-d) combinées avec un champ de vue relativement large et une excellente collecte des

signaux de fluorescence et de SHG.

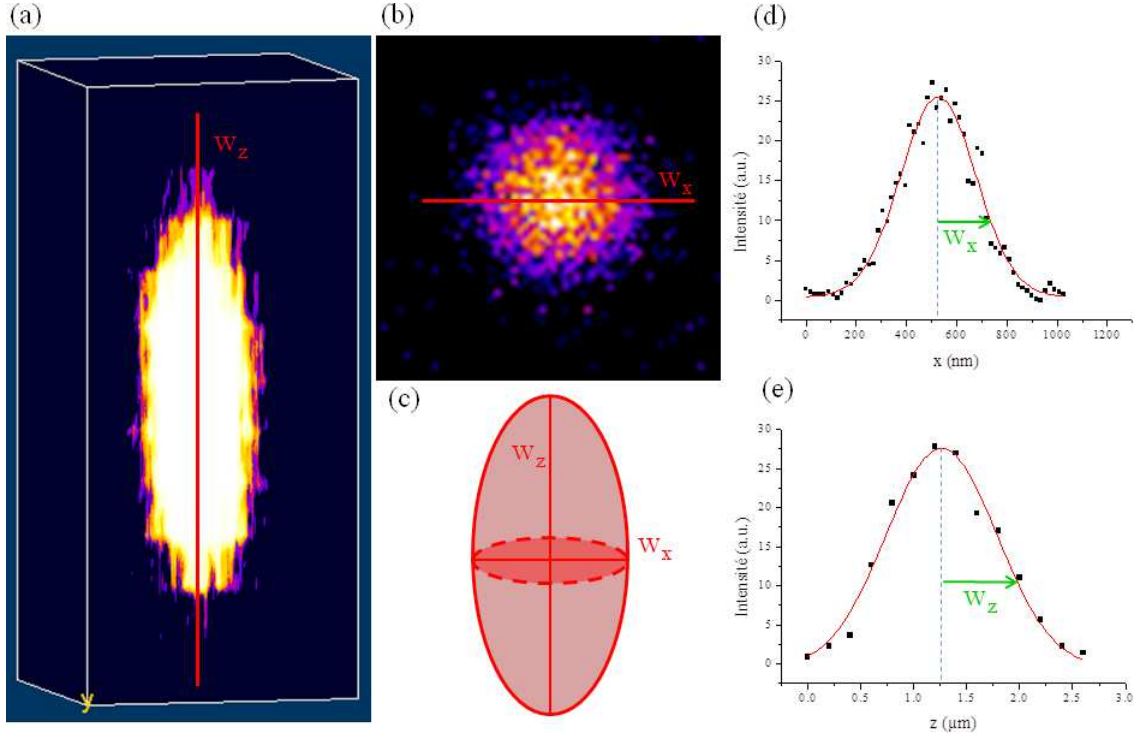


FIGURE II.23 – Volume focal : (a) *Vue longitudinale*, (b) *Coupe transverse*, (c) *Schéma*, (d) et (e) *Profils d'intensité latéral et axial obtenus*, w_x et w_z étant les demi-largeurs à $1/e$. Les mesures sont faites à partir d'un échantillon de nanoparticules fluorescentes de 100 nm (Molecular Probes, carboxylates-modified microspheres, yellow-green 505/515, F-8803) dans un gel d'agarose.

Enfin les objectifs pour la microscopie multiphoton doivent transmettre dans le proche infra-rouge jusqu'à des longueurs d'onde de $1\ \mu\text{m}$. Nous utilisons usuellement 3 objectifs dont les caractéristiques principales sont résumées dans la table II.1. La profondeur de

Objectif	P_{foc} (mW)	FOV (μm^2)	$2w_{xy}$ (nm)	$2w_z$ (nm)	d (mm)
20x, 0,95 W/IR	153	486×486	406	1656	2
40x, 1,10 W/IR	53	230×230	364	1198	0,45
60x, 1,30 W/IR	27	154×154	336	772	0,28

TABLE II.1 – Objectifs utilisés : *Principales caractéristiques pour une longueur d'onde d'excitation de 860 nm et une puissance en sortie de laser de 700 mW. P_{foc} , puissance au foyer; FOV, champ de vue; w_{xy} et w_z demi-largeur à $1/e$ latérale et axiale et d, distance de travail.*

focalisation dans l'échantillon est contrôlée grâce à un moteur pas-à-pas (Physik Instrumente M-126 DG), de pas minimal $0,2\ \mu\text{m}$, qui déplace l'objectif, et donc le point focal, axialement. En plus du dispositif de balayage du faisceau, la platine porte-échantillon

II.3. Dispositif expérimental

est motorisée à l'aide d'un micro-positionneur (Physik Instrumente M-111.1 DG), ce qui permet de réaliser des mosaïques d'images pour augmenter le champ de vue et atteindre quelques centimètres de côté.

Voies de détection - Le microscope possède plusieurs voies de détection : en transmission, utilisables lorsque l'échantillon n'est pas trop épais ou trop diffusant, et en épi-détection. Les voies en transmission collectent la SHG grâce à un condenseur positionné au plus près de l'échantillon (pour éviter de perdre des photons à l'émission). Des filtres interférentiels appropriés (FF01-427/10, FF01-680/SP et FF01-720/SP, Semrock), positionnés en amont du détecteur, sélectionnent la longueur d'onde d'émission SHG (430 nm dans ce cas) et coupent le laser. Comme l'émission de SHG est souvent plus intense en transmission qu'en épi-détection, il est avantageux, quand cela est possible, de mesurer le signal SHG sur cette voie. De plus, en plaçant un cube séparateur en aval de l'échantillon, il est possible d'analyser la polarisation en transmission, en ajoutant des polariseurs croisés devant les détecteurs.

Pour l'épi-détection, un miroir dichroïque (Chroma 695 DCXRU) est placé au-dessus de l'objectif de sorte que le faisceau laser soit transmis mais que les signaux SHG et 2PEF (en-dessous de 690 nm) soient réfléchis vers l'étage de détection arrière. Un deuxième miroir dichroïque (SemRock BrightLine F458-Di01) à 458 nm sépare le signal SHG (à 430 nm) de l'émission de fluorescence excitée à 2 photons (autour de 500 nm) et permet de mesurer ces 2 signaux simultanément. Pour améliorer la spécificité de chacun des canaux, des filtres spécifiques¹⁷ sont placés devant chaque photomultiplicateur permettant de sélectionner le signal voulu et de couper l'intensité laser résiduelle. Pour assurer une collection maximale des photons, la pupille avant de l'objectif est conjuguée avec chaque détecteur. Il est important de noter que les canaux en épi-détection sont les seuls disponibles pour des études *in vivo*.

Détecteurs - Les détecteurs utilisés, tant en épi-détection qu'en transmission, sont des tubes photomultiplicateurs (P25PC, Electron Tubes, Hamamatsu) sensibles sur une bande de 300 à 550 nm. Ils sont utilisés en mode de comptage de photons et fonctionnent à une fréquence de 100 MHz (supérieure au taux de répétition du laser) afin de détecter chaque photon. Pour rester dans le domaine du comptage de photons, l'occurrence doit typiquement être inférieure à 1 photon pour 5 impulsions laser.

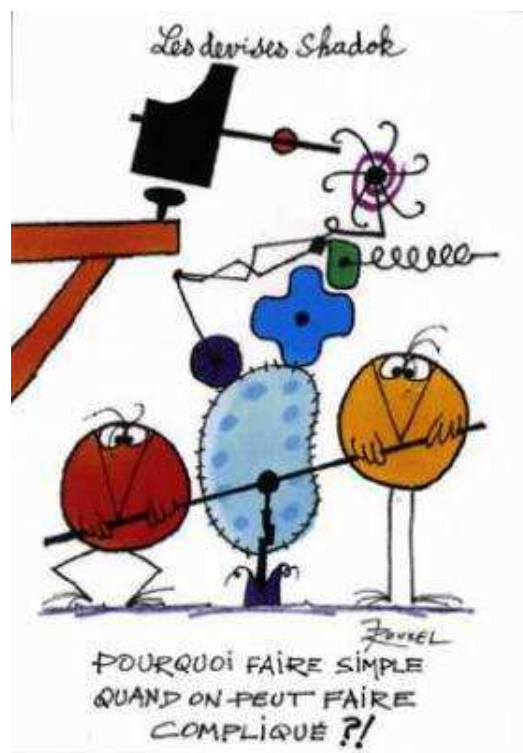
Acquisition et contrôle - L'électronique d'acquisition intègre le nombre de photons détectés pour chaque pixel¹⁸ durant typiquement 10 μs , soit une fréquence d'acquisition typique de 100 kHz. Cette fréquence est un bon compromis entre le S/N et la rapidité d'acquisition : il faut alors quelques secondes ($\sim 2 - 3 s$) pour acquérir une image de 512×512 pixels. Le système peut cependant fonctionner jusqu'à 400 kHz pour suivre des processus rapides, ou 1 kHz pour intégrer le signal longtemps lorsque les signaux à détecter sont faibles.

Enfin le système est commandé par un programme Labview (LabVIEW 6, National Instruments), développé au sein du LOB. Il permet de contrôler tous les éléments du

17. FF01-427/10, FF01-680/SP et FF01-720/SP, Semrock pour la SHG et GG5 Schott, FF01-680/SP et FF01-720/SP, Semrock pour la 2PEF.

18. En le multipliant par 14 pour limiter l'impact du bruit électronique de la boîte d'acquisition.

microscope, de synchroniser les différents modules et d'acquérir jusqu'à quatre canaux simultanément (usuellement 2 en épi-détection et 2 en transmission).



Chapitre III

Caractérisation et contrôle de la fibrillogenèse du collagène

*De ce que rien n'est intelligible,
il ne s'ensuit pas le droit de conjecturer l'absurde*
- Jean Rostand

Sommaire

III.1 Fibrillogenèse en milieu peu dense	69
III.1.1 Protocole	69
III.1.2 Cinétique de croissance du réseau collagénique	72
III.1.3 Croissance d'une fibrille isolée	75
III.1.4 Conclusion	77
III.2 Contrôle chimique de la fibrillogenèse	78
III.2.1 Fonctionnalisation des nanoparticules de silice	79
III.2.2 Modification de la fibrillogenèse et du réseau collagénique	81
III.2.3 Imagerie de la fibrillogenèse	83
III.2.4 Traitements d'images préliminaires en 2D	84
III.2.5 Traitements avancés des images	87
III.2.6 Résultats	92
III.3 Conclusion et perspectives	98

Comme nous l'avons vu au premier chapitre, le collagène de type I est une protéine ubiquitaire qui constitue la principale composante des tissus conjonctifs. Synthétisé par les cellules sous forme de triples hélices, le collagène s'auto-assemble en fibrilles *in vivo* et *in vitro* pour former des réseaux 3D [52, 142, 143]. Ce mécanisme est contrôlé par de nombreux paramètres physico-chimiques tels que la concentration en collagène, la température, le pH ou la force ionique de la solution tampon [144, 145, 146, 147]. La compréhension de ces processus demeure essentielle tant d'un point de vue fondamental, que pour l'ingénierie de biomatériaux et la bonne intégration de fonctionnalités biologiques au sein de systèmes synthétiques. Il s'agit d'un des buts de l'équipe "Matériaux et Biologie", du Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP, UPMC-Collège France),

qui rassemble des chimistes et des biologistes autour de stratégies reposant sur l'intégration de fonctionnalités spécifiques de la biologie (auto-organisation, reconnaissance moléculaire...) au sein de matériaux polymères, hybrides ou inorganiques, pour l'élaboration de biomatériaux. En effet, la formation de matériaux biomimétiques représente un champ de recherche intensif pour le développement d'applications spécifiques dans des domaines variés, incluant les technologies biomédicales (ingénierie tissulaire, biosenseurs, systèmes de délivrance de médicaments) [148]. Dans ce contexte, l'usage des propriétés d'auto-assemblage de macromolécules biologiques apparaît comme une modalité intéressante pour contrôler la structure de réseaux auto-organisés, en utilisant les fonctions de molécules bioactives. Les mécanismes d'auto-assemblage sont largement répandus dans les organismes vivants et ainsi différentes molécules pertinentes sont disponibles comme intermédiaire structurant [149]. L'introduction d'homologues inorganiques offre d'autres manières d'adapter les propriétés des matériaux, dans le but d'améliorer les propriétés chimiques et mécaniques des composites finaux en tirant parti des avantages de chacun des composants. Parmi les exemples d'utilisations, des protéines (telles que la soie [150], le collagène [151, 152] ou la gélatine [153]), des polysaccharides (chitine [154]) ou de l'ADN [155, 156] ont été utilisés avec des matériaux inorganiques (en particulier la silice ou l'or) pour créer des systèmes hybrides sophistiqués.

Ce chapitre présente des études effectuées en collaboration avec Carole Aimé (LCMCP) portant sur la caractérisation de la cinétique de fibrillogenèse du collagène en milieu peu dense, et le contrôle de la formation des fibrilles dans le but d'influer sur les propriétés structurales du réseau collagénique. Les buts sont les suivants :

- montrer que la microscopie SHG est une technique pertinente pour obtenir des informations 3D sur la formation des fibrilles de collagène, notamment en développant une analyse d'image quantitative
- caractériser la cinétique de formation des fibrilles en fonction de différents paramètres physico-chimiques et étudier la possibilité d'influencer cette cinétique, ou l'agencement du réseau collagénique, en ajoutant des nanoparticules de silice fonctionnalisées
- plus indirectement, se familiariser avec des solutions peu denses de fibrilles de tailles variables pour préparer les mesures de calibration des signaux SHG (cf. chapitre IV).

Dans un premier temps, nous avons utilisé la microscopie SHG en *time-lapse* pour imager *in situ*, de manière continue et non-invasive, l'auto-assemblage des fibrilles de collagène en solution, sans préparation ou marquage spécifique. Comme preuve de concept, nous avons profité de l'avantage qu'offre une variation de pH contrôlée pour faire varier la cinétique de formation des fibrilles, comme décrit dans la littérature [144, 145, 146, 147]. Partant de là nous avons étudié la reproductibilité des dynamiques de fibrillogenèse accessibles par cette méthode. En outre, nous avons montré que la SHG peut être utilisée pour imager *in situ* la croissance d'une unique fibrille de collagène en solution, avec un diamètre (~ 100 nm) en-dessous de la résolution optique (≈ 360 nm).

Dans un second temps, nous avons étudié la façon dont on peut influencer la structure du réseau fibrillaire ainsi que ses propriétés, notamment mécaniques, par ajout de colloïdes, ici de la silice. En effet, comme cela a été montré au LCMCP [157], la fonctionnalisation des interfaces particules/polymères permet de favoriser la formation de fibrilles de collagène à la surface des nanoparticules. Ainsi, en tirant parti des propriétés

III.1. Fibrillogenèse en milieu peu dense

d'auto-assemblage du collagène, il semble possible de créer des réseaux silice-collagène en solution, dans lesquels les propriétés structurales et de reconnaissance spécifique des fibrilles de collagène sont bien préservées. Toutefois le réseau hybride ainsi obtenu forme un système 3D complexe. Pour réaliser une analyse d'image avancée et reproductible nous avons travaillé en collaboration avec Étienne Decencière et Vaia Machairas du Centre de Morphologie Mathématiques (CMM, MINES ParisTech) de Fontainebleau, pour mettre en place un traitement 3D pertinent des piles d'images.

III.1 Fibrillogenèse en milieu peu dense

Pour comprendre les mécanismes d'auto-assemblage du collagène à l'échelle nanométrique, la microscopie électronique est usuellement pratiquée à différents stades de fibrillogenèse pour obtenir des images haute résolution [158]. Cependant, cette technique ne permettant pas le suivi dynamique d'un même échantillon, les informations obtenues demeurent des statistiques à différents stades d'évolution. La structure des fibrilles de collagène et la cinétique de fibrillogenèse ont aussi été étudiées en AFM [159, 160], ce qui a permis une imagerie *in situ* en solution liquide, mais avec un champ de vue relativement restreint (inférieur à $100\ \mu m^2$) et en 2D. Finalement, il subsiste le besoin d'une technique non-invasive pour suivre la dynamique d'assemblage du collagène dans un environnement 3D. A cet égard, les microscopies optiques telles que le confocal de réflectance [72, 161, 162] ou la génération de seconde harmonique [118, 163, 164, 26] apparaissent comme des techniques permettant de visualiser efficacement l'architecture 3D du réseau collagénique, sans aucun marquage. En particulier, la microscopie SHG étant une bonne sonde de l'organisation macromoléculaire du collagène, elle a récemment été utilisée pour caractériser l'architecture des fibrilles dans des matrices de collagène [144, 163, 165, 166]. Toutefois, la dynamique de formation du réseau collagénique n'avait pas été observée en SHG avant cette étude.

III.1.1 Protocole

III.1.1.1 Préparation des échantillons

Le collagène de type I est d'abord extrait de tendons de queues de rats, purifié puis solubilisé, selon un protocole déjà établi au LCMCP (cf. annexe C), à une concentration de $100\ \mu g/ml$ (solution peu dense), dans de l'acide acétique $0,5\ M$ à $pH \approx 2,5$. La modification des paramètres physicochimiques de la solution a un effet critique sur la fibrillogenèse du collagène [144, 145, 146, 147]. En particulier, le point isoélectrique des fibrilles de collagène étant proche de 7,5 [167] (figure III.1), en utilisant un pH légèrement acide ($6-6,5$) on peut ralentir la cinétique de formation des fibrilles grâce à des répulsions électrostatiques entre les triples hélices de collagène.

Usuellement, la fibrillogenèse est induite par une hausse du pH, en plaçant l'échantillon sous une cloche contenant des vapeurs d'ammoniac. Dans notre cas, l'usage d'ammoniac étant prohibé sous les objectifs de microscope, la hausse du pH est faite par ajout de soude. Pour faire varier la dynamique de formation des fibrilles deux valeurs de pH ($6,5 \pm 0,3$ ou $7,5 \pm 0,3$) ont été utilisées, correspondant à deux cinétiques de fibrillogenèse respectivement lente et rapide. Comme la température influence aussi bien la cinétique

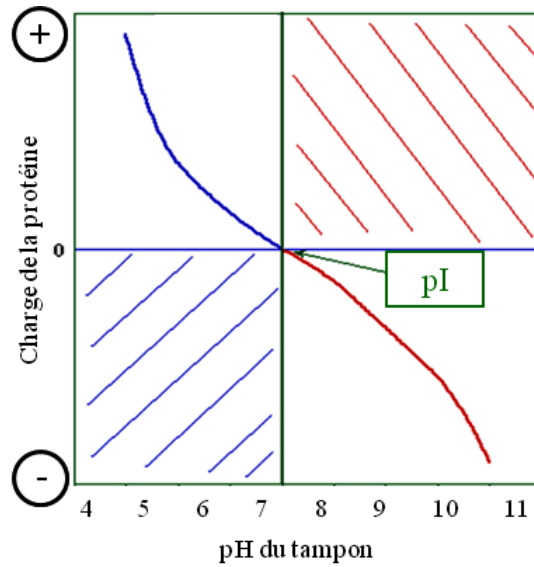


FIGURE III.1 – Point isoélectrique du collagène : *En-dessous d'un pH de 7,5 le collagène porte une charge positive responsable de la solubilité des triples hélices à pH acide [source : E. Jaspard, Université d'Angers].*

que le diamètre final des fibrilles, nous avons travaillé à température ambiante constante $21 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Une goutte ($3\ \mu\text{l}$) de solution est placée entre deux lamelles et observée directement au microscope sans aucune étape de marquage.

III.1.1.2 Microscopie SHG

L'échantillon est illuminé à $860\ \text{nm}$, dans une configuration droite, avec une polarisation circulaire ($\epsilon = 12\%$) pour imager uniformément les fibrilles, quelle que soit leur orientation dans le plan focal. L'échantillon étant transparent et peu diffusif les piles d'images sont acquises en transmission. Le faisceau est focalisé par un objectif à immersion 40x, 1,1 NA offrant une puissance au foyer d'environ $55\ \text{mW}$. La taille typique des piles d'images est de $163 \times 159 \times 30\ \mu\text{m}^3$ ($600 \times 590 \times 60$ voxels) avec une taille pixel latérale de $0,27\ \mu\text{m}$ et axiale de $0,5\ \mu\text{m}$. On utilise une fréquence de $100\ \text{kHz}$ (soit un temps d'intégration par pixel de $10\ \mu\text{s}$). Dans ces conditions, l'acquisition d'une pile d'images prend environ 5 minutes.

Des acquisitions séquentielles (*time-lapse*) sont faites toutes les 10 minutes durant 3 heures pour les cinétiques rapides ($\text{pH} = 7,5 \pm 0,3$) ou toutes les 20 minutes durant 14 heures pour les cinétiques lentes ($\text{pH} = 6,5 \pm 0,3$). Ces deux conditions de pH permettent d'étudier la reproductibilité et la variabilité des cinétiques accessibles en microscopie SHG. En effet, en-dessous d'un $\text{pH} = 6,5$ la cinétique est très lente (plusieurs dizaines d'heures), tandis que lorsque l'on atteint un pH de $7,5$ la croissance des fibrilles est très rapide (quelques minutes) et difficilement accessible avec une imagerie à balayage¹.

1. De surcroît, le saut de pH du tampon se faisant autour de 8, au-delà d'un de $7,5$ la valeur du pH est très difficile à ajuster précisément.

III.1. Fibrillogenèse en milieu peu dense

III.1.1.3 Microscopie électronique

En parallèle, des observations TEM ont été faites sur des échantillons à cinétiques lente et rapide pour vérifier que la structure des fibrilles observées est bien celle attendue. Pour cela, une goutte de solution aqueuse est déposée sur une grille de cuivre (300 *mesh*), recouverte d'un film de carbone, sans marquage à l'acétate d'uranyle. Après 3 minutes, l'excès de liquide est absorbé avec du papier filtre (Whatman #4). L'observation est faite à température ambiante sur un microscope électronique (JEOL 1011) en travaillant à 100 *kV* et les images sont enregistrées sur une caméra CCD (Gatan Orius). On peut voir (figure III.2) que les fibrilles présentent bien la périodicité typique de 67 *nm* observée dans le collagène tissulaire *in vivo* [52, 142, 145, 146, 158].

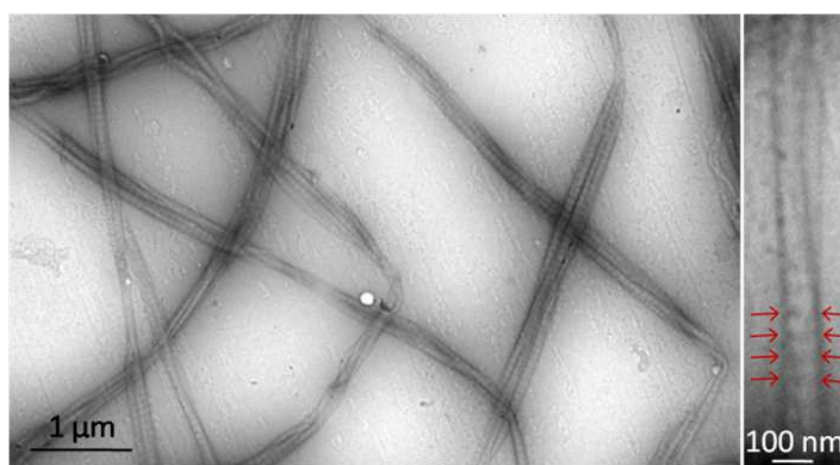


FIGURE III.2 – Fibrilles de collagène observées en TEM : sur un échantillon à cinétique lente. On voit notamment la striation de 67 *nm* caractéristique du collagène fibrillaire.

III.1.1.4 Traitements des images

Les images SHG sont ensuite analysées en utilisant le logiciel ImageJ (W. Rasband, NIH). Le bruit de fond sur les images est plutôt bas grâce à un choix de filtres adaptés pour bloquer le faisceau laser sur les détecteurs et sélectionner la longueur d'onde de la SHG via un filtre passe-bande de largeur ~ 10 *nm* (cf. II.3). Cependant, la surface totale de ce bruit de fond peut, malgré tout, être significative aux temps courts où les fibrilles sont rares, fines, et dispersées dans l'échantillon. Pour éviter cet effet les images sont filtrées en utilisant un filtre médian de 2 pixels de rayon. Les piles d'images sont ensuite projetées selon l'axe *z* (axe de propagation du laser) et l'étendue du réseau collagénique est quantifiée en calculant la fraction de pixels présentant du signal [144, 26, 166, 168]. Aucun seuillage n'est appliqué à ce stade car le bruit de fond est efficacement supprimé par le filtre médian. La croissance du réseau collagénique est finalement mesurée en calculant la fraction de pixels (*D*) présentant un signal non nul, rapporté au nombre total de pixels

de l'image, en fonction du temps :

$$D = \frac{\sum_{i \in \{image/I(i) \geq 1\}} 1}{\sum_{i \in \{image\}} 1} \quad (\text{III.1})$$

Cette valeur correspond à la densité volumique de fibrilles dans le champ de vue. A noter que nous n'utilisons pas ici la densité de signal intégrée² (cf. III.2.4) car celle-ci dépend directement de la puissance d'excitation, ainsi que de l'efficacité de collection, ce qui peut introduire un biais expérimental supplémentaire dans les mesures. Puisque nous sommes, dans un premier temps, intéressé par l'extension du réseau collagénique, et non par la densité locale de molécules de collagène, il est plus pertinent de se restreindre au calcul de la densité de fibrilles.

III.1.2 Cinétique de croissance du réseau collagénique

Pour chaque cinétique, la densité de fibrilles augmente avec le temps jusqu'à atteindre un plateau lorsque le collagène est fibrillé. La figure III.3 illustre cet effet et montre une

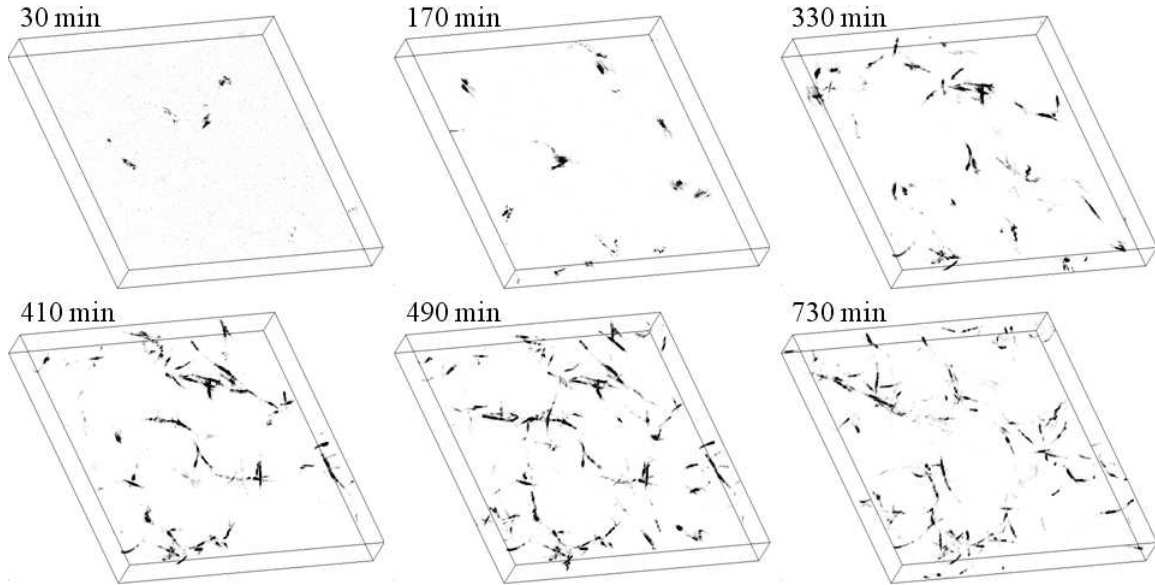


FIGURE III.3 – Croissance du réseau collagénique : Échantillon à cinétique lente ($pH = 6,5 \pm 0,3$) imagé durant 840 minutes (14h). Champ de vue $163 \times 159 \times 30 \mu m^3$.

reconstruction 3D du réseau de collagène à 6 temps dans le cas d'une cinétique lente où le plateau de densité est atteint après environ 490 minutes de fibrillogenèse. A noter que l'utilisation de solution de collagène très diluée permet d'obtenir un gel peu dense, après la fibrillogenèse, et donc des fibrilles isolées dans le champ de vue. On peut voir sur

2. La densité intégrée (ρ) correspond à la somme des valeurs des pixels dans le champ de vue. Elle est aussi égale à la valeur moyenne du signal multipliée par le nombre de pixels de l'image.

III.1. Fibrillogenèse en milieu peu dense

la première image de la série (après 30 minutes) que le bruit de fond apparaît relativement élevé, malgré le filtrage médian. Il est principalement dû au bruit électronique sur l'étage d'amplification des tubes photomultiplicateurs (PMT) qui s'accumule lors de la mise en place de l'échantillon, lumière allumée. Toutefois, les PMT se déchargent spontanément lorsqu'ils sont sous tension dans l'obscurité, de sorte que ce bruit de fond décroît rapidement et devient négligeable dès la 2^e ou la 3^e pile d'images (20 – 40 min).

En tant que technique hors résonance, la microscopie SHG permet théoriquement de sonder l'échantillon de façon non-destructive. Cela a été vérifié en changeant significativement le temps entre les acquisitions de deux piles d'images. En doublant le temps d'irradiation, aucun changement significatif de densité n'a pu être observé.

La figure III.4 montre l'évolution de la densité de fibrilles pour deux échantillons à pH 6,5 et 7,5 respectivement.

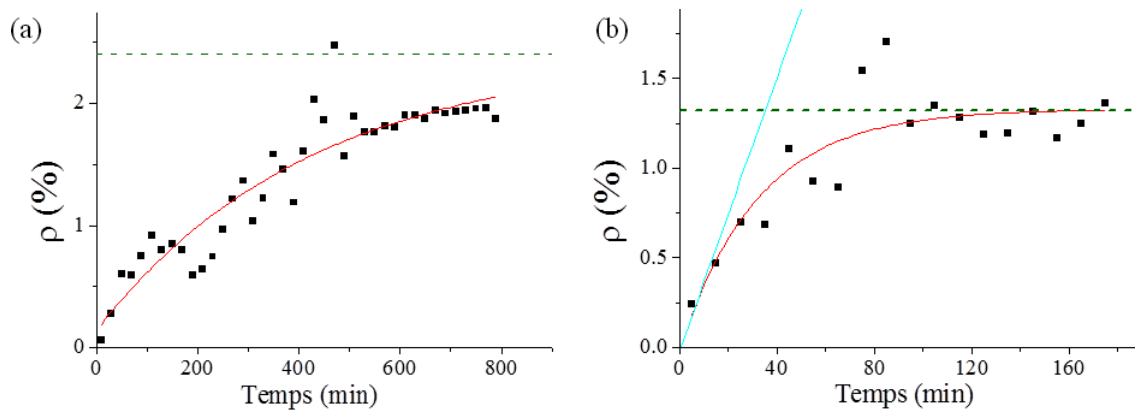


FIGURE III.4 – Évolution de la densité de collagène : *Variation en fonction du temps pour les deux types de cinétique (a) lente ($pH = 6,5 \pm 0,3$) et (b) rapide ($pH = 7,5 \pm 0,3$).*

Nous avons utilisé l'approche statistique présentée au paragraphe III.1.1.4 pour analyser quantitativement ces données SHG. Sur chaque image, la densité volumique de fibrilles est calculée et les données expérimentales sont ajustées avec une exponentielle :

$$y(t) = \frac{\tau}{B} \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}\right) \quad (\text{III.2})$$

pour obtenir la constante de temps caractéristique (τ) de croissance du réseau collagénique. On peut remarquer (table III.1) que l'ajustement exponentiel est un peu moins précis pour les cinétiques rapides que lentes en raison du nombre limité de points pouvant être acquis sur ce type de cinétique. Nous avons aussi observé un premier pic avant le plateau qui est probablement dû à la sédimentation de fibrilles de collagène dans la solution. Néanmoins les données sont efficacement ajustées par une fonction exponentielle.

Afin de mieux caractériser la précision de la technique, lorsque la densité volumique de fibrille est faible, nous nous sommes intéressé au début de la fibrillogenèse pour des cinétiques lentes. Pour cela nous avons sélectionné le début des courbes précédentes et étudié 5 autres échantillons uniquement aux temps courts. Pour chaque groupe de données expérimentales nous observons une croissance linéaire de la densité volumique de fibrilles

Chapitre III. Caractérisation et contrôle de la fibrillogenèse du collagène

(figure III.5), comme attendu pour le début d'une exponentielle. Les données sont ajustées par une droite et l'inverse de la pente ($1/a$) est utilisée comme temps caractéristique de croissance à l'origine. Pour les cinétiques rapides, le temps d'acquisition d'une pile d'images (environ 5 minutes) limitant le nombre de points au début de la courbe, il est impossible d'utiliser cette approche. A la place, il est préférable de calculer l'inverse de la pente (B) à l'origine des cinétiques exponentielles précédentes (figure III.4.b).

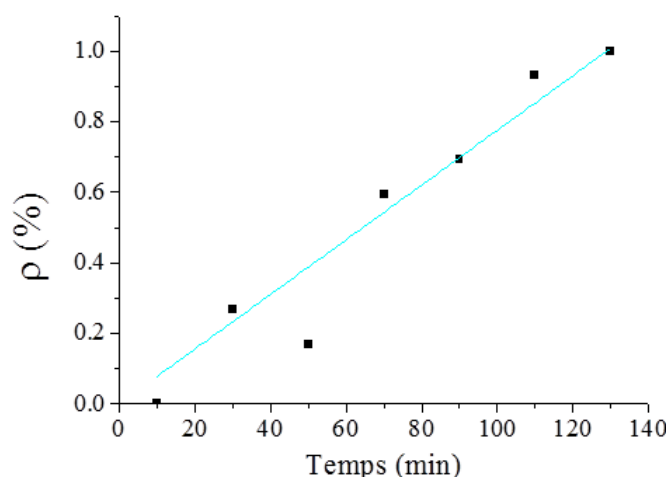


FIGURE III.5 – Début de fibrillogenèse : *Densité de collagène en fonction du temps pour une cinétique lente.*

Nous avons vérifié sur les échantillons à cinétique lente que les deux approches donnaient la même valeur, ce qui nous autorise à comparer ces données. La table III.1 donne les constantes de temps exponentielles, et les temps caractéristiques de croissance à l'origine pour l'ensemble des échantillons.

pH = 6,5 (lente)	τ (min)	352 ± 59	269 ± 59	543 ± 13	462 ± 124					
	$1/a$ (min/%)	130 ± 10	82 ± 7	169 ± 29	87 ± 20	105 ± 20	186 ± 10	139 ± 11	169 ± 19	426 ± 42
pH = 7,5 (rapide)	τ (min)	39 ± 25	49 ± 17	33 ± 7	93 ± 48					
	B (min/%)	23 ± 10	72 ± 19	25 ± 5	57 ± 14					

TABLE III.1 – Temps caractéristique de fibrillogenèse : *Pour les deux types de cinétiques, lente et rapide (en minutes).*

Ces données montrent une bonne reproductibilité puisque des valeurs similaires sont observées pour un même pH alors que des valeurs significativement différentes sont observées pour les deux pH différents. Cela apparaît clairement sur la figure III.6 qui montre les valeurs moyennes de la constante de temps exponentielle et du temps caractéristique à l'origine pour les cinétiques lentes et rapides.

III.1. Fibrillogenèse en milieu peu dense

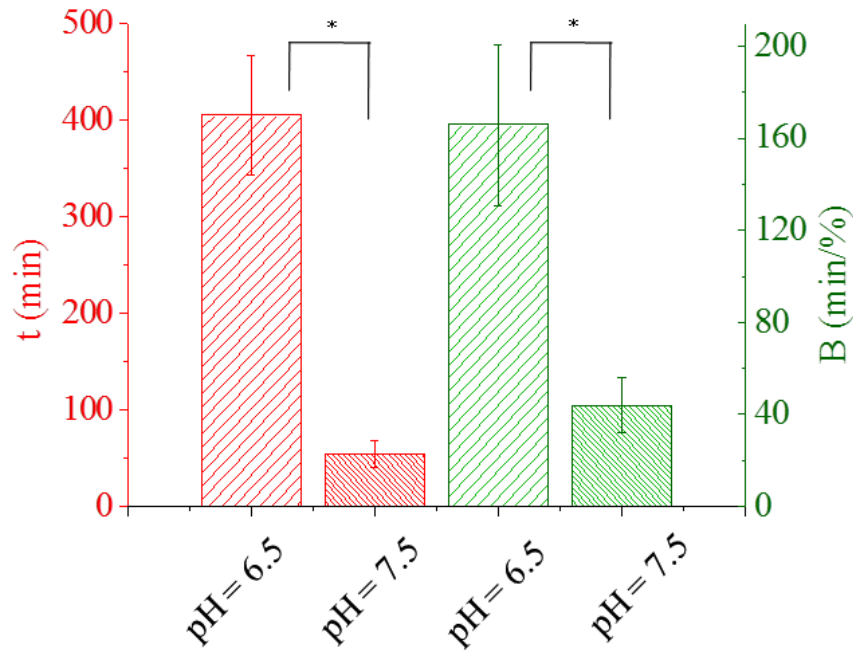


FIGURE III.6 – Statistiques de cinétique : Temps caractéristiques et inverses des pentes à l’origine pour les deux cinétiques de fibrillogenèse. L’étoile indique une différence significative (p – value < 1%).

pH	Temps caractéristique (min)	Inverse de la pente à l’origine
6,5 ± 0,3	405 ± 62	166 ± 35
7,5 ± 0,3	54 ± 14	44 ± 12

TABLE III.2 – Temps caractéristiques moyens de fibrillogenèse : Cas des cinétiques lente et rapide.

Ces valeurs (table III.2) permettent de discriminer clairement les deux populations d’échantillons. Pour cela, une analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel R (*R development core team, R foundation for statistical computing*, version 2.14.1). En choisissant un seuil critique de 1%, un F-test (test de variance) montre que les deux populations ont des variances différentes (p – value = 3,3%) pour la cinétique entière ainsi que pour le début de cinétique (p – value = 3,5%). Un test de Welch-Student (*two-sample Welch’s t-test*) unilatéral est donc utilisé pour la cinétique exponentielle (p – value = 0,45%) ainsi que pour le début de cinétique (p – value = 0,42%) et montre que ces paramètres permettent de bien discriminer les deux populations d’échantillons.

Comparée au TEM, qui est caractérisé par une très haute résolution mais des champs de vue limités (quelques dizaines de microns), la SHG apparaît ainsi comme une technique complémentaire suffisamment sensible pour imager la dynamique de formation de petites fibrilles de collagène avec une champ de vue large ($\sim 1 \text{ mm}^2$). Cette taille de champ de vue est cruciale pour obtenir des informations fiables sur la dynamique de l’échantillon puisqu’il permet de s’affranchir de comportements locaux singuliers.

III.1.3 Croissance d'une fibrille isolée

Au-delà de cette approche globale, nous avons aussi étudié la croissance d'une fibrille isolée dans un échantillon à cinétique lente. Pour cela la pile d'images est, après filtrage, rognée sur la zone d'intérêt (ROI) et l'intervalle de profondeur où la fibrille apparaît est sélectionné. La pile d'images est ensuite projetée à chaque temps (figure III.7) après le début de la fibrillogenèse. Ici, la croissance de la fibrille est suivie durant 5 heures.

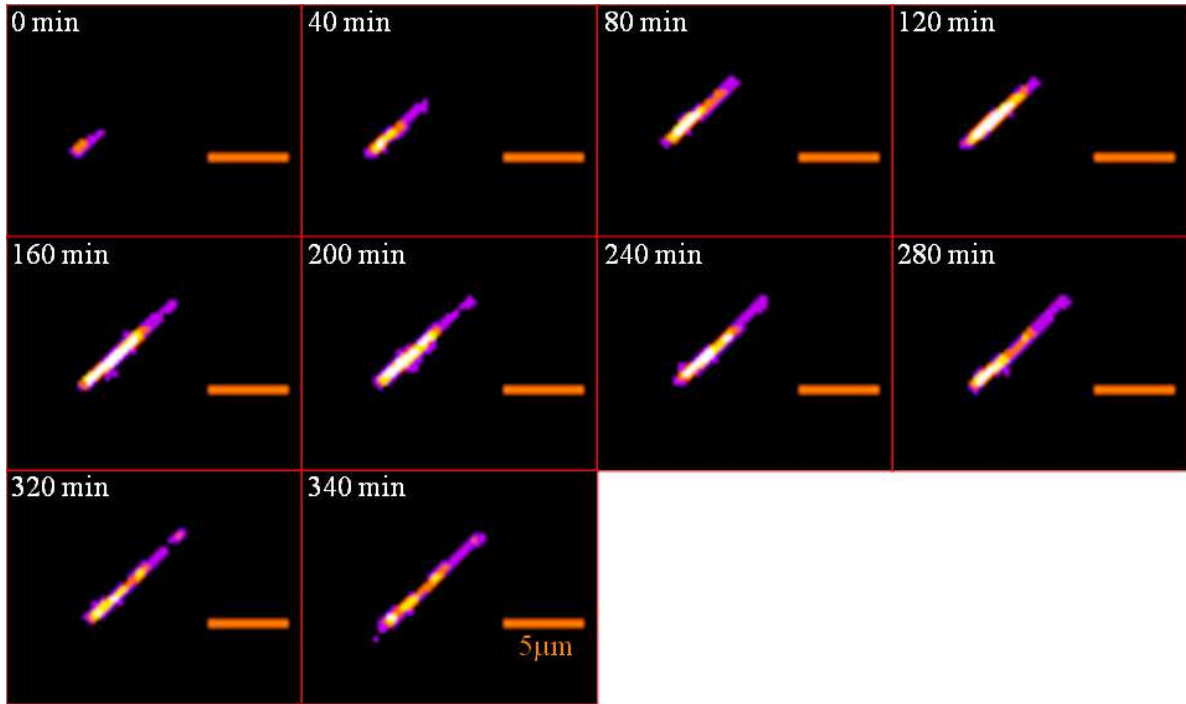


FIGURE III.7 – Croissance d'une fibrille isolée : *Imagée durant 5h. Le diamètre typique (induit à partir de mesures en TEM sur le même type d'échantillons) est de 80 à 100 nm et la longueur finale est de 8,7 µm. Champ de vue $17,6 \times 13,9 \mu\text{m}^2$.*

La croissance est plus facilement visible sur le diagramme cinétique correspondant (figure III.8.a), où les reconstructions de la fibrille aux différents temps sont recalées et alignées pour mettre en évidence son allongement. On voit que la longueur de la fibrille est bien résolue en microscopie SHG et croît significativement avec le temps pour atteindre une longueur finale de 8,7 µm après 340 minutes de fibrillogenèse. En revanche, le diamètre apparent de la fibrille est de 2 – 3 pixels, ce qui correspond à la résolution optique, et ne change pas significativement durant la fibrillogenèse. Cela indique que le diamètre de la fibrille est en-dessous de la résolution optique, en accord avec les mesures faites en TEM sur le même type d'échantillons, aux mêmes temps.

Tant le diamètre que la longueur de la fibrille correspondent bien aux données structurales des fibrilles de collagène rapportées dans la littérature [145, 147, 158]. De plus les premières fibrilles de collagène ont pu être détectées environ 20 à 30 minutes après la hausse du pH. Des observations en TEM sur le même type d'échantillon au même stade de fibrillogenèse montrent que les fibrilles ont un diamètre typique de 60 à 100 nm. La

III.1. Fibrillogenèse en milieu peu dense

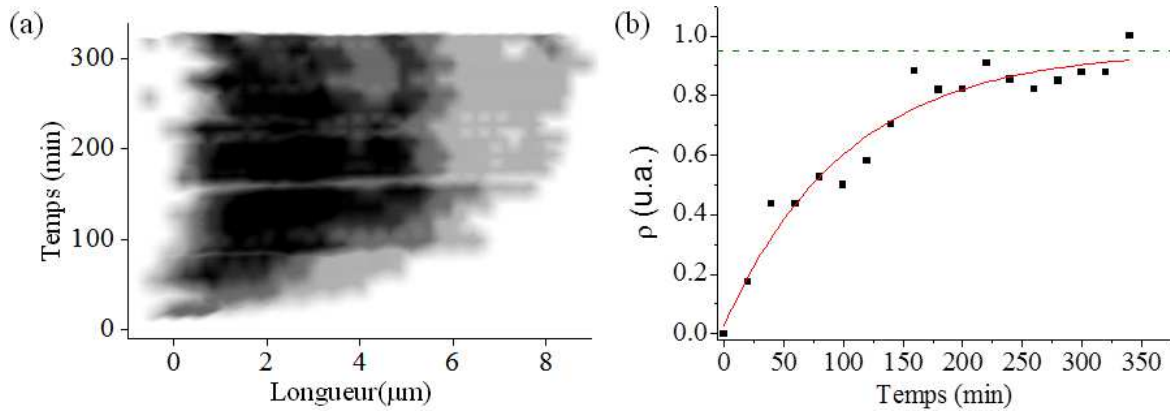


FIGURE III.8 – Cinétique de croissance d’une fibrille isolée : (a) *Diagramme cinétique* et (b) *Courbe de densité de pixels en fonction du temps (temps caractéristique $\tau = 103 \pm 18$ min).*

microscopie SHG est donc sensible à des structures bien plus petites que la résolution optique (≈ 360 nm dans notre cas).

La figure III.8.b montre quant à elle la cinétique de formation d’une fibrille isolée. Elle est mesurée comme précédemment en calculant la fraction de pixels, et non la longueur de la fibrille, pour permettre une comparaison immédiate avec la cinétique globale. Ces données montrent que la croissance de la fibrille est caractérisée par une constante de temps de 103 ± 18 minutes. Des valeurs similaires ont pu être mesurées pour d’autres fibrilles isolées. A noter que cette constante de temps est significativement plus faible que le temps caractéristique de croissance du réseau de collagène (405 ± 62 minutes). Ceci traduit le fait que la fibrillogenèse globale de l’échantillon est déterminée non seulement par l’allongement des fibrilles, mais aussi par l’apparition de nouvelles fibrilles.

III.1.4 Conclusion

Cette étude montre que la microscopie SHG permet d’imager et de caractériser la cinétique de fibrillogenèse du collagène de manière reproductible. Il faut noter que la microscopie optique offre différentes modalités intéressantes pour une étude dynamique à cette échelle. Une comparaison avec le confocal de réflectance à la même longueur d’onde d’excitation et la même puissance sous objectif montre une sensibilité similaire³. Cependant, la SHG présente une profondeur de pénétration accrue dans des échantillons diffusant qui pourrait permettre d’imager des stades avancés de fibrillogenèse dans des tissus épais. De surcroît, la microscopie SHG offre des informations supplémentaires sur l’organisation supra-moléculaire des fibrilles de collagène à l’intérieur du volume focal. En effet, comme expliqué précédemment (cf. II.2.2), la SHG sonde uniquement des structures denses et hautement organisées de collagène et le signal croît quadratiquement avec la densité de ces molécules alignées, alors que les signaux de confocal de réflectance croissent linéairement avec la densité de molécules de collagène et des autres entités, incluant les composantes cellulaires, quelle que soit leur organisation. La microscopie SHG permet

3. Les premières fibrilles sont détectables aux mêmes temps avec les deux techniques.

ainsi de s'assurer que les signaux observés révèlent bien des fibrilles de collagène structurées de manière analogue à celles observées *in vivo*. De plus, d'autres composantes telles que les cellules, pourraient être observées avec des techniques complémentaires comme la 2PEF, alors qu'elles ne donnent aucun signal SHG. Combiner la SHG et la 2PEF apparaît ainsi comme une technique prometteuse pour observer simultanément l'auto-assemblage du collagène et le comportement cellulaire d'échantillons biologiques. Il est important de noter que cela requiert d'augmenter la température à 37°C typiquement ce qui pourrait résulter en une diminution du diamètre des fibrilles à pH, concentration et force ionique identiques. Cependant ces paramètres peuvent être optimisés pour maintenir une bonne fibrillogenèse et conserver un signal SHG détectable [163, 165, 166].

Nos résultats montrent aussi que la SHG permet d'imager la formation d'une fibrille isolée dans un environnement 3D et posent la question des processus d'accrétion des triples hélices durant la fibrillogenèse. En effet, sur la figure III.7, la fibrille semble croître unidirectionnellement à partir d'une amorce (visible à $t = 0$). Cependant, comme la fibrille est en solution, la position de la fibrille change avec le temps et il est nécessaire de recalibrer les images pour obtenir la même ROI. Par conséquent il n'est pas possible de conclure par cette méthode. D'autres protocoles seront à envisager pour essayer d'aborder cette problématique. Une piste pourrait être l'usage de collagène fluorescent (par fusion à du FITC, *Sigma-Aldrich*) couplé à du collagène non modifié, ajouté après la hausse de pH, pour essayer de voir la direction de croissance à partir d'une amorce fluorescente. Enfin l'utilisation de SHG résolue en polarisation (P-SHG) devrait permettre d'obtenir des informations sur la structuration progressive des fibrilles de collagène et sur la rupture de la centrosymétrie.

III.2 Contrôle chimique de la fibrillogenèse

Au-delà de la caractérisation de la fibrillogenèse du collagène, nous avons étudié la possibilité de contrôler la formation des fibrilles de collagène, par l'intermédiaire de nanoparticules de silice, dans le but de former des biomatériaux hybrides, en solution, conservant les propriétés d'auto-assemblage et de reconnaissance spécifique du collagène fibrillaire. La problématique du projet est de déterminer si la fonctionnalisation⁴ de l'interface particules/polymères permet d'influer sur les propriétés du réseau, et, si tel est le cas, de déterminer quels paramètres peuvent favoriser la structuration du réseau.

Deux méthodes sont communément utilisées pour l'élaboration de matériaux bionanocomposites : la synthèse *in situ* à l'intérieur d'une matrice de polymères ou le mélange mécanique des deux composants [169]. Alternativement, la stratégie utilisée ici consiste à coupler une biomolécule (le collagène) à une nanoparticule inorganique (de silice) pour former des éléments hybrides appropriés [170]. La conjugaison peut être atteinte en utilisant des liaisons covalentes ou non au travers d'une modification de la chimie de surface des nanoparticules. En particulier, l'utilisation d'interactions électrostatiques et de liaisons hydrogène peut fournir une bonne modularité pour la fonctionnalisation des nanoparticules, notamment en terme de conformation et de mobilité des molécules. Cela requiert une compréhension et un contrôle très fin des interactions à l'interface entre le

4. Ajout d'une fonction chimique à un substrat, ici par une modification de la chimie de surface.

III.2. Contrôle chimique de la fibrillogenèse

nanomatériau et le système biologique [171]. Dans ce but, l'adsorption⁵ de protéines a récemment été étudiée en fonction de la composition des biomolécules, de la chimie des nanoparticules, de leur taille et de leur courbure de surface [172, 173].

Dans ce travail, nous utilisons un système hybride cœur-coquille synthétisé au LCMCP par adsorption d'un biopolymère (le collagène de type I) à la surface de nanoparticules de silice modifiées (figure III.9). Les études préliminaires [157] à l'échelle moléculaire ont clairement montré l'interaction préférentielle du collagène avec différentes chimies de surface. Désormais, il est nécessaire de comprendre l'impact de la fonctionnalisation de la surface de la NP sur les propriétés d'auto-assemblage du collagène et sur l'organisation supramoléculaire du réseau collagénique.

L'étude et la caractérisation d'un tel système requièrent une technique d'imagerie 3D permettant de sonder la dynamique de formation des fibrilles de collagène avec un grand champ de vue. En effet, si le TEM montre l'effet de la fonctionnalisation à l'échelle d'une nanoparticule (figure III.10), il ne permet pas d'avoir accès à une information cinématique globale sur la structuration du réseau de collagène. De ce point de vue, la microscopie MPM apparaît comme une alternative particulièrement intéressante, fournissant des informations complémentaires à celles obtenues en TEM, notamment la dynamique. De plus, cette technique nous apporte une indication cruciale sur la conservation des propriétés d'auto-assemblage du collagène, puisque seules les fibrilles hautement organisées seront visibles en SHG.

Dans un premier temps nous allons présenter la modification de chimie de surface développée par Carole Aimé (LCMCP), puis nous verrons l'imagerie de la fibrillogénèse en présence de nanoparticules fonctionnalisées. Enfin, nous verrons l'analyse d'image mise en place en collaboration avec Étienne Decencièrre et Vaia Machairas, du Centre de Morphologie Mathématiques (MINES ParisTech), dans le but de quantifier l'impact des nanoparticules sur la distribution du collagène dans le champ de vue, ainsi que l'organisation des fibrilles au voisinages des particules.

III.2.1 Fonctionnalisation des nanoparticules de silice

Dans le but d'utiliser les nanoparticules (NP) comme vecteur de structuration du réseau collagénique, nombre de paramètres doivent être pris en compte, tels que le ratio de taille entre le polymère et les particules, la nature et la force des interactions, la densité de sites de liaisons ou la stabilité colloïdale, pour conserver et contrôler les propriétés d'auto-assemblage du collagène. En effet, celles-ci sont très sensibles aux paramètres physico-chimiques tels que le pH, la force ionique ou la concentration (cf. III.1). En conséquence, on s'attend à ce qu'elles soient très aisément perturbées par les propriétés de surface des particules. En particulier, de petites particules (quelques dizaines de nanomètres) conduiront à un faible confinement protéique, en partie à cause de l'entrave stérique due à la courbure de la surface [173].

Partant de là, les nanoparticules de silice (NP-Si) sont synthétisées au LCMCP selon la méthode de Stöber [174] et présentent un diamètre moyen de 280 nm correspondant aux dimensions typiques de la triple hélice de collagène (300 nm × 1,5 nm) et aisément observables en microscopie électronique. Comme nous l'avons déjà vu, les molécules de

5. L'adsorption est un phénomène de fixation d'un atome provenant d'un gaz ou d'un liquide sur une surface solide via des interactions de Van Der Waals.

Chapitre III. Caractérisation et contrôle de la fibrillogenèse du collagène

collagène ont un point isoélectrique proche de 7,5 [167] et sont stables, en tant que triples hélices individuelles, en solution à pH 2,5 dans de l'acide acétique. Les particules de silice ayant, quant à elles, un point isoélectrique d'environ 3 portent, dans ces conditions, elles aussi une charge positive. Ainsi, à ces valeurs de pH il existe une répulsion électrostatique entre la silice et les triples hélices qui va à l'encontre de l'effet souhaité. Pour obtenir des interactions entre les NP et les triples hélices permettant de confiner le collagène à la surface [152], sans restreindre la mobilité moléculaire nécessaire à la fibrillogenèse, une modification de la surface est requise (figure III.9). C'est pourquoi les nanoparticules sont modifiées en surface avec une fonction acide ayant un pKa inférieur à 2,5 dans le but de modifier le point isoélectrique des nanoparticules. Ce critère est atteint avec l'alkyle d'acide sulfonique⁶ (pKa $\approx$ 1). La modification de la surface est ainsi réalisée par oxydation des groupements thiols introduits à la surface des NP [175, 176] pour donner des nanoparticules fonctionnalisées (NP-SiSO₃).

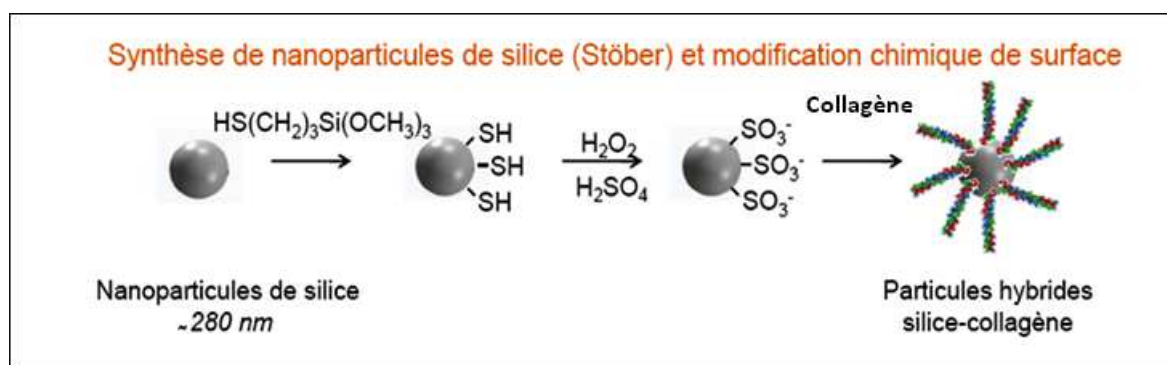


FIGURE III.9 – Fonctionnalisation des nanoparticules de silice.

Les NP-SiSO₃ ont d'abord été étudiées au LCMCP par titration calorimétrique isotherme (ITC), pour caractériser les propriétés thermodynamiques des nanoparticules et évaluer la force des interactions entre collagène et particules, en fonction de la chimie de surface [157], puis par diffusion dynamique de la lumière (DLS), par zétamétrie⁷ et finalement en microscopie électronique. Les NP-SiSO₃ présentant un potentiel de surface négatif, les triples hélices de collagène sont attirées à leur surface par des interactions électrostatiques et forment une couronne autour des NP, observable en TEM, qui n'est pas visible pour des NP-SiSO₃ en l'absence de collagène (figure III.10).

Ces images soutiennent l'idée d'un confinement des molécules de collagène à la surface des nanoparticules [173]. La mesure de l'épaisseur de cette couronne (environ 100 nm) montre qu'elle est bien corrélée à la longueur de persistance⁸ du monomère de collagène I mesurée dans des conditions de pH similaires (de 105 nm [159] à 160 nm [177]). Ainsi, on s'attend à ce que la formation du réseau se fasse via un mécanisme de surface dans lequel

6. HS(CH₂)₃Si(OCH₃)₃

7. Le potentiel ζ représente la charge électrique qu'une particule acquiert en solution grâce aux ions qui l'entourent. C'est notamment un bon indicateur des interactions entre particules et donc de la stabilité colloïdale de la suspension.

8. Chaque monomère ayant une certaine rigidité, leurs orientations ne sont indépendantes. La longueur de persistance est la distance à partir de laquelle un monomère a perdu la "mémoire" du monomère initial.

III.2. Contrôle chimique de la fibrillogenèse

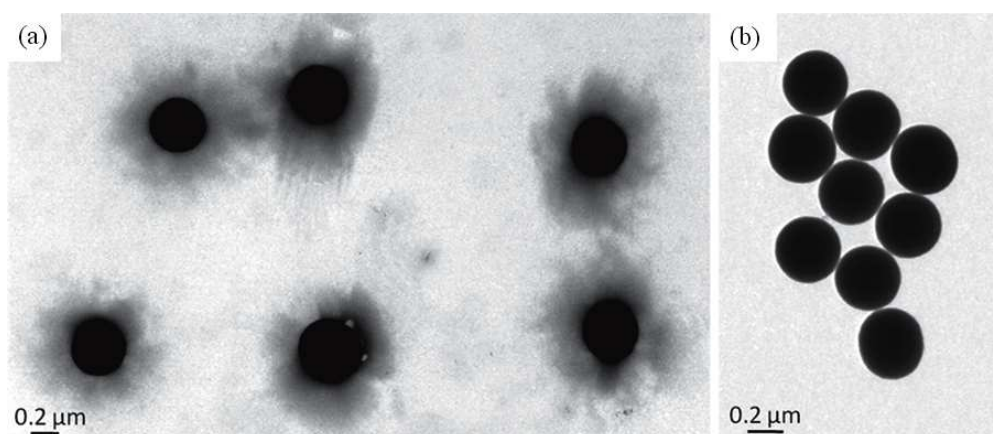


FIGURE III.10 – Confinement du collagène : (a) *Couronnes autour des NP-SiSO₃* et (b) *Couronne non-observable en l'absence de collagène* [source : Aimé et coll. [157]].

la pré-organisation des molécules au voisinage des nanoparticules favorise les processus de fibrillogenèse.

III.2.2 Modification de la fibrillogenèse et du réseau collagénique

Les triples hélices de collagène sont connues pour subir un auto-assemblage dans des conditions faiblement acides ou neutres pour former des fibrilles d'environ 100 nm de diamètre et jusqu'à plusieurs dizaines de micromètres de long [178]. Ces processus de fibrillogenèse requièrent une bonne mobilité des chaînes protéiques pour permettre un alignement des molécules le long de l'axe principal de la fibrille. Ainsi, on peut s'attendre à ce que le confinement du collagène à la surface des particules de silice modifie ses propriétés d'auto-assemblage (figure III.11). En particulier, l'augmentation locale de la concentration autour des nanoparticules pourrait changer la cinétique de fibrillogenèse.

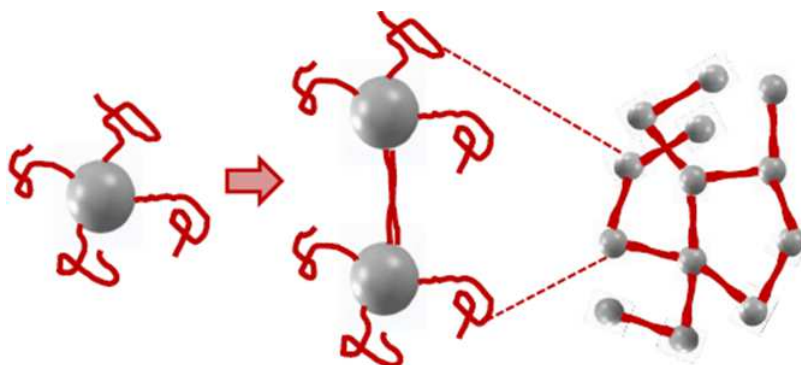


FIGURE III.11 – Schéma de pontage entre les nanoparticules : *Formation du réseau collagénique par l'entremise des nanoparticules de silice.*

Il est important de remarquer que pour exalter ce phénomène de confinement au voisinage des NP, l'auto-assemblage a été étudié en présence d'un excès de collagène

permettant de couvrir intégralement la surface des nanoparticules. Dans ces conditions, on s'attend à ce que le collagène en excès, restant libre dans la solution, prenne part au processus de fibrillogenèse.

Après avoir augmenté le pH par diffusion de vapeurs d'ammoniac [142], une suspension de structures hybrides NP-SiSO₃/collagène stable est obtenue. Les observations TEM révèlent la formation de larges fibrilles pouvant relier plusieurs nanoparticules et présentant la striation typique du collagène *in vivo*, qui reflète l'organisation longitudinale décalée des triples hélices (figure III.12).

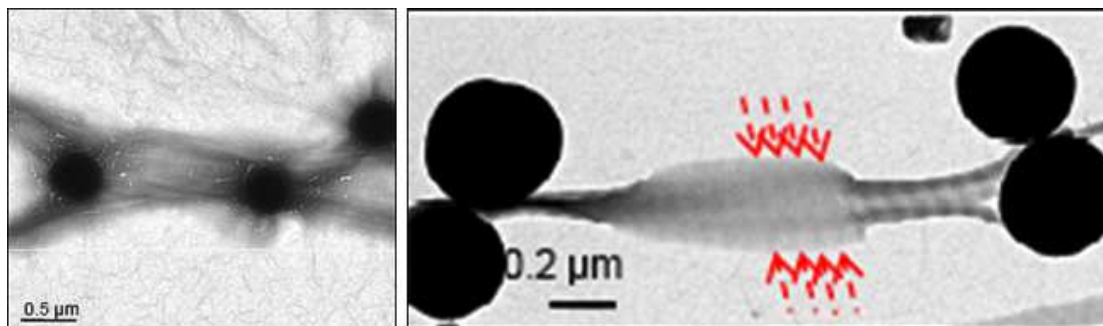


FIGURE III.12 – Pontage entre les nanoparticules : *Pont collagénique entre deux nanoparticules SiSO₃ (observé en TEM).*

Les contrôles ont été faits en remplaçant les NP-SiSO₃ par des nanoparticules non fonctionnalisées (NP-Si), pour lesquelles le collagène n'interagit pas spécifiquement avec la surface des particules. La fibrillogenèse se déroule alors indépendamment de tout effet de surface, comme en l'absence de nanoparticules, ce qui permet de contrôler l'impact de la fonctionnalisation sur la croissance des fibrilles de collagène à la surface des NP. Cependant, il est intéressant de remarquer qu'à pH 7, les NP-Si et NP-SiSO₃ présentent le même potentiel de surface ($\zeta \approx -27$ mV). Ces données suggèrent que la pré-organisation des triples hélices de collagène, initialement confinées à la surface des NP-SiSO₃ à pH acide, joue un rôle critique dans la modification de la fibrillogenèse. En particulier, la formation d'un réseau stable de nanoparticules de silice, reliées par des fibrilles de collagène, indique que la surface des particules agit comme un point de nucléation pour la croissance des fibrilles [179]. Cela démontre que la formation de réseaux hybrides silice/collagène préserve la structure et les propriétés d'auto-assemblage des fibrilles de collagène [157]. Finalement, il est possible d'observer 3 effets principaux en présence de nanoparticules fonctionnalisées :

- une augmentation locale de la densité de collagène autour des NP (pouvant conduire à une modification de la cinétique)
- la formation d'un réseau de collagène où les fibrilles forment des ponts entre les nanoparticules
- une colocalisation entre les nanoparticules et les nœuds du réseau collagénique.

La microscopie électronique offrant un champ de vue limité, particulièrement restrictif pour étudier la colocalisation NP/collagène, nous avons ensuite étudié ces effets avec notre technique d'imagerie optique, permettant, en outre, d'obtenir une information dynamique sur la densité de collagène autour des NP et la formation des fibrilles au voisinage des nanoparticules.

III.2. Contrôle chimique de la fibrillogenèse

III.2.3 Imagerie de la fibrillogenèse

En premier lieu, dans le but de comparer les réseaux collagéniques formés en présence de nanoparticules fonctionnalisées ou non, un fluorophore est incorporé au cours de leur synthèse pour permettre leur visualisation (en 2PEF). Deux critères principaux ont guidés le choix du fluorophore :

- il doit être bien excité à la longueur d’onde utilisée (860 nm), celle-ci étant imposée par l’efficacité de génération de seconde harmonique [163]
- il doit présenter un décalage de Stokes important afin de pouvoir séparer la 2PEF et la SHG lors de la collecte des signaux.

Nous avons travaillé avec de l’Alexa 488 (*Molecular Probes, Invitrogen*), répondant à ces deux contraintes et connu pour présenter une dynamique de photoblanchiment lente. L’imagerie du réseau silice/collagène est alors faite en microscopie multiphoton (figure III.13) en utilisant exactement les mêmes paramètres expérimentaux que précédemment (cf. III.1.1.2). La 2PEF (en rouge) et la SHG (en vert) sont utilisées simultanément pour acquérir les images des particules et du collagène respectivement.

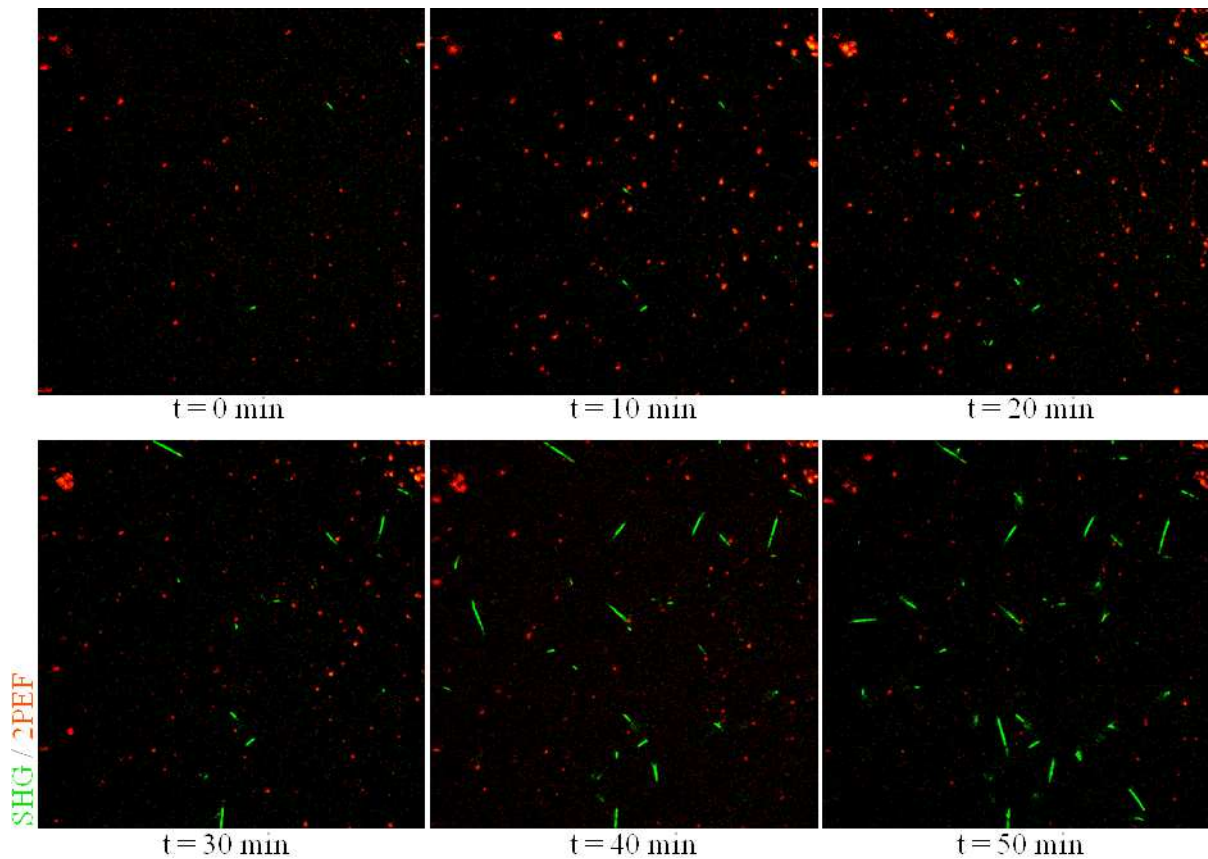


FIGURE III.13 – Fibrillogenèse en présence de nanoparticules : Image d’un échantillon de NP-SiSO₃ colorées à l’Alexa 488 et de collagène à différents temps de fibrillogenèse (sans aucun traitement). Champ de vue 144×144×30 μm³ avec une taille voxel de 0,27 × 0,27 × 0,5 μm³.

Chapitre III. Caractérisation et contrôle de la fibrillogenèse du collagène

Les images sont faites en scannant l'échantillon avec un pas en z de $0,5 \mu m$ sur une profondeur de $30 \mu m$. L'usage d'ammoniac étant fortement déconseillé pour les objectifs de microscope, dans notre cas, la fibrillogenèse est induite par ajout de NaOH dans la solution. Chaque échantillon est imagé toutes les 20 min (durant 1 à 2 heures) ce qui permet de suivre son évolution temporelle lors de la fibrillogenèse.

Les données sont acquises sur 10 échantillons différents : 5 à partir de nanoparticules fonctionnalisées (NP-SiSO₃) et 5 avec des particules non fonctionnalisées (NP-Si) servant de contrôles. Dans la suite nous allons nous focaliser principalement sur deux aspects :

1. l'évolution temporelle de l'échantillon
2. l'influence de la fonctionnalisation au travers des différences entre particules Si et SiSO₃.

III.2.4 Traitements d'images préliminaires en 2D

Dans un premier temps, pour estimer l'effet de la fonctionnalisation des NP sur le réseau collagénique, nous avons développé une approche simple consistant à mesurer la densité de collagène au voisinage des nanoparticules sur les images 2D de la pile (plan par plan). Pour ce faire, les images SHG sont filtrées avec un filtre médian (2 pixels de rayon) pour limiter l'impact du bruit de fond. Cependant, sur les images de fluorescence excitée à 2 photons, la principale source de bruit est la réflexion du laser sur la lamelle du bas qui apparaît non négligeable lorsque l'on s'approche du bas de l'échantillon (figure III.14 - coupe 61).

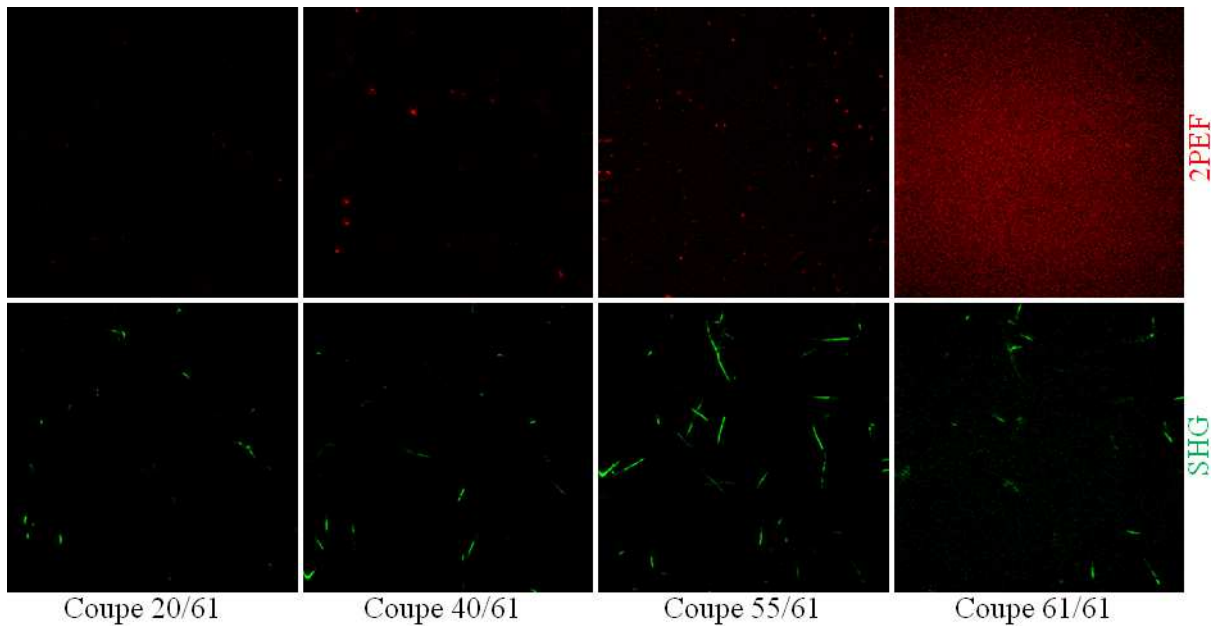


FIGURE III.14 – Échantillon silice/collagène à différentes profondeurs :
Images d'un échantillon de NP-SiSO₃ colorées à l'Alexa 488. Champ de vue : $144 \times 144 \times 30 \mu m^3$, avec une taille voxel de $0,27 \times 0,27 \times 0,5 \mu m^3$.

III.2. Contrôle chimique de la fibrillogenèse

Pour limiter l'impact de ce bruit de fond, les images sont seuillées⁹ en ne conservant que les valeurs supérieures à 2 photons par pixel. Ce seuillage "brutal" a pour conséquence une mauvaise détection des NP les moins intenses ou les plus photo-blanches, ce qui doit être pris en compte pour l'interprétation des résultats et restreint fortement la reproductibilité de cette analyse. Il convient donc de rester prudent quant à l'interprétation de ces résultats. L'image est ensuite filtrée comme précédemment (filtre médian de 2 pixels de rayon) et finalement, les NP ayant une taille minimale de 2 voxels sur les images, les objets les plus petits sont éliminés en appliquant un seuil sur leur aire. Cela permet d'éliminer au mieux le bruit de fond et notamment celui de la lamelle du bas mais élimine aussi les plus petites NP de silice.

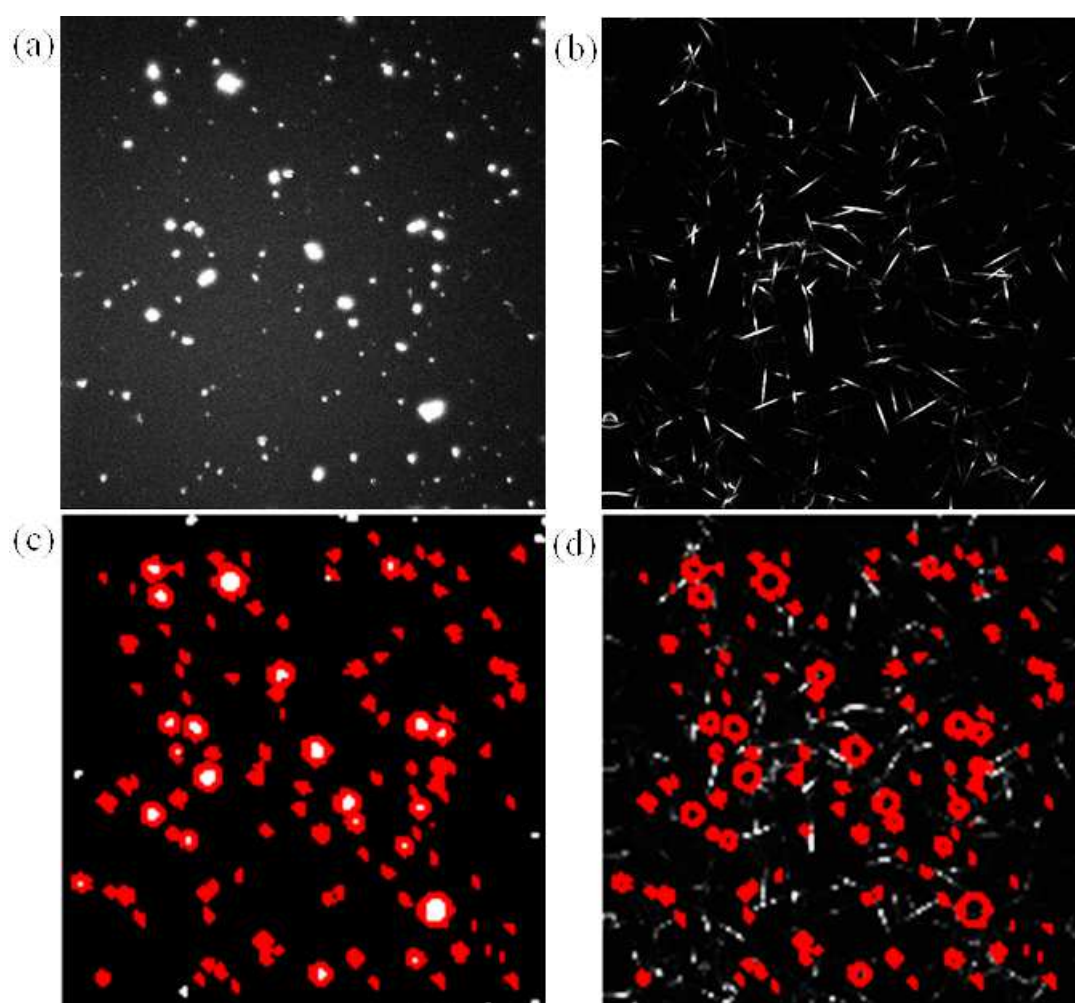


FIGURE III.15 – Analyse préliminaire : Traitement en 2D. (a) et (b) Image brute des nanoparticules (NP-SiSO₃) colorées à l'Alexa 488 (2PEF) et du collagène (SHG) respectivement. (c) NP segmentée et (d) Colocalisation entre le collagène et les NP.

9. Le seuillage est la méthode de segmentation la plus simple et la plus rapide. Elle consiste à tester, pour chaque pixel de l'image, si la valeur est supérieure ou inférieure à un certain seuil, et produit une image binaire regroupant les résultats. Ici, les niveaux de gris strictement inférieurs à 2 sont mis à 0.

Chapitre III. Caractérisation et contrôle de la fibrillogenèse du collagène

Sur les images 2PEF (figure III.15.a), on détecte alors les objets connexes et notamment leur centre de gravité et leur rayon équivalent¹⁰, ce qui permet de définir un disque équivalent pour chaque NP (figure III.15.c). On définit ensuite une couronne $\mathcal{C}$ de t pixels d'épaisseur autour de chaque NP. A ce stade, on élimine les objets trop proches du bord de l'image pour lesquelles l'ensemble de la couronne n'est pas dans le champ de vue.

Finalement, pour chaque nanoparticule, on calcule, sur les images SHG (figure III.15.d), la densité intégrée (ρ_n) dans la couronne $\mathcal{C}_n$ autour de la $n^{\text{ième}}$ NP :

$$\rho_n = \frac{\sum_{i \in \mathcal{C}_n} w_{n,i}}{\sum_{j \in \text{Image}} w_j} \quad (\text{III.3})$$

où $w_{n,i}$ désigne la valeur du $i^{\text{ième}}$ pixel appartenant à cette couronne. Cette valeur est normalisée par la densité intégrée sur l'ensemble de l'image pour obtenir la fraction de collagène autour des NP par rapport à la quantité globale de collagène dans le champ de vue.

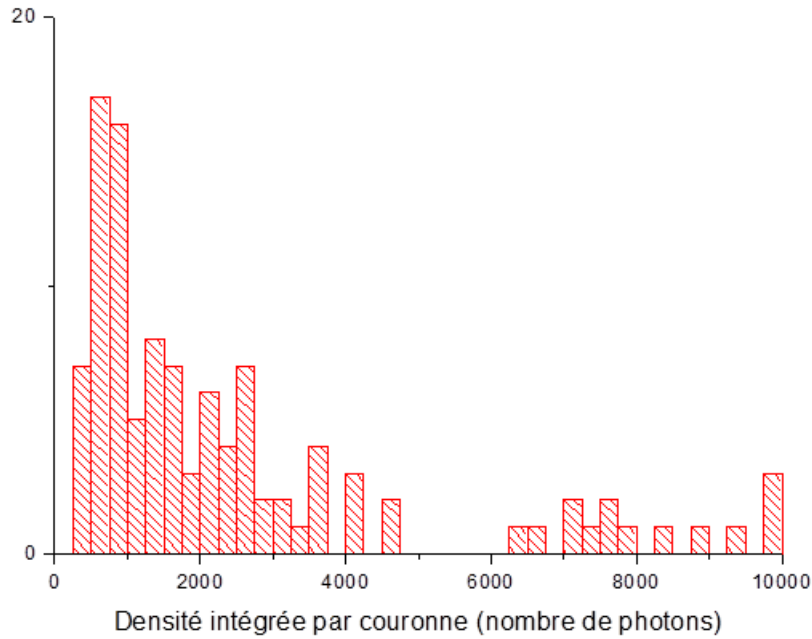


FIGURE III.16 – Histogramme préliminaire : *Histogramme des densités intégrées dans chaque couronne sur un échantillon NP-SiSO₃/collagène obtenu par une analyse 2D.*

L'histogramme des densités intégrées (figure III.16) montre que très peu de nanoparticules n'ont pas de collagène dans leur couronne. Pour comparer quantitativement les échantillons NP-SiSO₃ et NP-Si, on peut calculer la densité intégrée (en 2D) au voisinage de l'ensemble des NP, définie comme la somme des densités dans chaque couronne :

$$\rho = \sum_n \rho_n \quad (\text{III.4})$$

10. Rayon du cercle d'aire équivalente à celle de l'objet détecté.

III.2. Contrôle chimique de la fibrillogenèse

Ceci permet de calculer la fraction de collagène située au voisinage de l'ensemble des NP dans l'image.

	ρ (%)
Si	1 ± 1
SiSO ₃	18 ± 3

TABLE III.3 – Densité au voisinage des nanoparticules : *Pour deux échantillons, NP-Si et NP-SiSO₃.*

On voit alors que (table III.3), dans le cas fonctionnalisé, 18% du collagène se situe au voisinage d'une NP de silice contre environ 1% pour les NP-Si.

Cette première approche en 2D, bien que réductrice, montre bien que la chimie de surface des NP a un impact sur le réseau de collagène après la fibrillogenèse. Cette méthode d'analyse présente cependant plusieurs limitations. Les étapes de filtrage et de seuillage grossier des images peuvent éliminer un nombre important de NP, et par conséquent fausser l'analyse. De plus chaque couronne étant définie individuellement, deux NP particules "trop" proches peuvent avoir des couronnes qui se recouvrent. Ainsi il est possible d'associer une même fibrille de collagène à plusieurs nanoparticules. Toutefois, la limitation principale de cette approche réside dans le fait qu'elle ne tient pas compte de la géométrie intrinsèquement 3D de l'échantillon, en solution, et qu'elle est donc très dépendante de l'échantillonnage, notamment axial, des piles d'images.

III.2.5 Traitements avancés des images

Pour permettre une étude plus avancée et plus reproductible, notamment une quantification de la répartition du collagène moins sujette aux fluctuations d'échantillonnage et tenant compte de la géométrie intrinsèquement volumique de l'échantillon, nous avons travaillé en collaboration avec le Centre de Morphologie Mathématiques (CMM, MINES ParisTech) de Fontainebleau, pour mettre en place un traitement 3D pertinent des piles d'images. Celui-ci se fait en plusieurs étapes :

1. détection des NP en segmentant les images 2PEF
2. définition de la fonction distance
3. calcul de la densité de photons au voisinage des NP
4. calcul de la portée d'influence des NP
5. étude de la structuration des fibrilles autour des NP.

Ce travail a constitué le stage de Master de Vaia Machairas sous la direction d'Étienne Decencièrre, les choix méthodologiques étant effectué suite à des discussions précises sur l'origine du bruit et du signal sur les images SHG et 2PEF. Nous avons ensuite effectué une analyse statistique des résultats obtenus par cette méthode.

III.2.5.1 Segmentation des nanoparticules de silice

La première étape consiste à segmenter¹¹ les NP dans l'ensemble des images 2PEF pour définir leur surface. Pour cela, les images 2PEF sont à nouveau filtrées avec un filtre médian pour éliminer le bruit de fond poivre et sel. On applique ensuite un seuillage par hystérésis (figure III.17) permettant de reconstruire les contours des NP tout en évitant d'exalter des zones de bruit.

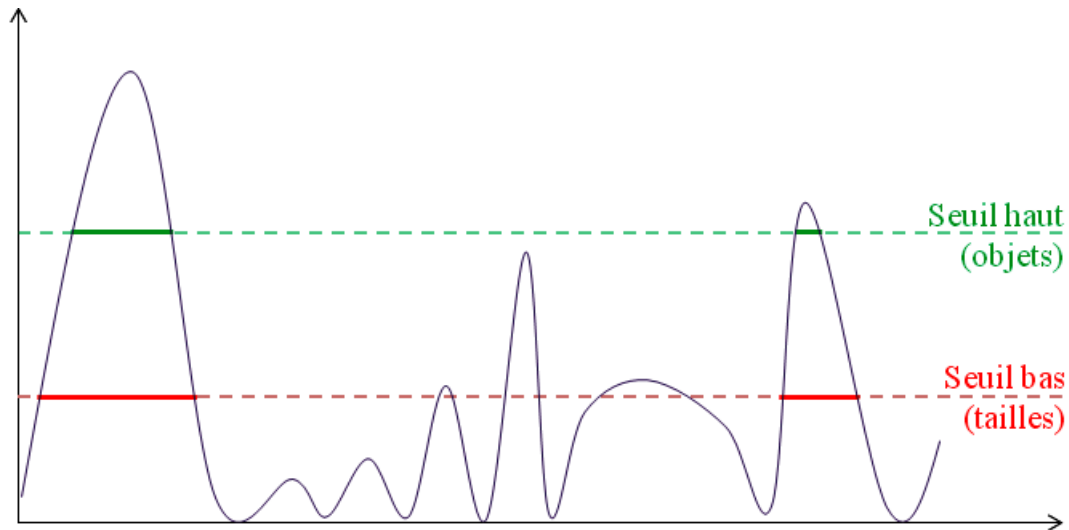


FIGURE III.17 – Seuillage par hystérésis : *On applique deux seuils (haut et bas) successivement. Le premier seuil (haut) est le plus restrictif et permet de s'affranchir du bruit mais rogne sensiblement les bords des objets conservés. Le second seuil (bas) permet quant à lui de bien reconstruire la forme des objets conservés par le premier filtre.*

Cet algorithme repose sur l'utilisation de deux seuils : un seuil "haut" et un seuil "bas". On sélectionne d'abord l'ensemble des pixels au-dessus du seuil haut, puis ceux au-dessus du seuil bas. On ne garde ensuite que les composantes connexes du seuil bas qui contiennent au moins un pixel au-dessus du seuil haut. Cette détection permet d'éliminer les plus petits objets issus du filtrage, provenant du bruit de fond, et de bien reconstruire la taille des NP simultanément.

Les nanoparticules, ayant un diamètre de 300 nm, ne sont pas résolues optiquement, particulièrement dans la direction axiale, c'est pourquoi leur taille effective sur les images correspond au volume focal. Au vu des résolutions latérale (364 nm) et axiale (1,1 µm), ainsi que de la taille pixel (0,27 µm) et du pas d'échantillonnage (0,5 µm), chaque NP recouvre au minimum deux voxels, ce qui nous permet d'appliquer une ouverture circulaire (cf. annexe D) ayant pour effet de lisser l'image en éliminant les objets trop petits, résultant du bruit (figure III.18).

11. On appelle segmentation d'une image l'opération consistant à séparer, suivant des critères prédéfinis, une image en un ensemble de régions disjointes deux à deux, et dont l'union recouvre l'image d'origine. Les pixels sont ainsi regroupés en domaines constituant un pavage ou une partition de l'image. Par exemple, dans notre cas, il s'agit de segmenter l'image en deux classes, on parle aussi de binarisation, pour séparer les objets du fond.

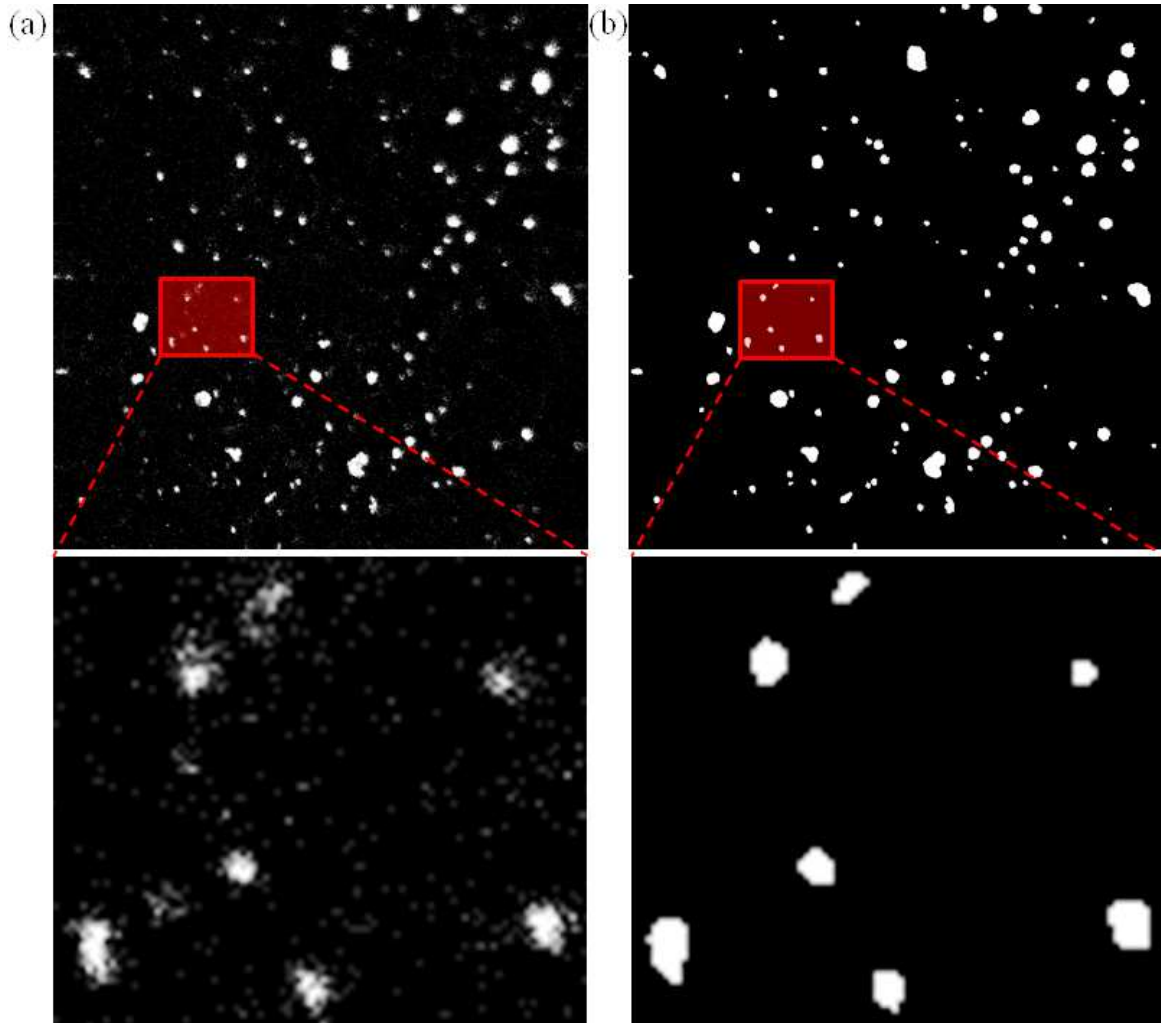


FIGURE III.18 – Segmentation des nanoparticules de silice : (a) Image 2PEF brute (coloration à l’Alexa 488) et (b) Image des NP après seuillage par hystérésis et ouverture circulaire.

III.2.5.2 Fonction distance

On définit ensuite, à partir des images 2PEF segmentées, une fonction de distance selon la méthode suivante. L’image est partitionnée en classes de distance (CD) regroupant l’ensemble des pixels situés dans un intervalle fixé à partir de la surface de la NP la plus proche (figure III.19.b). Ainsi la $i^{\text{ème}}$ classe de distance (CD_i) englobe les pixels situés entre $(i-1)$ et i microns de la surface de la NP la plus proche. A noter que les CD sont définies à partir de la distance (en μm) à la surface des NP et non du nombre de pixels, pour s’affranchir des différences entre les échantillonnages axial et latéral (figure III.19.a).

Pour éviter les effets singuliers aux bords de l’image, à chaque incrémentation de la classe de distance, on rogne tous les pixels à la même distance i du bord de l’image. En effet, en imaginant une NP située juste en dehors du champ de vue de l’image, toutes les fibrilles au voisinage de celle-ci seraient associées, à tort, à une classe de distance élevée d’une autre NP dans le champ de vue (figure III.20.a).

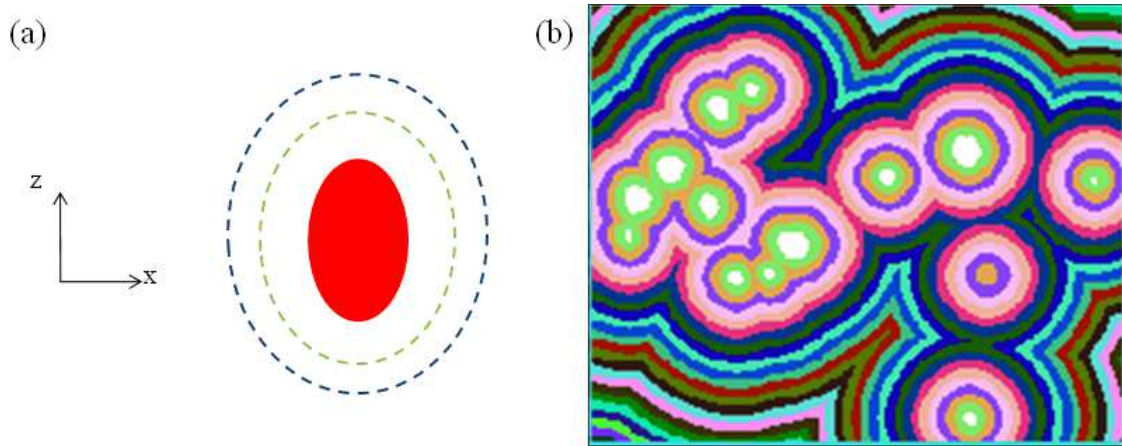


FIGURE III.19 – Fonction distance 3D : (a) *Ellipticité apparente des NP due à la différence de pas d'échantillonnage entre les directions latérale et axiale* et (b) *Fonction de distance dans le plan (Oxy). Chaque couleur correspond à une classe de distance contenant l'ensemble des pixels situés dans un intervalle de distance fixe de la surface de la NP la plus proche.*

De plus, il faut garder à l'esprit que l'interprétation des données des CD élevées est délicate. En effet, celles-ci peuvent être en partie rognées par les bords de l'image (figure III.20.b), ce qui résulte en une densité de photons calculée sur un faible nombre de pixels. En conséquence, ces classes de distance sont extrêmement sensibles au bruit.

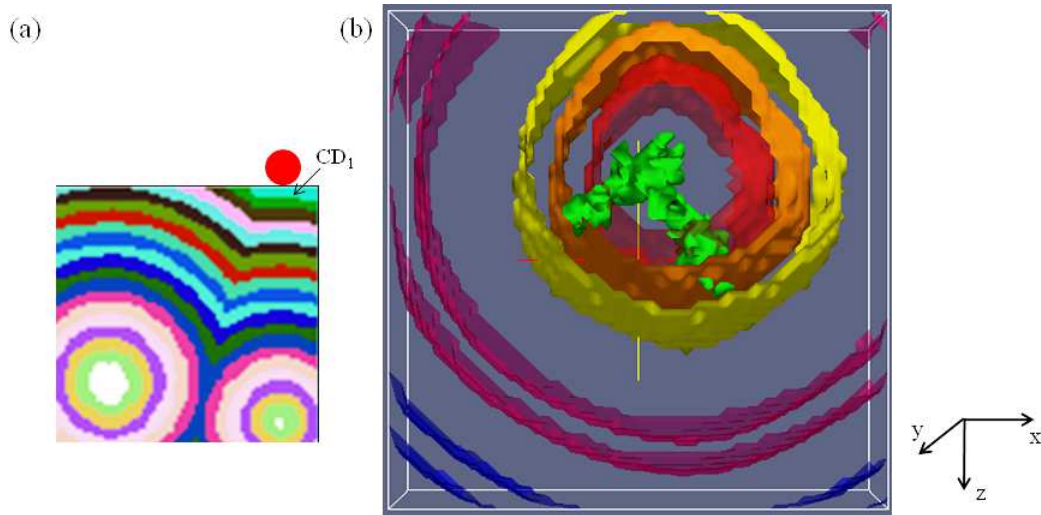


FIGURE III.20 – Classe de distance en 3D : (a) *Rognage itératif des bords de l'image pour éviter de mal attribuer les classes de distance en bord d'image* et (b) *Évaluation des classes de distance (en 3D) et effets de bords. Illustration en 2D des calculs réalisés en 3D.*

III.2. Contrôle chimique de la fibrillogenèse

III.2.5.3 Densité de photons autour des nanoparticules

Finalement, pour chaque CD on mesure sur les images SHG, non-segmentées, la densité intégrée de signal correspondant à la densité volumique de photons dans chaque classe de distance. En première approximation, cette densité de photons reflète le carré de la densité de molécules de collagène situées dans un intervalle de distance fixe des nanoparticules de silice.

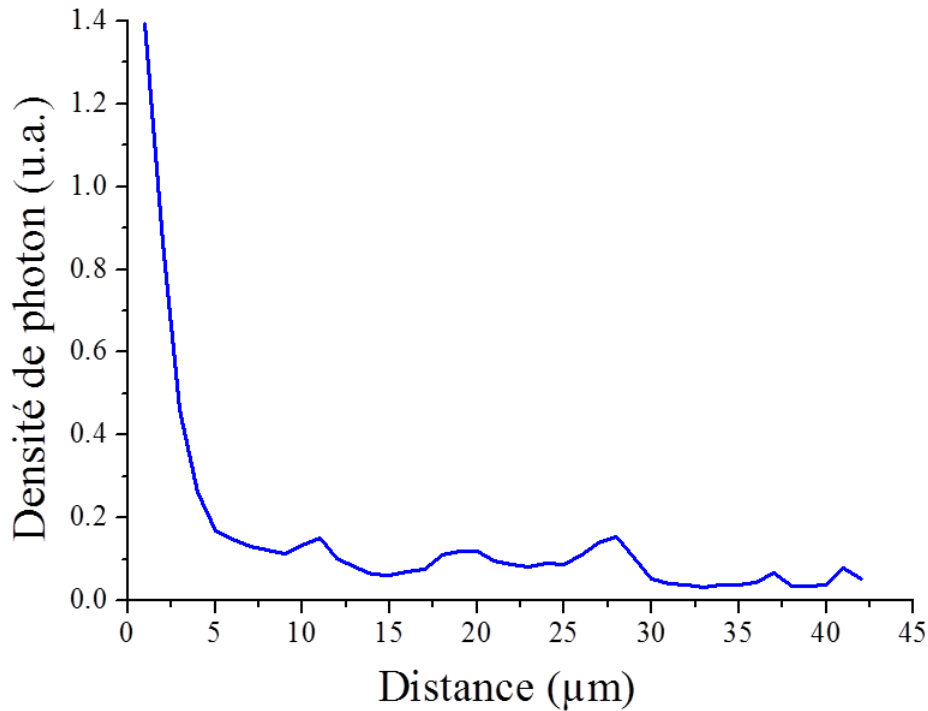


FIGURE III.21 – Densité de photons : *Évolution en fonction de la classe de distance.*

Comme on peut le voir sur la figure III.21, des pics non-significatifs peuvent apparaître dans les classes de distance élevées. Ceux-ci sont dus au bruit de fond sur les images SHG qui peut devenir important dans les classes de distance élevées à cause du faible nombre de pixels dans celles-ci. Ces pics sont très sensibles à la taille de la ROI choisie ainsi qu'au filtrage des images 2PEF.

Pour valider l'analyse des images effectuée, il est intéressant d'étudier l'influence d'un traitement (seuillage et/ou filtrage) des images SHG sur les courbes de densité (figure III.22). On voit qu'un traitement de l'image SHG lisse légèrement les pics résiduels en bout de courbe sans changer significativement la distribution de densité. Dans le cas d'un seuillage ou d'un filtrage médian 2D, on observe une légère translation des courbes vers le bas, due à l'élimination du bruit de fond. Cependant, ces traitements ne semblent pas modifier significativement le pic à zéro qui nous intéresse. Par contre, en utilisant un filtrage médian 3D le débruitage semble trop "sévère" et modifie significativement les courbes de densité et notamment la valeur du pic à distance nulle. Ainsi, grâce au bon S/N, il est préférable de ne pas appliquer de pré-traitement aux images SHG afin de modifier le moins possible les images et, de ce fait, diminuer l'incertitude des résultats

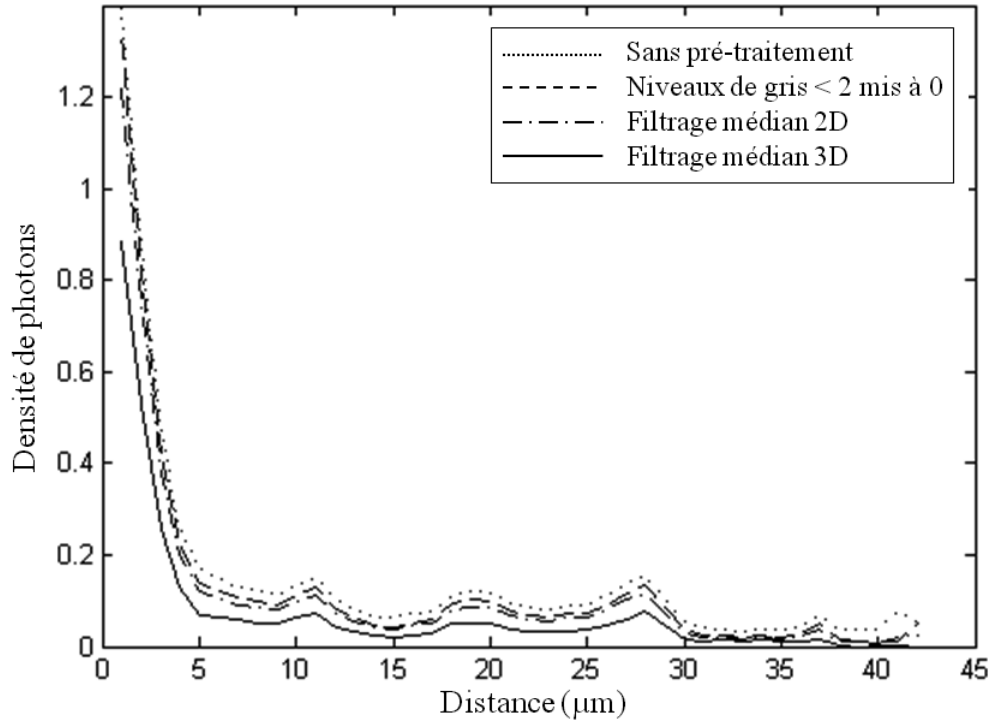


FIGURE III.22 – Influence du traitement des images SHG : *Suivant la méthode choisie les pics dans les hautes CD sont plus ou moins aplanis sans changer significativement la distribution globale et notamment la forme et la valeur du pic à 0.*

et augmenter leur reproductibilité.

III.2.6 Résultats

III.2.6.1 Densité de collagène

On peut maintenant comparer les courbes de densité entre des échantillons NP-Si et NP-SiSO₃. La figure III.23, qui présente les courbes de densité pour deux échantillons typiques, dénote plusieurs effets. Tout d'abord à $t = 0$ la courbe verte, représentant les NP-Si utilisées comme contrôle, apparaît relativement constante ce qui indique qu'à ce stade, la répartition du collagène est indépendante de la surface des NP non fonctionnalisées. A ce même temps, la courbe rouge, représentant les NP-SiSO₃, présente quant à elle un pic à zéro, confirmant le confinement du collagène à la surface des NP, que l'on peut directement attribuer à la fonctionnalisation des NP. A noter que cela montre une excellente sensibilité de la microscopie SHG. En effet, à $t = 0$ il n'y a pas encore de fibrilles dans l'échantillon mais uniquement des groupes de triples hélices localement alignées autour des NP. Le signal mesuré dans le pic proche des NP est donc similaire à celui provenant de cristaux liquides cholestériques de collagène où la SHG révèle aussi une forte densité de triples hélices alignées, sans formation de fibrilles [23].

Il est par ailleurs substantiel que la densité de photons mesurée sur l'échantillon NP-SiSO₃ (en rouge) est nettement supérieure à celle obtenue avec les NP-Si (en vert) révélant

III.2. Contrôle chimique de la fibrillogénèse

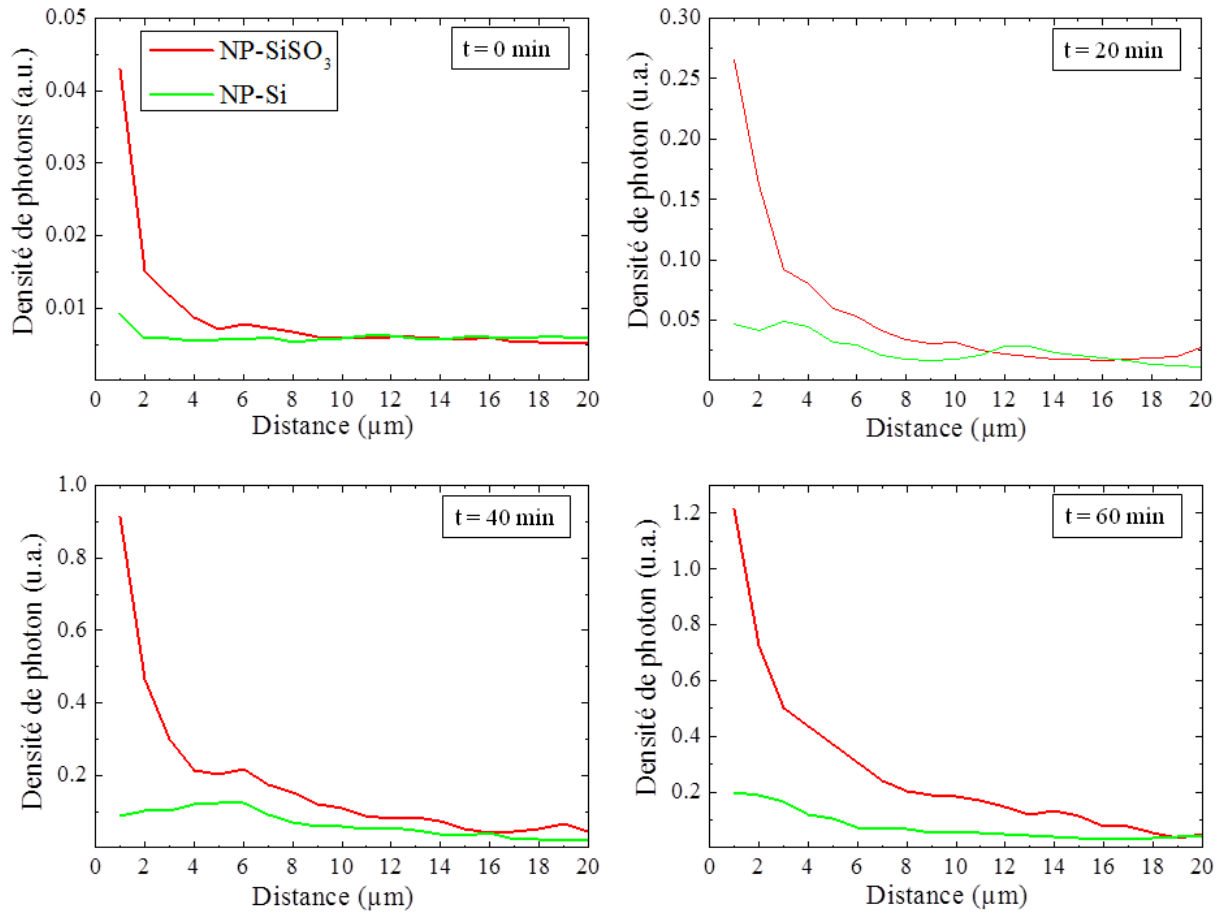


FIGURE III.23 – Impact de la fonctionnalisation sur la densité de collagène : Comparaison des courbes de densité à 4 temps (0, 10, 20 et 30 min) pour un échantillon Si (en vert) et SiSO₃ (en rouge).

une plus forte densité de collagène aligné dans l'échantillon fonctionnalisé. En pratique, cet effet est systématique durant la première heure de fibrillogénèse. A noter qu'à la fin de la fibrillogénèse on n'observe pas de différence significative de densité entre NP-Si et NP-SiSO₃. Ceci peut s'expliquer par le fait que, localement (autour des NP fonctionnalisées), la densité de collagène est plus élevée ce qui tend à accélérer la cinétique de fibrillogénèse. De plus la densité de photons mesurée dans le cas NP-Si (courbe verte) présente, elle aussi, après 1 heure de fibrillogénèse, un petit pic à distance nulle. Cela est probablement dû au fait qu'à pH = 6,5 (lorsque la fibrillogénèse est induite), le collagène porte une très légère charge positive, alors que les NP (fonctionnalisées ou non) sont chargées négativement ($\zeta \approx -27$ mV) [157]. Ainsi, la portion de collagène qui n'est pas encore fibrillée est attirée par les NP, faisant apparaître un petit effet de confinement révélé par ce pic initial. L'effet de la fonctionnalisation apparaît donc particulièrement accentué à $t = 0$. Toutefois, aux différents stades de fibrillogénèse on peut voir que loin des NP (≥ 10 μm), il y a localement plus de collagène dans le cas NP-Si que NP-SiSO₃ (figure III.23). Cela s'explique par le fait qu'en présence de NP-Si la fibrillogénèse continue normalement loin des nanoparticules alors que dans le cas NP-SiSO₃ le collagène étant pré-confiné (à pH

6,5) au voisinage des NP, la concentration en collagène est faible loin des nanoparticules.

La densité absolue de collagène pouvant varier drastiquement d'un échantillon à l'autre, en fonction de la cinétique ou d'éventuels écarts de concentration, il est plus pertinent de s'intéresser à la répartition de collagène fibrillé. La figure III.24 présente cette répartition aux différents temps pour l'ensemble des échantillons étudiés.

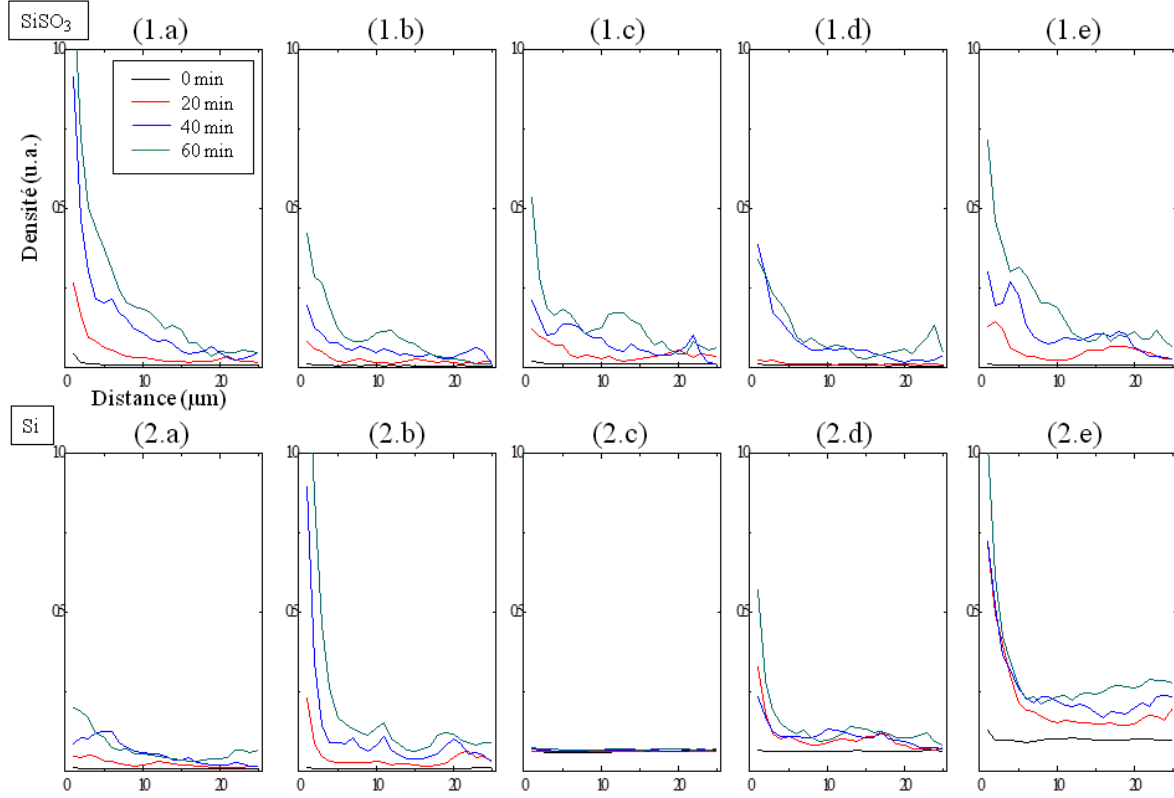


FIGURE III.24 – Statistique de densité : (1.a–e) 5 échantillons fonctionnalisés NP-SiSO₃ et (2.a–e) 5 échantillons contrôles NP-Si à 4 temps (0, 20, 40 et 60 minutes).

On observe alors, dans le cas SiSO₃, un comportement relativement reproductible avec un pic initial bien marqué et une densité de collagène qui augmente graduellement avec le temps. Au contraire, dans le cas des NP-Si, les résultats sont plus irréguliers et on remarque des comportements singuliers sans pic à 0 (figure III.24.c) ou alors une croissance erratique du réseau avec des "croisements" des courbes (figure III.24.a et d) traduisant une diminution locale de la densité de collagène, probablement due à des mouvements libres dans l'échantillon. Ceci montre que, dans le cas NP-Si, le réseau collagénique n'est pas stabilisé par les effets de surface ce qui conduit à des résultats moins reproductibles. De plus, en considérant le comportement asymptotique, on peut constater que si pour les NP-SiSO₃ la densité semble relativement faible au-delà de 15 μm , dans le cas NP-Si elle n'est pas négligeable loin des NP. Cela va dans le sens d'un contrôle de la fibrillogenèse par les NP fonctionnalisées qui impose un comportement reproductible à la croissance du réseau.

III.2. Contrôle chimique de la fibrillogenèse

III.2.6.2 Portée d'influence des nanoparticules

Pour quantifier objectivement cette répartition on peut aussi s'intéresser à la portée de l'influence des NP. En considérant la distribution de densité du collagène en fonction de la distance aux NP, on peut définir une portée d'interaction comme étant la distance (d) scindant cette distribution en deux parts égales. Autrement dit, la portée d'influence des NP est définie comme la distance pour laquelle la somme des densités collagéniques dans les classes de distance inférieures à d est égale à la moitié de la densité totale.

$$\sum_{i=0}^d \rho(i) = \frac{1}{2} \sum_{i=0}^{d_{max}} \rho(i) \quad (\text{III.5})$$

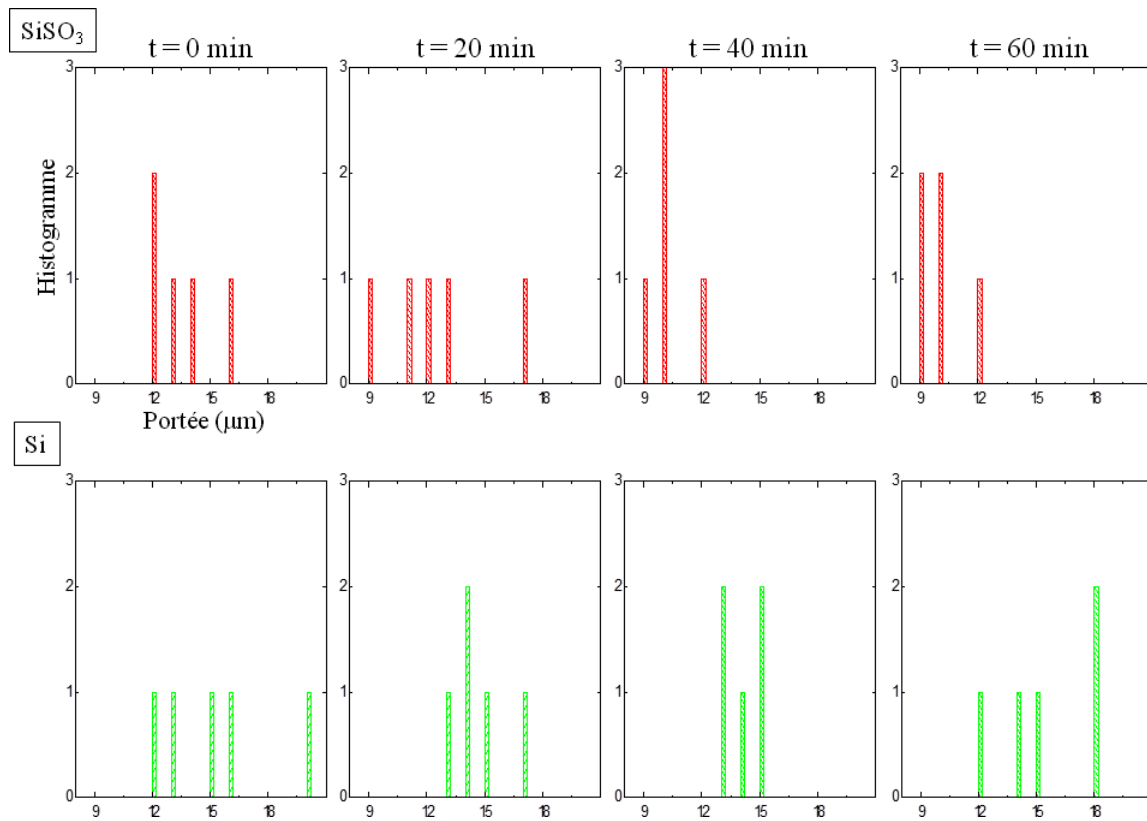


FIGURE III.25 – Portée d'influence des nanoparticules : *A $t = 0, 20, 40$ et 60 minutes, dans les cas fonctionnalisées (rouge) ou non (vert). A chaque temps les histogrammes SiSO_3 et Si résument les portées obtenues sur l'ensemble des échantillons.*

La figure III.25 représente les histogrammes de portée, à chaque temps, pour l'ensemble des échantillons, fonctionnalisés ou non. On observe que si les portées n'apparaissent pas significativement différentes aux temps courts, elles semblent diminuer sensiblement après 40 minutes de fibrillogenèse dans le cas NP- SiSO_3 . En effet en calculant la portée moyenne pour chaque temps, on voit qu'elle est toujours plus faible dans le cas SiSO_3 (table III.4).

	$t_1 = 0 \text{ min}$	$t_2 = 20 \text{ min}$	$t_3 = 40 \text{ min}$	$t_4 = 60 \text{ min}$
SiSO_3	13 ± 2	12 ± 3	10 ± 1	10 ± 1
Si	15 ± 3	15 ± 2	14 ± 1	15 ± 3

TABLE III.4 – Portées d’interaction moyennes : *Pour des temps courts, la portée d’interaction entre les nanoparticules et le collagène ne présente pas de différences significatives entre les deux cas. En revanche après 40 minutes, on observe une portée d’influence significativement plus faible dans le cas SiSO_3 .*

De plus, la statistique indique que dans le cas NP-Si la portée reste relativement constante, alors qu’elle décroît avec le temps dans le cas NP- SiSO_3 (figure III.26).

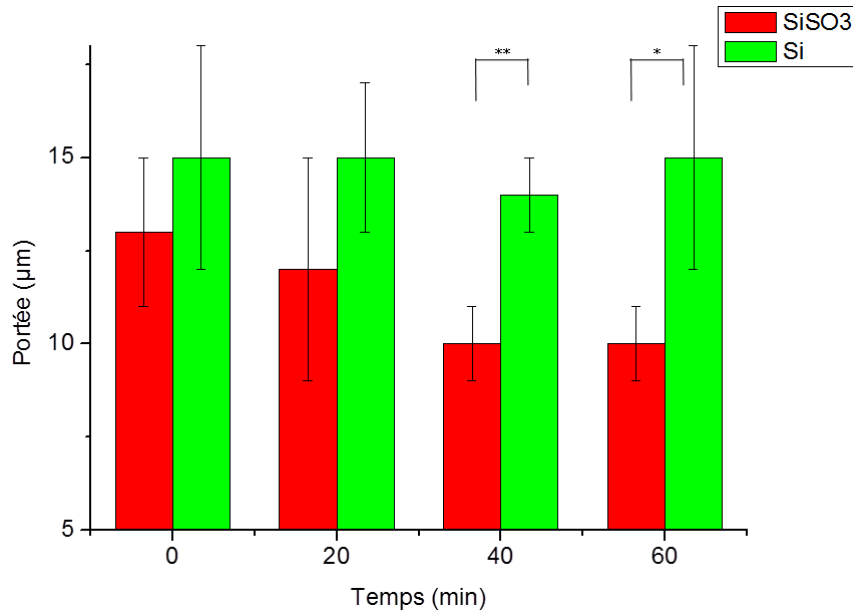


FIGURE III.26 – Portée d’interaction moyenne : *Evolution en fonction du temps (0, 20, 40 et 60 minutes) pour les NP- SiSO_3 (en rouge) et les NP-Si (en vert). Les étoiles indiquent des différences significatives (* : $p\text{-value} \leq 1\%$; ** : $p\text{-value} \leq 0,1\%$).*

Initialement, à $t = 0 \text{ min}$, il n’y a pratiquement pas de collagène fibrillé. Ainsi la portée, calculée sur la courbe de densité de photon, est une mesure de la répartition du bruit expérimental (les images SHG n’étant pas filtrées). Celui-ci étant homogène la portée correspond à la moitié de la distance moyenne entre deux NP. C’est pourquoi à ce stade les portées sont identiques, que les nanoparticules soient fonctionnalisées ou non, les densités étant, à ce stade, trop faible pour dénoter une variation. Le fait que, dans le cas NP-Si, la portée reste constante avec la fibrillogénèse indique que les fibrilles apparaissent aléatoirement dans le champ de vue, conduisant à une distribution relativement uniforme du collagène et donc une densité de photon constante dans toutes les classes de distance. Au contraire, dans le cas NP- SiSO_3 , la diminution de la portée montre que, les fibrilles se forment préférentiellement au voisinage des NP, où les triples hélices sont initialement

III.2. Contrôle chimique de la fibrillogenèse

confinées. Ainsi le pré-confinement du collagène a une incidence sur l'ensemble de la fibrillogenèse et non pas seulement aux temps courts. Ce résultat confirme bien l'effet de confinement du collagène à la surface des nanoparticules fonctionnalisées. En outre le fait que les résultats soient plus reproductible dans le cas NP-SiSO₃ (déviations standards plus faibles) va, là encore, dans le sens d'une stabilisation du réseau collagénique par l'intermédiaires des NP.

III.2.6.3 Structuration autour des nanoparticules de silice

En améliorant la méthode de segmentation des NP, présentée précédemment, afin de les individualiser, il est possible de développer un algorithme de comptage automatique du nombre de fibrilles autour d'une nanoparticule de silice dans une image 3D. Ce comptage est délicat et a fait l'objet du projet de recherche¹² de Vaia Machairas au CMM. En effet, il y a un certain nombre de "pièges" à éviter pour permettre une analyse pertinente, en définissant correctement les nanoparticules et surtout en partitionnant correctement les classes de distances pour associer chaque fibrille à la "bonne" nanoparticule. En particulier on ne travaille pas sur la première classe de distance (CD₁) pour s'affranchir de l'éventuel signal SHG à la surface des NP ne provenant pas du collagène et pouvant fausser l'analyse. En étudiant la seconde classe de distance (CD₂), on peut compter le nombre d'objets présents dans cette classe de distance et analyser la répartition des fibrilles à la surface de la nanoparticule (figure III.27).

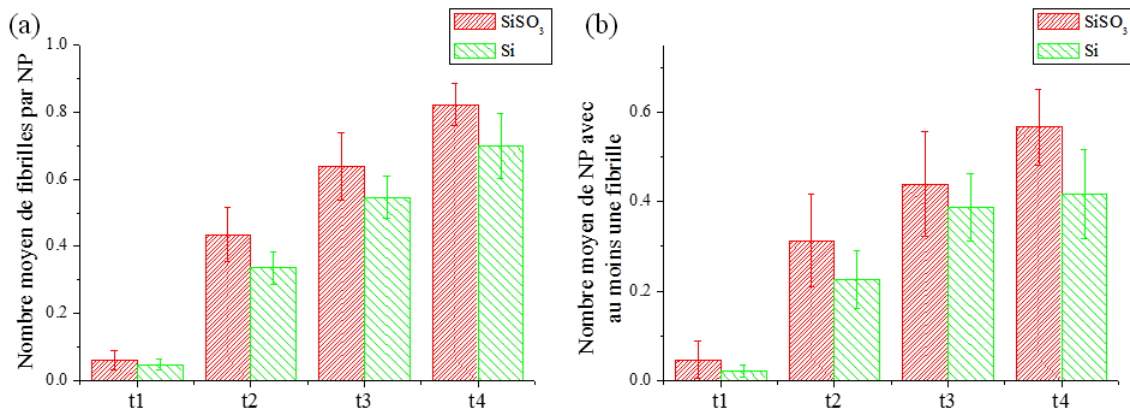


FIGURE III.27 – Structuration autour des nanoparticules : (a) Nombre moyen de fibrilles dans la CD₂ d'une nanoparticule et (b) Nombre moyen de nanoparticules ayant au moins une fibrilles dans sa CD₂, pour l'ensemble des échantillons NP-SiSO₃ (en rouge) et NP-Si (en vert), à chaque temps (0, 20, 40 et 60 minutes).

On observe deux types d'effets :

- *Évolution temporelle* : au début de la fibrillogenèse, la plupart des nanoparticules ne portent aucune fibrille puisque le collagène est majoritairement sous forme de triples hélices. Ensuite, alors que le collagène s'auto-assemble, la distribution de fibrilles autour des NP s'étend vers des valeurs plus grandes.

12. Dans le cadre de sa dernière année à l'IOGS.

- *Influence de la fonctionnalisation* : il apparaît que le nombre moyen de fibrilles par particule, ainsi que le nombre moyen de particules ayant au moins une fibrille attachée, sont systématiquement supérieurs dans le cas NP-SiSO₃ que dans le cas NP-Si. Toutefois, le fait que les deux populations ne soient pas statistiquement différentes, bien que la portée d'interaction des NP soit significativement plus faible dans le cas fonctionnalisé, semble indiquer soit que les fibrilles sont plus grosses dans le cas NP-SiSO₃, soit qu'elles sont mieux structurées. Ce résultat reste cependant à confirmer par des mesures en microscopie électronique.

Cette méthode d'estimation, appliquée à différents échantillons, à différents temps de fibrillogenèse, permet donc d'étudier l'impact de la fonctionnalisation sur l'auto-assemblage des triples hélices de collagène à l'échelle des nanoparticules de silice. Cette technique d'analyse ouvre de nombreuses perspectives. Par exemple, l'étude de classes de distances plus élevées (CD₃, CD₄...) pourrait donner des indications sur l'évolution spatiale de ces résultats et ainsi permettre de remonter à la longueur des fibrilles en contact avec une NP. L'observation du point de contact pourrait, quant à elle, fournir des indications sur la répartition angulaire des fibrilles autour des particules. Enfin, une analyse de la colocalisation entre les NP et les nœuds du réseau collagénique pourrait permettre d'étudier plus avant l'intérêt de la fonctionnalisation de surface pour former des points de nucléations des fibrilles.

III.3 Conclusion et perspectives

Les travaux présentés dans ce chapitre nous ont permis d'étudier l'influence de la fonctionnalisation des NP sur la structuration du réseau collagénique. Nous avons montré que la microscopie SHG combinée à une analyse d'image avancée permet d'observer les mécanismes moléculaires d'assemblage du collagène dans un environnement 3D. Ceci est un pré-requis pour comprendre les processus biologiques impliqués dans la formation de fibrilles de collagène, voire étudier la formation de biomatériaux à partir de matrices collagéniques. A cet égard, la microscopie SHG apparaît comme une technique clé pour la caractérisation et la validation de matériaux bio-mimétiques tels que ceux en développement au LCMCP [180].

L'association contrôlée de molécules biologiques avec des nanomatériaux est une approche prometteuse pour intégrer leurs capacités d'auto-organisation et transférer leurs spécificités dans un système chimique hybride. Dans ce but, nous avons décrit et caractérisé une nouvelle approche basée sur les interactions bio-minérales et impliquant des groupes fonctionnels à la surface des nanoparticules SiSO₃. La configuration proposée au LCMCP pour l'organisation du collagène implique une importante flexibilité de la chaîne protéique permettant de maximiser les interactions collagène/sulfonate. La formation d'un réseau de nanoparticules de silice liées aux fibrilles de collagène a pu être mise en évidence aux échelles micro- et macroscopique, mettant en exergue les processus d'organisation en surface des NP où les groupements sulfonates favorisent le confinement des triples hélices. Les expériences effectuées dans le cadre de ce projet montrent que la fonctionnalisation de l'interface particule/polymère permet un meilleur contrôle de la fibrillogenèse et de la structuration du réseau collagénique. L'extension à une large variété de particules inorganiques possédant des propriétés optiques ou magnétiques spé-

III.3. Conclusion et perspectives

cifiques et/ou à d'autres systèmes biomacromoléculaires auto-assemblés tels que d'autres protéines ou des polysaccharides peut alors être envisagée, à condition que les conditions optimales de fabrication des systèmes hybrides soient identifiées.

Cependant, puisque l'ensemble des images présentées dans ce chapitre montrent des fibrilles de diamètre inférieur à la résolution optique, cette étude pose la question de la sensibilité de la microscopie SHG. En effet, il est pour l'instant impossible de savoir à quel stade de fibrillogénèse les fibrilles de collagène deviennent observables ou, ce qui est équivalent, le diamètre minimal des fibrilles détectables sur notre microscope. De plus, si cette étude permet d'observer la structuration globale du réseau de collagène il semble intéressant de compléter ces informations en étudiant, simultanément, sur les mêmes échantillons, le diamètre des fibrilles de collagène formées en présence de NP-Si et de NP-SiSO₃. Ceci requiert de s'affranchir du TEM et d'exploiter directement l'intensité générée par une fibrille pour obtenir son diamètre. Pour ce faire, il est nécessaire de calibrer, au préalable, les signaux SHG sur un ensemble de fibrilles de diamètres variables en corrélant la microscopie SHG à une technique plus résolutive (TEM, AFM...). Une telle calibration renforcerait significativement le potentiel de la SHG pour l'étude d'échantillon collagénique en en faisant une technique d'imagerie 3D, non invasive, sensible à la fois aux échelles microscopique et sub-microscopique. Ceci sera le but du prochain chapitre.

Les devises Shadoks



AVEC UN ESCALIER PRÉVU
POUR LA MONTÉE ON RÉUSSIT
SOUVENT À MONTER PLUS BAS
QU'ON NE SERAIT DESCENDU AVEC UN
ESCALIER PRÉVU POUR LA DESCENTE.

Chapitre IV

Mesure quantitative du signal de génération de seconde harmonique

*Appuyez-vous sur les principes,
ils finiront bien par céder*
- Oscar Wilde

Sommaire

IV.1 Calibration des signaux SHG : approches théoriques, analytiques et numériques	102
IV.1.1 Approche analytique	103
IV.1.2 Simulations numériques	109
IV.2 Mesures expérimentales	111
IV.2.1 Microscopie correlative SHG/TEM	111
IV.2.2 Résultats	115
IV.3 Discussion	118
IV.3.1 Mesure <i>Top-Down</i> de l'hyperpolarisabilité d'une triple hélice de collagène	119
IV.3.2 Comparaison aux mesures en HRS selon une approche <i>Bottom-Up</i>	120
IV.4 Conclusion et perspectives	122

Des changements dans la structure des fibrilles de collagène (diamètre, densité, organisation...) sont associés à de nombreuses pathologies des tissus conjonctifs ainsi qu'à des perturbations de leur processus de développement, de remodelage, de réparation, de vieillissement... C'est pourquoi la calibration des signaux SHG en terme de densité locale de molécules représente un enjeu majeur dans le domaine du diagnostic biomédical. Malgré l'éventail de développements récents en microscopie SHG, celle-ci demeure une technique semi-quantitative en ce sens qu'elle révèle la présence et l'organisation des harmonophores, mais ne donne pas accès à leur densité. Pour pallier cette limitation on se propose ici de calibrer l'intensité des signaux SHG en fonction du nombre d'harmonophores et donc de la taille des fibrilles de collagène. Cette calibration se heurte à deux limitations principales : la possibilité de disposer d'un panel de fibrilles isolées de tailles

variées et la nécessité de déterminer précisément leur diamètre (en-dessous de la résolution optique). Pour ce faire il est indispensable de corréler l'imagerie SHG à une technique plus résolutive telle que la microscopie électronique. Durant les dernières décennies, de nombreuses études ont été menées pour dépasser la limite de résolution imposée par la diffraction en corrélant la microscopie optique à des techniques telles que l'AFM [58] ou le TEM [181]. Cependant, cela n'avait jamais été fait avec la microscopie SHG.

Dans ce travail, nous avons réalisé de l'imagerie corrélative TEM/SHG sur des fibrilles de collagène isolées afin de calibrer l'intensité SHG détectée, en fonction du diamètre des fibrilles, en comparant des approches théoriques, numériques et expérimentales. Cette étude nous aura permis d'obtenir la première mesure de la sensibilité de notre microscope SHG et représente une première étape cruciale en vue de calibrer intégralement les signaux provenant de tissus.

IV.1 Calibration des signaux SHG : approches théoriques, analytiques et numériques

Comme nous l'avons vu au chapitre II, l'intensité SHG dépend directement du nombre de molécules non-linéaires (N) et de l'intensité excitatrice (I_{las}) selon :

$$I_{SHG} \propto |\beta|^2 N^2 I_{las}^2 \quad (IV.1)$$

Ainsi en mesurant l'intensité générée par une fibrille isolée, et en connaissant l'hyperpolarisabilité du collagène, on peut théoriquement en déduire le nombre d'harmonophores dans le volume focal. Partant de là, et dans le but de calibrer la réponse SHG, notre objectif est de déterminer la relation entre deux quantités directement mesurables expérimentalement : le nombre de photons générés (N_{SHG}) et le diamètre (d) de la fibrille isolée imagée.

Cependant, si le formalisme de la réponse SHG à partir des réponses individuelles des molécules non-linéaires, présentes dans le volume focal, permet de bien comprendre l'origine et les propriétés des signaux, celui-ci comporte plusieurs limitations :

- il est restreint au cas de milieux optiquement minces, ou d'ondes planes dans des milieux non dispersifs (cf. II.2.1.6)
- il ne permet pas de décrire les effets de phase qui deviennent critiques lorsque l'on utilise un faisceau focalisé (phase de Gouy)
- il ne permet pas un calcul analytique de l'intensité émise.

Dans le cas plus réaliste, en MPM, d'un régime très focalisé, il est nécessaire de prendre en compte le couplage entre les ondes fondamentale et harmonique au travers d'une équation de propagation [88] incluant les variations de phase dans le volume focal. En pratique, dans le cas de fibrilles fines les deux approches donnent le même résultat, mais dès que les fibrilles atteignent une taille comparable au volume focal on peut s'attendre à ce que les deux modèles diffèrent sensiblement.

Au vu du montage expérimental utilisé (cf. IV.2) on peut modéliser le système par la géométrie suivante (figure IV.1). L'échantillon se situe dans le plan (Oxy) dans une fine couche d'air ($\approx 5 \mu m$) entre deux lamelles de microscope et le laser se propage selon l'axe z. On s'intéresse à l'onde de seconde harmonique générée par une fibrille de diamètre d ,

IV.1. Calibration des signaux SHG : approches théoriques, analytiques et numériques

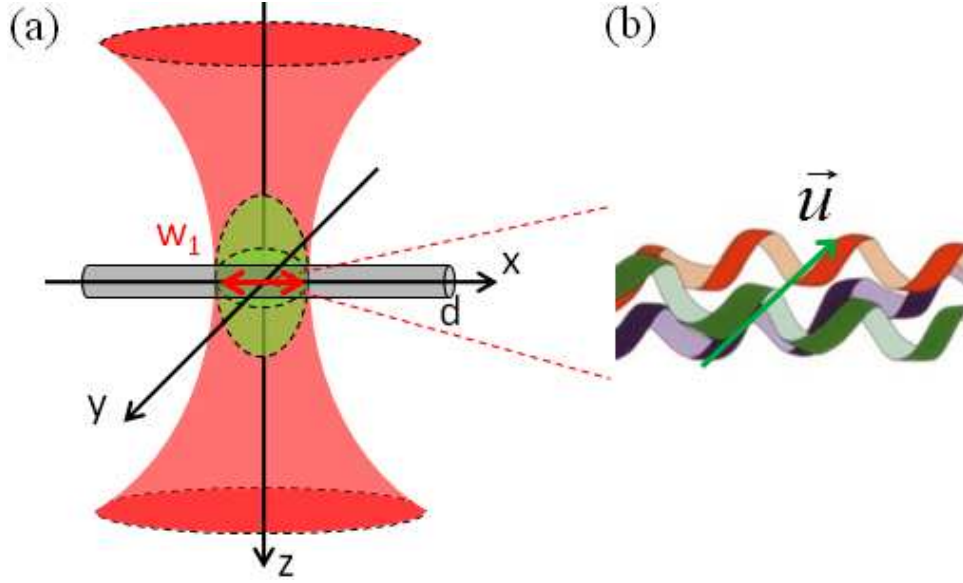


FIGURE IV.1 – Géométrie du système : (a) *Fibrille de collagène dans le volume focal avec le repère choisi et* (b) *Triple hélice de collagène et orientation de son hyperpolarisabilité β_{uuu} .*

placée dans le plan focal, selon l'axe (Ox), soumise à un champ électrique incident :

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, \omega) = \mathbf{A}(\mathbf{r}, \omega) e^{i(\mathbf{k} \cdot \mathbf{r} - \omega t)} + cc \quad (\text{IV.2})$$

Dans toute la suite de ce chapitre les index 1 (respectivement 2) sont utilisés pour désigner les grandeurs ayant trait au laser incident (respectivement à la SHG). Nous allons ici présenter l'approche analytique permettant d'exprimer l'intensité SHG en fonction du diamètre de la fibrille observée, ainsi que les différentes approximations nécessaires. Nous verrons ensuite comment des simulations numériques permettent de s'affranchir de ces limitations.

IV.1.1 Approche analytique

IV.1.1.1 Équation de propagation

Le lien entre la réponse non-linéaire du milieu et les signaux créés est donné par la polarisation non-linéaire et peut être formalisé en écrivant les équations de propagation gouvernant les différents processus non-linéaires d'ordre n (cf. annexe E). Dans le cas de la génération de seconde harmonique (ordre 2) l'équation de propagation s'écrit :

$$\nabla^2 \mathbf{E}_2(\mathbf{r}, 2\omega) - k^2 \mathbf{E}_2(\mathbf{r}, 2\omega) = \frac{(2\omega)^2}{\varepsilon_0 c^2} \mathbf{P}^{(2)}(\mathbf{r}, 2\omega) \quad (\text{IV.3})$$

Au travers de cette équation la polarisation non-linéaire d'ordre 2 apparaît comme un terme source du processus SHG. On pose alors :

$$\mathbf{P}^{(2)}(\mathbf{r}, 2\omega) = \mathbf{p}_2(\mathbf{r}) e^{i(k_2 z - \omega_2 t)} + cc \quad (\text{IV.4})$$

Chapitre IV. Mesure quantitative du signal de génération de seconde harmonique

En injectant la forme du champ électrique choisie (eq. IV.2) et en introduisant le Laplacien transverse en coordonnées cylindriques :

$$\nabla_T^2 = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial}{\partial r} \right) + \left(\frac{1}{r} \right)^2 \frac{\partial^2}{\partial \varphi^2} \quad (\text{IV.5})$$

on obtient l'équation de propagation paraxiale :

$$2ik_2 \frac{\partial \mathbf{A}_2}{\partial z} + \nabla_T^2 \mathbf{A}_2 = -\frac{\omega_2^2}{\varepsilon_0 c^2} \mathbf{p}_2 e^{i\Delta k z} \quad (\text{IV.6})$$

où $\Delta k = k_2 - 2k$ est le terme d'accord de phase. Cette équation découle de la négligence du terme en $\partial^2 \mathbf{A}_2 / \partial z^2$ dans le cas d'un faisceau se propageant selon l'axe z ¹. Enfin, en exprimant l'amplitude complexe p_2 de la polarisation non-linéaire d'ordre 2 en fonction du celle du champ incident :

$$p_2 = \varepsilon_0 \chi^{(2)} A_1^2 \quad (\text{IV.7})$$

et en se plaçant dans l'approximation scalaire (on projette selon l'axe z), on obtient :

$$2ik_2 \frac{\partial A_2}{\partial z} + \nabla_T^2 A_2 = -\frac{\omega_2^2}{c^2} \chi^{(2)} A_1^2 e^{i\Delta k z} \quad (\text{IV.8})$$

IV.1.1.2 Faisceau gaussien

Partant d'un faisceau gaussien (figure IV.2), on va résoudre l'équation IV.8, selon l'approche de Boyd [88], en recherchant des solutions présentant une distribution transverse d'intensité gaussienne quel que soit z , du type :

$$A(r, z) = \mathcal{A} \frac{w_0}{w(z)} e^{-\frac{r^2}{w(z)^2}} e^{\frac{ikr^2}{2R(z)}} e^{i\Phi(z)} \quad (\text{IV.9})$$

qui donne la solution de l'équation paraxiale dans le cas d'une propagation libre (*i.e.* les p_n sont nulles). Ici, w_0 est le *waist* du laser, et on a posé :

- $w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{\lambda z}{\pi w_0^2} \right)^2}$, la largeur à $1/e$ de la distribution
- $R(z) = z \left[1 + \left(\frac{\pi w_0^2}{\lambda z} \right)^2 \right]$, le rayon de courbure du front d'onde
- $\Phi(z) = -\arctan \left(\frac{\lambda z}{\pi w_0^2} \right)$, la variation spatiale de la phase du faisceau (phase de Gouy).

Pour résoudre l'équation paraxiale il est généralement avantageux d'utiliser la forme équivalente, plus compacte :

$$A(r, z) = \frac{\mathcal{A}}{1 + i\zeta} e^{-\frac{r^2}{w_0^2(1+i\zeta)}} \quad (\text{IV.10})$$

où $\zeta = 2z/b$ est une coordonnée longitudinale adimensionnée définie à partir du paramètre confocal $b = 2\pi w_0^2 / \lambda = k w_0^2$.

1. Approximation de l'enveloppe lentement variable :

$$\left| \frac{\partial^2 A_2}{\partial z^2} \right| \left| k \frac{\partial A_2}{\partial z} \right|$$

IV.1. Calibration des signaux SHG : approches théoriques, analytiques et numériques

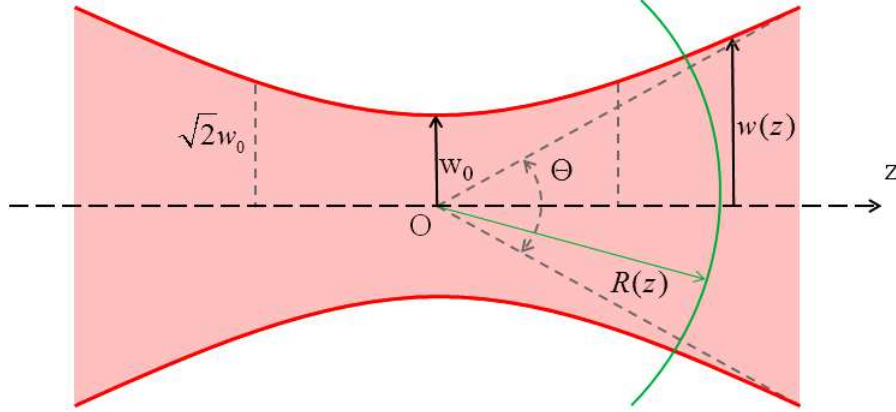


FIGURE IV.2 – Faisceau gaussien.

IV.1.1.3 Solution en champ focalisé

En écrivant le champ gaussien incident sous cette forme, on va chercher les solutions de l'équation de propagation sous une forme similaire :

$$A_2(r, z) = \frac{\mathcal{A}_2(z)}{1 + i\zeta} e^{-\frac{2r^2}{w_0^2(1+i\zeta)}} \quad (\text{IV.11})$$

où la dépendance radiale est identique à celle du terme source. En injectant les expressions IV.10 et IV.11 dans l'équation de propagation IV.8, on voit que $\mathcal{A}_2$ vérifie l'équation différentielle :

$$\frac{dA_2}{dz} = \frac{i\omega_2}{2n_2c} \chi^{(2)} A_1^2 \frac{e^{i\Delta kz}}{(1 + i\zeta)} \quad (\text{IV.12})$$

qui s'intègre directement sous la forme :

$$\mathcal{A}_2 = \frac{i\omega_2}{2n_2c} \chi^{(2)} \mathcal{A}_1^2 J(\Delta k, 0, z) \quad (\text{IV.13})$$

avec :

$$J(\Delta k, 0, z) = \int_0^z \frac{e^{i\Delta kz'} dz'}{1 + i\frac{2z'}{b}} \quad (\text{IV.14})$$

décrivant les effets de focalisation du faisceau. Reste à réécrire cette équation IV.13 en terme de nombre de photons et de diamètre de la fibrille.

• **Calcul de l'intensité SHG rayonnée** - La première étape consiste à relier l'intensité SHG (I_2 , en $W.s^{-1}.m^{-2}$) à l'amplitude du champ laser incident (A_1) à partir de l'équation IV.13 et de l'expression (cf. Boyd [88]) :

$$I_2 = 2\varepsilon_0 n_2 c |A_2|^2 \quad (\text{IV.15})$$

où n_2 est l'indice de réfraction du milieu pour l'onde harmonique. On obtient alors :

$$I_2 = \frac{\varepsilon_0 \omega_2^2}{2n_2 c} |A_1^2|^2 |\chi^{(2)}|^2 |J|^2 \quad (\text{IV.16})$$

Chapitre IV. Mesure quantitative du signal de génération de seconde harmonique

Comme :

$$|A_1^2|^2 = \left(\frac{I_1}{2\varepsilon_0 n_1 c} \right)^2 \quad (\text{IV.17})$$

et :

$$\omega_2 = \frac{2\pi c}{\lambda_{SHG}} \quad (\text{IV.18})$$

on trouve l'intensité SHG rayonnée :

$$I_2 = \frac{2\pi^2 I_1^2}{n_2 n_1^2 \varepsilon_0 c \lambda_{las}^2} |\chi^{(2)}|^2 |J(\Delta k, 0, d)|^2 \quad (\text{IV.19})$$

• **Passage en puissance** - On calcule ensuite la puissance rayonnée (P_2^c , en $W.s^{-1}$) en intégrant le flux de photons sur la surface de focalisation :

$$P_2^c = \int_{S_{foc}} I_2 dS \quad (\text{IV.20})$$

le profil étant gaussien, l'intégrale est égale à la valeur moyenne multipliée par la surface de focalisation :

$$P_2^c = I_2 S_{foc} = I_2 \pi w_2^2 \quad (\text{IV.21})$$

avec $w_2 = \frac{w_1}{\sqrt{2}}$ la demi-largeur à 1/e de la distribution SHG. Il s'agit ici d'une puissance crête puisque nous considérons la SHG à partir d'impulsions courtes (fs).

• **Nombre de photons émis** - On peut enfin calculer le nombre de photons SHG générés dans le volume focal en le reliant à la puissance rayonnée selon l'expression :

$$N_{SHG} = \int \frac{P_2^{moy}}{\hbar \omega_2} dt \quad (\text{IV.22})$$

On peut relier la puissance SHG moyenne (P_2^{moy}) à la puissance crête (P_2^c), en multipliant directement par le nombre d'impulsions :

$$P_2^{moy} = P_2^c R \tau_2 \quad (\text{IV.23})$$

où R est le taux de répétition du laser, τ_2 la durée des impulsions harmoniques. Ainsi en intégrant les signaux émis durant Δt on obtient le nombre de photons SHG émis durant ce laps de temps :

$$N_{SHG} = R \tau_2 \Delta t \frac{P_2^c}{\hbar \omega_2} \quad (\text{IV.24})$$

Dans cette expression $R \tau_2 \Delta t$ représente le temps utile d'illumination. En utilisant l'équation IV.21 et en injectant l'expression de I_2 (eq. IV.19), on obtient :

$$N_{SHG} = \frac{R \tau_2 \Delta t}{\hbar \omega_2} \pi w_2^2 \frac{2\pi^2 I_1^2}{n_2 n_1^2 \varepsilon_0 c \lambda_{las}^2} |\chi^{(2)}|^2 |J|^2 \quad (\text{IV.25})$$

avec :

$$\begin{cases} \omega_2 = \frac{4\pi c}{\lambda_{las}} \\ \tau_2 = \frac{\tau_1}{\sqrt{2}} \end{cases} \quad (\text{IV.26})$$

IV.1. Calibration des signaux SHG : approches théoriques, analytiques et numériques

respectivement la fréquence et la durée des impulsions SHG. Ceci se réécrit :

$$N_{SHG} = \frac{R\tau_1 \Delta t \pi^2 w_2^2 I_1^2}{2\sqrt{2}\hbar n_2 n_1^2 \varepsilon_0 c^2 \lambda_{las}} |\chi^{(2)}| |J|^2 \quad (\text{IV.27})$$

que l'on va maintenant relier à la puissance incidente qui, de même qu'en IV.20 et IV.23, s'écrit :

$$P_1^{moy} = R\tau_1 \int I_1 dS \quad (\text{IV.28})$$

En considérant un profil d'intensité constant (*Top-Hat*) dans le volume focal² on a :

$$P_1^{moy} = R\tau_1 I_1 \pi w_1^2 \quad (\text{IV.29})$$

soit :

$$I_1 = \frac{P_1^{moy}}{R\tau_1 \pi w_1^2} \quad (\text{IV.30})$$

En injectant cette expression de l'intensité incidente dans l'équation IV.27, on en déduit :

$$N_{SHG} = \frac{\Delta t P_1^2}{4\sqrt{2}\hbar n_2 n_1^2 \varepsilon_0 \lambda_{las} R\tau_1 w_1^2} |\chi^{(2)}|^2 |J|^2 \quad (\text{IV.31})$$

• **Susceptibilité non-linéaire effective de la fibrille** - A ce stade il est nécessaire d'introduire des hypothèses pour décrire le système étudié. Tout d'abord si l'on considère des fibrilles petites devant la taille du volume focal, on peut négliger le déphasage de l'onde vue par chaque molécule individuelle et ainsi utiliser la relation classique (modèle additif) liant la susceptibilité non-linéaire ($\chi^{(2)}$) à l'hyperpolarisabilité des triples hélices (β_{TH}) :

$$\chi_{fib}^{(2)} = c_{TH} \beta_{TH} \quad (\text{IV.32})$$

En outre, on utilise la susceptibilité non-linéaire effective ($\chi_{eff}^{(2)}$) qui décrit la réponse tensorielle à une excitation par une polarisation circulaire et inclut les effets de champs locaux. Enfin, on peut tenir compte du fait que la fibrille n'occupe pas toute la surface de focalisation (milieu hétérogène). Pour cela, on pondère la susceptibilité non-linéaire effective par le rapport des sections de la fibrille (S_{fib}) et du volume focal (S_{foc}). On obtient alors la relation :

$$\chi_{eff}^{(2)} = \frac{S_{fib}}{S_{foc}} \chi_{fib}^{(2)} = \frac{S_{fib}}{S_{foc}} c_{TH} \beta_{TH} \quad (\text{IV.33})$$

où c_{TH} et β_{TH} représentent respectivement la densité de triples hélices dans la fibrille et l'hyperpolarisabilité d'une triple hélice et en notant $S_{fib} = 2w_1 \bar{d}$ et $S_{foc} = \pi w_1^2$ les sections de la fibrille et du volume focal respectivement, avec $\bar{d}$ le diamètre moyen apparent de la fibrille.

$$\bar{d} = \frac{1}{\pi} \int_0^\pi d \sin \alpha d\alpha = \frac{2d}{\pi} \quad (\text{IV.34})$$

2. En pratique cette approximation est relativement contraignante et il est possible de s'en affranchir en introduisant un modèle numérique de la distribution d'intensité dans le volume focal.

Chapitre IV. Mesure quantitative du signal de génération de seconde harmonique

Cette formule n'est valable que lorsque la fibrille est intégralement contenue dans le volume focal soit, en première approximation, $d \leq 2w_1$ ce qui assure $S_{fib} \leq S_{foc}$. Ainsi :

$$\chi_{eff}^{(2)} = c_{TH} \frac{4d}{\pi^2 w_1} \beta_{TH} \quad (IV.35)$$

et on en déduit finalement le nombre de photons SHG en fonction du diamètre de la fibrilles :

$$N_{SHG} = \frac{2\sqrt{2}}{\pi^4} \frac{c_{TH}^2 \Delta t P_1^2}{\hbar n_2 n_1^2 \varepsilon_0 c^2 \lambda_{las} R \tau_1 w_1^4} d^2 |\beta_{TH}|^2 |J(\Delta k, 0, d)|^2 \quad (IV.36)$$

IV.1.1.4 Approximation des ondes planes

Le terme $J(\Delta k, 0, d)$ décrit les effets de focalisation induit par l'objectif à forte ouverture numérique :

$$J(\Delta k, 0, d) = \int_0^d \frac{e^{i\Delta k z'} dz'}{1 + \frac{iz'}{z_R}} \quad (IV.37)$$

avec $\Delta k = 1,02 \cdot 10^6 \text{ m}^{-1}$ pour le collagène et $z_R = \frac{\pi w_0}{\lambda_{las}} = 4,84 \cdot 10^{-7} \text{ m}$ dans notre cas. Pour une petite fibrille ($d = 10 \text{ nm}$) on peut, en première approximation, considérer que :

$$\begin{cases} \Delta k d \ll 1 \\ z \ll z_R \end{cases} \quad (IV.38)$$

Ceci permet, dans le cas des plus petites fibrilles, d'approximer le champ laser par des ondes planes pour lesquelles :

$$J = \int_0^{\bar{d}} dz' = \bar{d} = \frac{2d}{\pi} \quad (IV.39)$$

Ce qui revient à négliger la focalisation du faisceau au niveau de la fibrille. Finalement le nombre de photons SHG émis par une fibrille isolée de diamètre d s'écrit, dans cette approximation :

$$N_{SHG} = \frac{8\sqrt{2}}{\pi^6} \frac{c_{TH}^2 \Delta t P_1^2}{\hbar n_2 n_1^2 c^2 \varepsilon_0 \lambda_{las} R \tau_1 w_1^4} |\beta_{TH}|^2 d^4 = A |\beta_{TH}|^2 d^4 \quad (IV.40)$$

On voit que le nombre de photons générés dépend effectivement de l'hyperpolarisabilité et de l'intensité incidente au carré ainsi que du diamètre à la puissance 4 (ou la densité de molécules au carré), ce qui est cohérent avec l'équation IV.1.

Il est alors intéressant de tester la validité de l'approximation en calculant numériquement (figure IV.3) le nombre de photons générés en fonction du diamètre de la fibrille dans le cas d'un faisceau gaussien (eq. IV.36) ou d'ondes planes (eq. IV.40).

Ce calcul est restreint au domaine de validité des expressions précédentes, permettant d'exprimer la susceptibilité non-linéaire effective selon l'équation IV.35, c'est-à-dire :

$$d \leq 2w_1 = 364 \text{ nm} \quad (IV.41)$$

On voit sur la figure IV.3 que dans le cas, plus réaliste, d'un faisceau gaussien, le nombre de photons générés est toujours inférieur à celui calculé dans l'approximation en ondes

IV.1. Calibration des signaux SHG : approches théoriques, analytiques et numériques

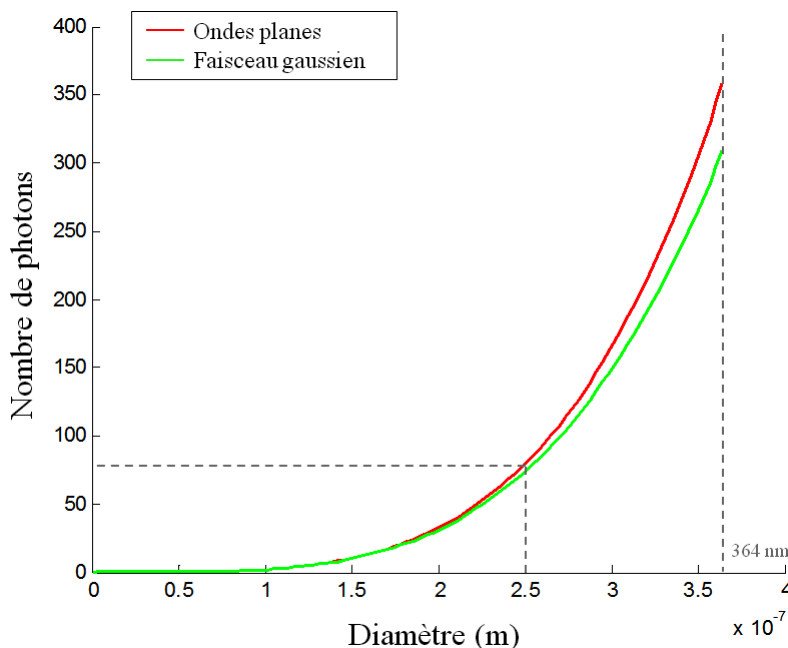


FIGURE IV.3 – Signal SHG émis par des fibrilles de collagène de diamètre variable : *Calcul analytique pour un faisceau gaussien (eq. IV.36), en vert, et dans l'approximation d'ondes planes (eq. IV.40), en rouge, pour des fibrilles de diamètre inférieur à 364 nm.*

planes. Ceci est dû à la phase de Gouy, dans le cas du régime focalisé, qui déphase les signaux provenant des extrémités supérieure et inférieure du volume focal, comme cela a été observé dans la cornée [16]. En conclusion si l'approximation en ondes planes apparaît valide pour des fibrilles relativement petites, pour des fibrilles de diamètre comparable au volume focal il apparaît alors nécessaire de résoudre le problème complet au travers des équations IV.36 et IV.37.

IV.1.2 Simulations numériques

Le calcul théorique précédent s'appuie sur un certain nombre d'hypothèses. Notamment nous avons supposé que l'on peut décrire le champ électrique par un modèle d'ondes gaussiennes, nous avons considéré un profil d'intensité constant à l'intérieur du volume focal et nous avons défini une susceptibilité non-linéaire effective selon la formule IV.35, ce qui impose de se limiter au cas $d \leq 2w_1$. Pour tester la validité de ces différentes approximations nous avons réalisé des simulations numériques permettant de s'affranchir de ces limitations.

IV.1.2.1 Principe

Nous avons utilisé un code Matlab développé, à l'origine, par Ivan Gusachenko, dans le cadre de sa thèse au LOB, pour simuler la génération de seconde harmonique émise par les faisceaux de fibres de collagène d'un tendon [182]. Ces simulations modélisent le tendon comme un milieu homogène, à l'échelle du volume focal, et permettent un calcul

vectorel de la distribution du champ électrique autour du point focal, en utilisant la méthode du spectre angulaire [183]. En particulier elles prennent en compte les paramètres d'excitation tels que la distance de travail de l'objectif utilisé, son ouverture numérique, le *waist* du faisceau incident, l'angle solide de détection... En outre les simulations tiennent compte d'effets de propagation dans le tissu tels que la biréfringence. La réponse non-linéaire des différentes composantes tensorielles est ensuite calculée en fonction de la polarisation incidente.

Partant de là, nous avons modifié le code pour l'adapter à notre cas, à savoir la SHG provenant d'une unique fibrille de collagène. Ici on étudie donc un milieu non biréfringent, sans interface optique mais hétérogène à l'échelle du volume focal. On définit pour cela la susceptibilité non-linéaire $\chi^{(2)}$ comme valant 1 dans la fibrille et 0 à l'extérieur, dans le reste du volume focal. Ceci permet de calculer la réponse SHG d'une fibrille de diamètre $d \geq 2w_1$. La fibrille est supposée selon l'axe x , et on définit son diamètre en discrétisant le volume focal et en spécifiant le tenseur de susceptibilité non-linéaire en chaque point. Le faisceau est focalisé dans une goutte d'eau avant de rentrer dans la lamelle, et la polarisation du faisceau excitateur est circulaire. Dans ces simulations, nous négligeons les aberrations, induites par la fine couche d'air entre les deux lamelles, qui peuvent déformer le front d'onde et modifier la taille du volume focal.

IV.1.2.2 Résultats et discussion

Le résultat de ces simulations met en exergue différents domaines (figure IV.4.a). Dans la première partie de la courbe ($d \leq 2w_1$), le nombre de photons détectés croît, comme attendu, avec le diamètre à la puissance 4, nonobstant un écart en limite de volume focal ($200 \leq d \leq 364 \text{ nm}$). Ainsi, pour de petites fibrilles (avec des diamètres inférieurs à 200 nm), les approximations effectuées sont valides et l'approche gaussienne, voire en onde plane, est suffisante pour décrire les effets observés. A noter que dans les tissus le diamètre des plus grosses fibrilles n'excédant pas 300 nm , cette portion de la courbe décrit une grande partie des fibrilles de collagène *in vivo*. Dans la seconde partie, alors que les fibrilles dépassent la largeur du volume focal, la majeure partie des molécules de collagène ajoutées ne contribuent pas à la SHG et la courbe s'infléchit progressivement. Finalement, lorsque le diamètre dépasse la dimension axiale du volume focal, la courbe sature puisque les molécules ajoutées ne sont pas excitées.

L'écart entre les courbes théorique (rouge) et simulée (bleue), pour des diamètres comparables à la résolution latérale (figure IV.4.b), est dû à plusieurs effets simultanés. En premier lieu, les simulations tiennent compte de la distribution spatiale d'intensité dans le volume focal, ce qui n'est pas le cas du calcul théorique précédent. Par conséquent, les molécules en bord de volume focal voient une puissance incidente plus faible et contribuent donc moins au signal que les molécules au centre. En outre, les simulations numériques permettent un calcul vectoriel des différentes composantes tensorielles qui, au vu des ouvertures numériques utilisées, peuvent jouer un rôle non-négligeable dans le cas de fibrilles de taille comparable à la résolution axiale. Enfin, pour les plus grosses fibrilles, les simulations tiennent compte de la phase de Gouy dans le volume focal qui modifie la construction cohérente du signal SHG ; la différence de phase introduite diminuant le signal total. Ces trois aspects expliquent majoritairement les différences observées entre l'approche analytique (figure IV.4.b, en rouge) et les simulations numériques (en bleu). En

IV.2. Mesures expérimentales

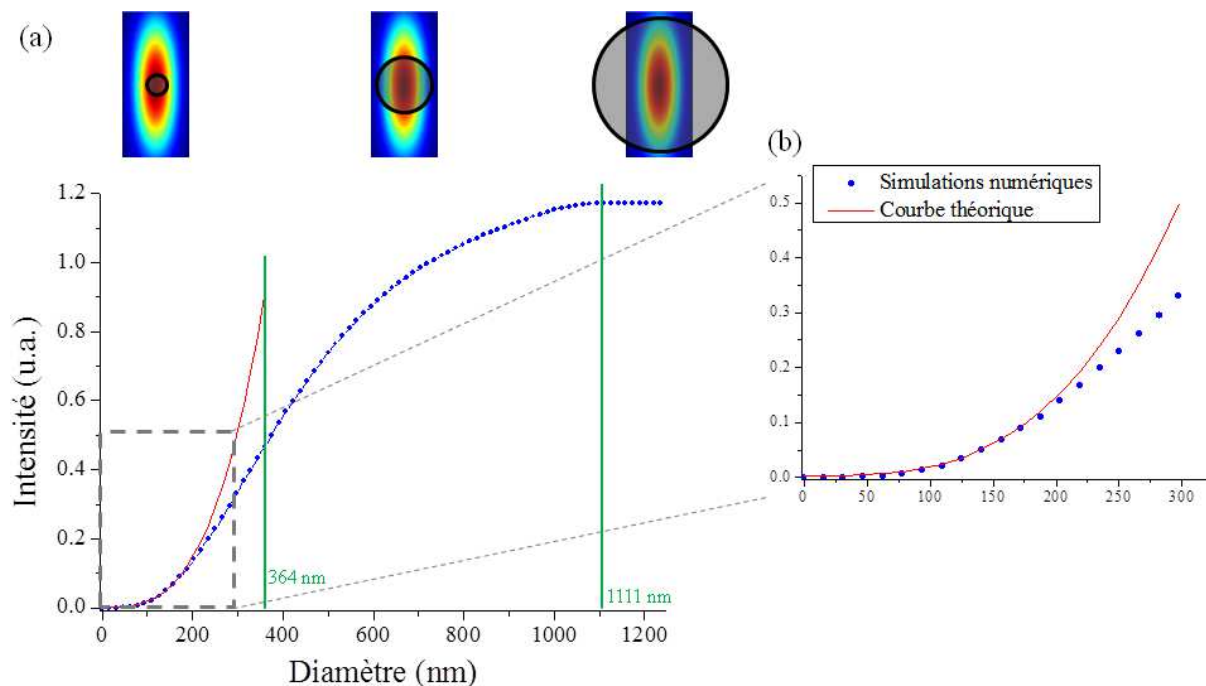


FIGURE IV.4 – Simulations numériques : (a) *Intensité SHG mesurée en fonction du diamètre de la fibrille* et (b) *Zoom sur les fibrilles de diamètre inférieur à 300 nm (taille maximale des fibrilles in vivo). Simulation numérique (en bleu) et approche analytique (en rouge) pour un modèle en ondes planes. La première zone correspond à des fibrilles de diamètre inférieur à la largeur du volume focal (zone de validité de la formule théorique), la seconde à des diamètres compris entre les dimensions latérale et axiale du volume focal et la dernière à des diamètres supérieurs à la résolution axiale.*

pratique, pour des fibrilles de diamètre comparable à la taille caractéristique du volume focal (typiquement $d \geq 200$ nm), ces effets conduisent à des différences notables avec la formule IV.40, et il est alors nécessaire d'introduire un modèle numérique de la réponse.

IV.2 Mesures expérimentales

IV.2.1 Microscopie correlative SHG/TEM

IV.2.1.1 Préparation des échantillons

Le collagène de type I est extrait de tendons de queues de rats, purifié et solubilisé [146, 168]. La pureté de la solution de collagène résultante est mesurée par électrophorèse et la concentration est déterminée par un dosage de l'hydroxyproline [184] (cf. annexe C). Le collagène est dilué à $100 \mu\text{g/ml}$ dans de l'acide acétique $0,5$ M ($\text{pH} = 2,5$, $V_f = 100 \mu\text{l}$) et la fibrillogenèse est induite en haussant le pH par diffusion de vapeur d'ammoniac, sous cloche, durant 1h. Une goutte d'échantillon ($3 \mu\text{l}$) est ensuite déposée sur une grille d'or de TEM (200 mesh), sans film de carbone à la surface, posée sur une lamelle de verre,

puis séchée à l'air libre durant 24h. La grille est ensuite retirée et placée entre deux autres lamelles de verre dans un porte échantillon. Cette étape ôte le collagène déposé sur la première lamelle et ne conserve que les fibrilles accrochées à la grille.

IV.2.1.2 Imagerie correlative sur une même fibrille de collagène

La grille est alors directement placée sous le microscope SHG (figure IV.5), en prenant soin de repérer les carreaux de la grille où des fibrilles se sont fixées. Pour cela on utilise des grilles de TEM numérotées.

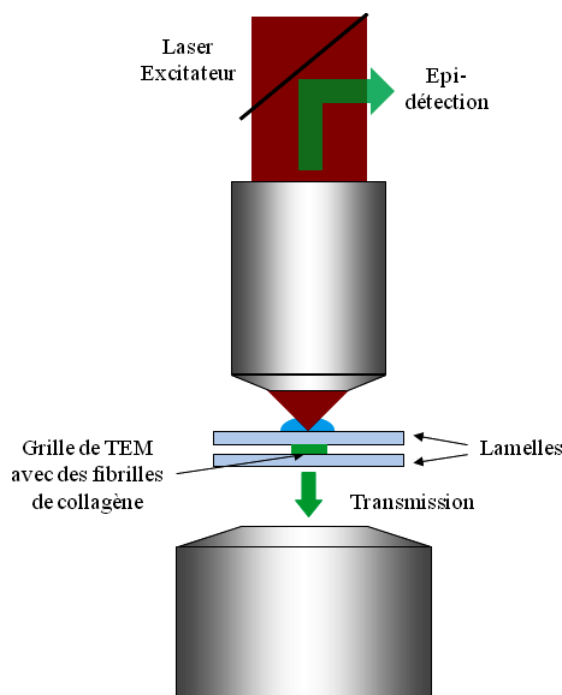


FIGURE IV.5 – Schéma du montage : *Le laser est focalisé au travers d'un objectif 40x, 1,1 NA à immersion. L'échantillon de collagène sur grille d'or est placé dans une fine couche d'air ($\approx 5 \mu\text{m}$) entre deux lamelles de microscope et l'acquisition est faite en transmission et en épi-détection simultanément.*

Après quoi, l'échantillon est emporté au LCMCP dans son porte-échantillon, pour éviter toute manipulation inutile qui risquerait de perturber les fibrilles attachées à la grille, et observé en TEM par Carole Aimé, sans aucune étape de marquage (notamment à l'acétate d'uranyle) ou de fixation additionnelle. En imageant les mêmes repères sur la grille, on peut garantir l'observation des mêmes fibrilles de collagène avec les deux techniques (figure IV.6).

IV.2. Mesures expérimentales

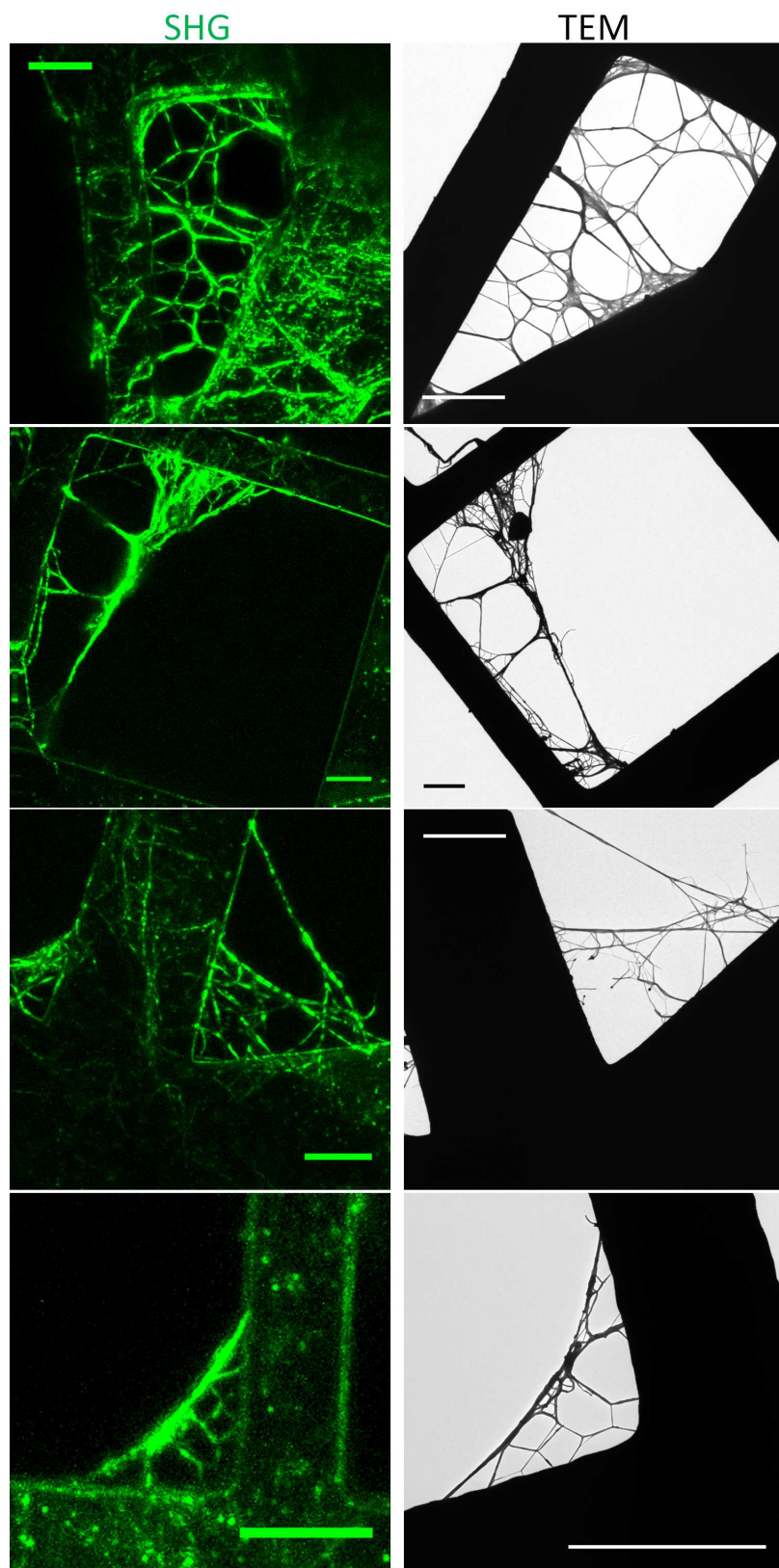


FIGURE IV.6 – Imagerie corrélative SHG/TEM : Images de 4 échantillons différents. Barres d'échelles 15 μm .

Le microscope électronique utilisé a déjà été décrit précédemment (cf. III.1.1.3) et l'imagerie SHG est effectuée sur le microscope du laboratoire détaillé au chapitre II (cf. II.3). L'objectif utilisé (40x, 1,1 W) étant un objectif à immersion, la fine couche d'air entre les deux lamelles introduit des aberrations qui détériorent la résolution du microscope. C'est pourquoi nous avons mesuré la demi-largeur à $1/e$ (w_1) directement sur les profils d'intensité des plus petites fibrilles de collagène de la grille (qui ont un diamètre très inférieur à la PSF). A une longueur d'onde excitatrice de 860 nm , on obtient $w_1 = 220\text{ nm}$. Les piles d'images sont acquises en transmission à 100 kHz avec une puissance au foyer d'environ $12,5\text{ mW}$. La polarisation incidente est circulaire pour illuminer les fibrilles de collagène de manière homogène quelle que soit leur orientation. Il est important de noter que la puissance excitatrice n'est pas limitée par le laser (on se contente d'utiliser environ 20% de la puissance maximale) mais par les dégâts occasionnés sur les fibrilles. En effet, celles-ci ayant un diamètre typique compris entre 3 et 300 nm , elles sont très vulnérables au faisceau imageur, tant en microscopie SHG qu'en TEM. Ainsi à trop forte puissance excitatrice les fibrilles se rompent durant l'acquisition des images comme en atteste la figure IV.7.

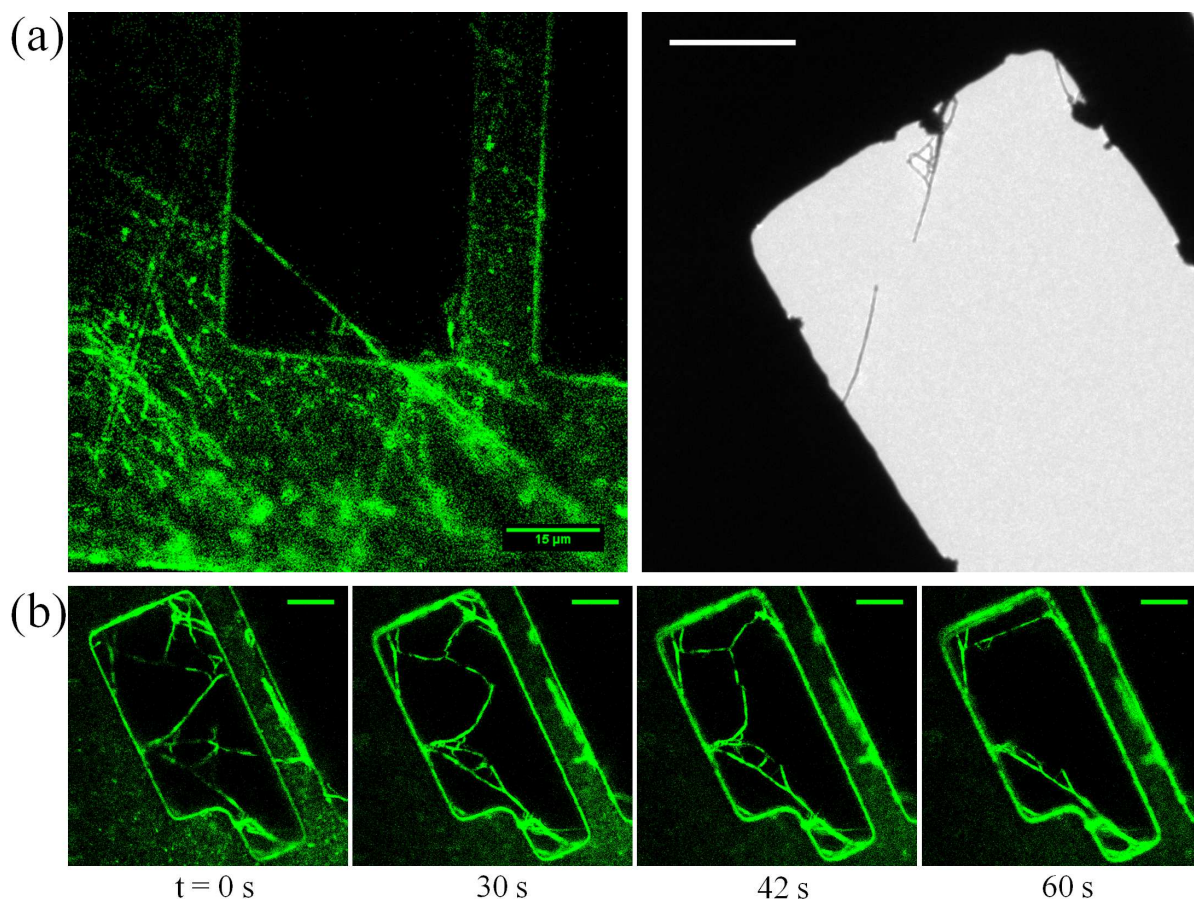


FIGURE IV.7 – Rupture des fibrilles durant l'imagerie : (a) Due au TEM et (b) Due à la microscopie SHG. Barres d'échelles $15\text{ }\mu\text{m}$.

Pour toutes ces expériences, comme déjà mentionné, nous avons effectué la microscopie SHG en premier, suivi de l'imagerie TEM. Il est intéressant de noter qu'en inversant

IV.2. Mesures expérimentales

l'ordre des mesures, le signal SHG disparaît presque totalement. Cela indique que soit l'hyperpolarisabilité, soit la structure macromoléculaire du collagène est perturbée durant la microscopie électronique. La première explication, la perte du β , pourrait être due à la déshydratation de l'échantillon collagénique lors de la mise sous vide et semblerait indiquer que la présence de molécules d'eau autour des acides aminés est requise pour délocaliser efficacement les électrons le long de la liaison peptidique. La seconde explication est que la microscopie électronique perturbe la structure des molécules de collagène, à une échelle comprise entre la liaison peptidique et la fibrille [185], en réduisant l'ordre local requis pour construire efficacement les signaux SHG.

Il est important de rappeler qu'il n'y a pas ici de super-résolution. En effet, dans cette étude l'hypothèse fondamentale pour déduire le diamètre des fibrilles est que l'échantillon contient uniquement des fibrilles isolées ou, ce qui est équivalent, que la distance entre deux fibrilles est supérieure à la largeur du volume focal. Cela signifie qu'il s'agit seulement d'une première étape dans le but de calibrer intégralement les signaux SHG dans les tissus.

IV.2.2 Résultats

IV.2.2.1 Sensibilité du microscope SHG

Cette approche corrélative permet tout d'abord de déterminer la sensibilité de notre microscope SHG. A partir des images TEM et SHG, on peut en effet établir quel est le diamètre des plus petites fibrilles détectables en SHG. Dans les conditions expérimentales utilisées les échantillons sont illuminés à 100 kHz (soit un temps d'intégration de 10 μs par pixel) avec une puissance moyenne incidente de 12,5 mW et le niveau de bruit moyen est de 0,3 photons/pixel. Nous considérons que le signal minimal détectable est de 3 photons par pixel, soit un S/N de 10 dB ³. Ce signal correspond, en TEM, à des fibrilles de 32 ± 2 nm de diamètre. A noter que des fibrilles plus fines (≤ 20 nm) ont pu être observées en TEM, sur les mêmes échantillons, sans pour autant donner lieu à un signal SHG mesurable.

En utilisant un modèle classique, proposé par Hulmes [39], de la répartition des triples hélices de collagène au sein d'une fibrille, on peut déduire de cette mesure le nombre de molécules de tropocollagène ou de liaisons peptidiques nécessaires pour créer un signal SHG détectable sur notre microscope. Dans ce modèle (cf. figure I.4.c), 1 molécule de tropocollagène occupe 2,4 nm^2 dans une coupe transverse de la fibrille. En outre, les triples hélices mesurent 290 nm de long et sont séparées par des *gap* de 45 nm , par conséquent l'encombrement stérique d'une molécule de tropocollagène vaut 838 nm^3 , ce qui donne la densité de triples hélices dans une fibrille :

$$c_{TH} = 1,3 \cdot 10^{24} \text{ m}^{-3} \quad (\text{IV.42})$$

Dans le cas de la géométrie considérée (figure IV.1.a), on a :

$$n_{TH} = \frac{\pi}{2} w_1 d^2 c_{TH} \quad (\text{IV.43})$$

triples hélices dans le volume focal. Une molécule de tropocollagène étant composée de 3033 acides aminés, *i.e.* liaisons peptidiques, on en déduit le nombre d'harmonophores

3. Ce S/N seuil est choisi car il permet l'ajustement gaussien du profil d'intensité (cf. IV.2.2.2, eq. IV.46).

Chapitre IV. Mesure quantitative du signal de génération de seconde harmonique

dans le volume focal.

$$n_{pept} = 3033n_{TH} = 3033\frac{\pi}{2}w_1d^2c_{TH} \quad (IV.44)$$

Ces valeurs sont résumées dans la table IV.1 pour différents diamètres de fibrilles caractéristiques des tissus conjonctifs.

Imagerie SHG	d (nm)	n_{TH}	n_{pept}	Exemple de tissu
Seuil de détection	30	390	$1,18 \cdot 10^6$	cornée
Détection "confortable"	60	1560	$4,73 \cdot 10^6$	
Signal classique	100	4340	$1,31 \cdot 10^7$	peau

TABLE IV.1 – Sensibilité du microscope SHG : *Relation entre le diamètre des fibrilles (d) et le nombre de triples hélices (n_{TH}) ou de liaisons peptidiques (n_{pept}) détectables en SHG et exemples de tissus contenant de tels types de fibrilles.*

A noter que le panel de diamètres que l'on rencontre dans les tissus s'étend typiquement de 3 à 300 nm. Par conséquent, si la microscopie SHG permet d'imager les fibrilles de collagène de la majorité des tissus conjonctifs (peau, tendon, cornée...) dont le diamètre est supérieur à 30 nm, elle n'est pas appropriée pour l'étude des fibrilles d'ancrages (membranes basales, jonction dermo-épidermique...) extrêmement fines (≤ 10 nm).

IV.2.2.2 Courbes de calibration

Expérimentalement, on obtient la courbe de calibration :

$$N_{SHG} = f(d) \quad (IV.45)$$

en mesurant le nombre de photons SHG générés et le diamètre des fibrilles imagées. Pour chaque fibrille on détermine la taille moyenne sur les images de TEM en mesurant le diamètre en 4 points de la fibrille (figure IV.8.b).

De même sur les images SHG on trace le profil d'intensité en 4 points de la fibrille (figure IV.8.b) que l'on ajuste par une gaussienne (figure IV.8.c) :

$$y(x) = y_0 + a.e^{-\frac{(x-x_c)^2}{2\sigma^2}} \quad (IV.46)$$

On détermine alors le nombre de photons reçus, en calculant l'amplitude de la courbe, en chacun des points de la fibrille, correspondant au signal maximal reçu sur un pixel durant le temps d'intégration Δt .

Les mesures ont été faites sur 6 grilles réalisées à partir de 4 échantillons différents, ce qui conduit à un total de 146 fibrilles (toutes grilles confondues). On trace alors le nombre de photons détectés en fonction du diamètre des fibrilles pour chaque grille individuellement (figure IV.9.a) et pour l'ensemble de toutes les fibrilles (figure IV.9.b) que l'on ajuste avec une fonction puissance du type :

$$N_{SHG} = N_0 + B.d^4 \quad (IV.47)$$

IV.2. Mesures expérimentales

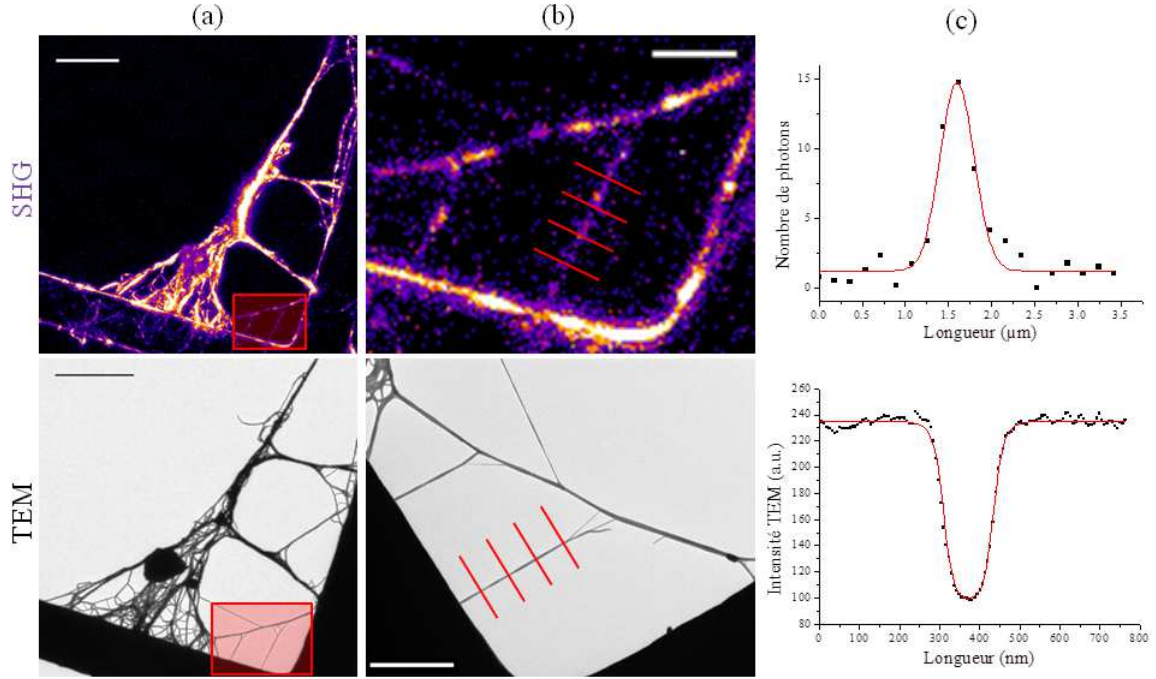


FIGURE IV.8 – Traitement des images corrélatives : (a) Image d'un carreau de la grille (barres d'échelles 20 μm), (b) Zoom sur une ROI (barres d'échelles 5 μm) et (c) Profils d'intensité SHG et TEM en 1 point. Chaque profil est mesuré en 4 points le long de la fibrille.

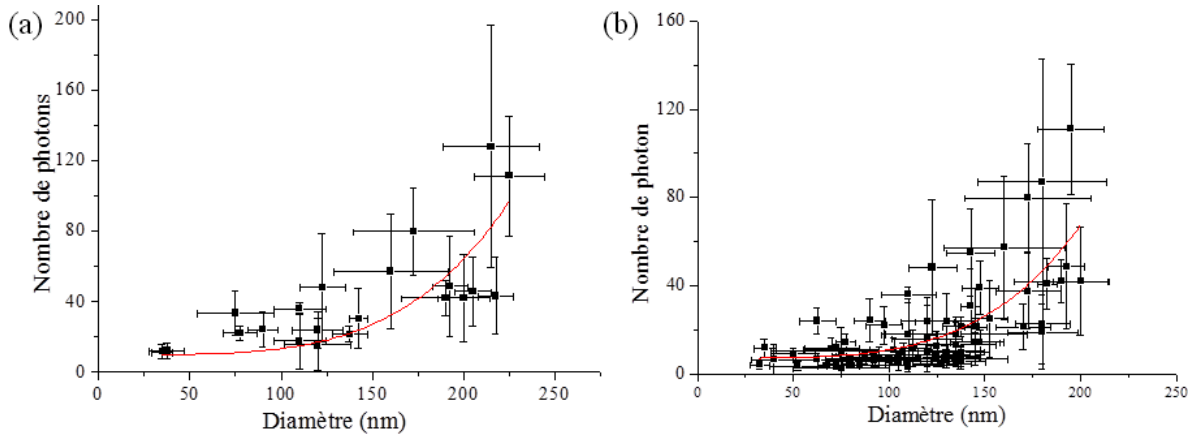


FIGURE IV.9 – Courbes de corrélation entre le signal SHG et le diamètre des fibrilles mesuré en TEM : (a) Pour une grille typique et (b) Pour les 6 grilles confondues, ajustées avec une puissance 4.

Ceci permet d'obtenir le paramètre B pour chaque grille ainsi que pour l'ensemble des grilles (table IV.2).

En considérant l'ensemble des 146 fibrilles sous la forme d'intervalles de diamètre de 50 nm de largeur et en moyennant le nombre de photons reçus pour chaque classe de distance, on observe un diagramme en barres (figure IV.10) où les barres d'erreurs

représentent l'erreur standard (SEM) de la distribution.

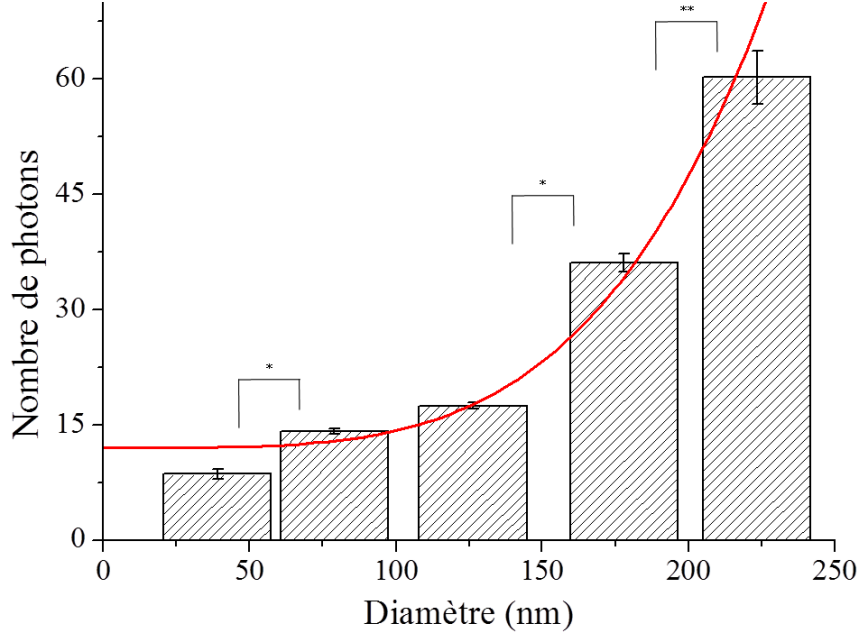


FIGURE IV.10 – Calibration du signal SHG pour des classes de diamètre : Diagramme en barres représentant les classes de distance de 50 nm de largeur et ajustement des données (en rouge). Les barres d'erreurs indiquent l'écart type de la distribution du nombre de photons détecté par classe. Les étoiles indiquent des différences significatives (* : $p\text{-value} \leq 1\%$; ** : $p\text{-value} \leq 0.1\%$).

La courbe verte montre l'ajustement du nombre de photons en fonction du diamètre selon la formule IV.47. Il est important de noter que malgré la variabilité au sein d'une classe de diamètre, celles-ci sont clairement différenciables et statistiquement distinctes. En outre en ajustant ces données par une fonction puissance sous la forme :

$$N_{SHG} = N_0 + B.d^\alpha \quad (\text{IV.48})$$

on observe de plus un bon accord entre l'ajustement ($\alpha = 3,83$) et la formule théorique ($\alpha = 4$).

IV.3 Discussion

Les résultats précédents fournissent une mesure de la sensibilité de notre microscope SHG et une calibration du nombre de photons détecté en fonction du diamètre des fibrilles de collagène. En outre ils permettent de calculer la première hyperpolarisabilité β_{TH} d'une triple hélice de collagène, à condition d'estimer les différents paramètres expérimentaux de manière absolue. Cette mesure peut alors être comparée à la valeur obtenue en HRS, directement sur les triples hélices de collagène [115].

IV.3. Discussion

IV.3.1 Mesure *Top-Down* de l'hyperpolarisabilité d'une triple hélice de collagène

On obtient deux expressions du nombre de photons SHG en fonction du diamètre des fibrilles

- par un ajustement des données expérimentales :

$$N_{SHG}^{exp} = B.d^4 \quad (IV.49)$$

- par une approche analytique :

$$N_{SHG}^{th} = \eta A |\beta_{TH}| d^4 \quad (IV.50)$$

où A est le facteur numérique apparaissant dans l'équation IV.40 et η la fraction de photons détectés sur le nombre de photons générés, décrivant l'efficacité de détection du microscope. En particulier η prend en compte les pertes à la détection (et notamment les réflexions aux interfaces des lamelles) et le rendement quantique des photomultiplicateurs ($\sim 20\%$). Ainsi N_{SHG}^{th} représente le nombre théorique de photons SHG détectés.

Pour calculer la valeur du paramètre A , on part de la formule analytique simplifiée :

$$N_{SHG} = \frac{8\sqrt{2}}{\pi^6} \frac{c_{TH}^2 \Delta t P_1^2}{\hbar n_2 n_1^2 c^2 \varepsilon_0 \lambda_{las} R \tau_1 w_1^4} |\beta_{TH}|^2 d^4 = A |\beta_{TH}|^2 d^4 \quad (IV.51)$$

donnant le nombre de photons SHG en fonction du diamètre, qui fait intervenir un certain nombre de paramètres :

- Tout d'abord les constantes physiques :
 - $\hbar = 1,05.10^{-34} \text{ J.s}^{-1}$ la constante de Planck
 - $c = 3.10^8 \text{ m.s}^{-1}$ la célérité de la lumière dans le vide
 - $\varepsilon_0 = 8,85.10^{-12} \text{ F.m}^{-1}$ la permittivité du vide
 - $n_1 = 1,47$ l'indice du verre à 860 nm
 - $n_2 = 1,5$ l'indice du verre à 430 nm .
- Ensuite les paramètres expérimentaux du microscope, qui peuvent fluctuer et présentent des sources de bruits importantes :
 - $R = 76 \text{ MHz} = 7,6.10^7 \text{ Hz}$ le taux de répétition du laser
 - $\lambda_{las} = 860 \text{ nm} = 8,6.10^{-7} \text{ m}$ la longueur d'onde du laser
 - $\Delta t = 10 \text{ } \mu\text{s} = 10^{-5} \text{ s}$ le temps d'intégration
 - $\tau_1 = 150 \text{ fs} = 1,5.10^{-13} \text{ s}$ la durée d'impulsion du laser
 - $w_1 = 220 \text{ nm} = 2,2.10^{-7} \text{ m}$ la demi-largeur à $1/e$ mesurée sur les petites fibrilles (l'écart avec la résolution optimale (182 nm) de notre microscope est probablement dû aux aberrations introduites par la couche d'air entre les deux lamelles)
 - $P_1 = 12,5 \text{ mW} = 1,25.10^{-2} \text{ W}$ la puissance moyenne sous l'objectif (en considérant 5% de pertes par la lamelle)
 - $\eta = 0,18$ les pertes dans le microscope (essentiellement dues à l'efficacité quantique de la photocathode).
- Et enfin les paramètres liés au collagène :
 - $c_{TH} = 1,3.10^{24} \text{ m}^{-3}$ la densité de triples hélices dans une fibrille de collagène
 - β_{TH} l'hyperpolarisabilité d'une triple hélice de collagène.

Chapitre IV. Mesure quantitative du signal de génération de seconde harmonique

En utilisant l'ensemble de ces données, on calcule :

$$A = 7.696.10^{101} V^2.m^{-12} \quad (\text{IV.52})$$

Il est important de noter que ce paramètre A est inversement proportionnel à w_1 à la puissance 4, ce qui signifie que cette calibration est extrêmement sensible aux aberrations dans l'échantillon, principalement dues à la couche d'air entre les deux lamelles. Ainsi, à partir des équations IV.49 et IV.50 on obtient :

$$\eta A |\beta_{TH}|^2 = B \quad (\text{IV.53})$$

soit :

$$|\beta_{TH}| = \sqrt{\frac{B}{\eta A}} \quad (\text{IV.54})$$

On peut maintenant, à partir des valeurs du paramètre B et des incertitudes données par l'ajustement, calculer notre valeur expérimentale de la première hyperpolarisabilité effective d'une triple hélice de collagène, pour une excitation en polarisation circulaire (table IV.2). Selon que l'on calcule la moyenne des valeurs obtenues sur l'ensemble des échantillons ou celle calculée à partir des classes de diamètre⁴, on obtient un β de $1,8 \pm 0,2.10^{-37} m^4.V^{-1}$ ou $1,7 \pm 0,1.10^{-37} m^4.V^{-1}$. Dans la suite nous garderons cette dernière valeur car elle s'affranchit partiellement de la variabilité des intensités mesurées pour un même diamètre.

Grille TEM	1	2	3	4	5	6	Moyenne	Toutes grilles	Classe de diamètre
B (10^{-8})	1,0 $\pm 0,1$	1,7 $\pm 0,2$	7 ± 2	2,1 $\pm 0,2$	1,7 $\pm 0,1$	2,8 $\pm 0,4$		2,3 $\pm 0,2$	2,2 $\pm 0,2$
β_{TH} (10^{-37})	1.12 $\pm 0,09$	1.5 $\pm 0,1$	3.0 $\pm 0,8$	1.6 $\pm 0,2$	1.5 $\pm 0,1$	1.9 $\pm 0,4$	1.8 $\pm 0,2$	1.7 $\pm 0,2$	1,7 $\pm 0,1$

TABLE IV.2 – Mesure de la première hyperpolarisabilité d'une triple hélice de collagène à partir des signaux SHG : Valeurs expérimentales du paramètre B (m^{-4}) et valeurs correspondantes de l'hyperpolarisabilité d'une triple hélice β_{TH} ($m^4.V^{-1}$), pour chacune des grilles imagées en SHG et en TEM, pour l'ensemble des grilles. Les incertitudes correspondent à l'erreur des ajustements des données expérimentales, sauf pour la moyenne des grilles où elles désignent la déviation standard de la distribution.

IV.3.2 Comparaison aux mesures en HRS selon une approche *Bottom-Up*

IV.3.2.1 Hyperpolarisabilité d'une triple hélice

A partir de la réponse en HRS d'une solution de triples hélices de collagène et de peptides courts collagéniques ($[(PPG)_{10}]_3$) on peut mesurer l'hyperpolarisabilité d'une

4. Cela équivaut à comparer la moyenne des paramètres d'ajustement de l'intensité en fonction du diamètre avec l'ajustement de la moyenne des intensités par diamètre.

IV.3. Discussion

liaison peptidique (cf. annexe A), qui vaut [115] :

$$\beta_{uuu} = 2,8.10^{-40} \text{ m}^4.V^{-1} \quad (\text{IV.55})$$

Partant de là, en utilisant une approche *bottom-up* on peut calculer les deux composantes du tenseur, dans le référentiel propre de la triple hélice, à l'échelle d'une molécule de tropocollagène [136, 141, 115, 186] :

$$\begin{cases} \beta_{xxx} = N(\mathbf{x}.\mathbf{u})^3\beta_{uuu} = N\cos^3\theta\beta_{uuu} \\ \beta_{yyy} = \frac{N}{2}(\mathbf{x}.\mathbf{u})(\mathbf{y}.\mathbf{u})^2\beta_{uuu} = \frac{N}{2}\cos\theta\sin^2\theta\beta_{uuu} \end{cases} \quad (\text{IV.56})$$

où N est le nombre d'acides aminés du domaine hélicoïdal d'une molécule de tropocollagène ($N = 3033$ pour le collagène I). Finalement, en considérant un angle $\theta = 50^\circ$ [186] entre les dipôles non-linéaires et l'axe de la triple hélice, ce qui est donné par nos mesures expérimentales du paramètre d'anisotropie ($\rho = 1,4$) [187, 22] (cf. annexe A, eq. A.17), on obtient :

$$\begin{cases} \beta_{xxx} = N \times 2,2.10^{-37} \text{ m}^4.V^{-1} \\ \beta_{yyy} = N \times 1,6.10^{-37} \text{ m}^4.V^{-1} \end{cases} \quad (\text{IV.57})$$

Cependant, dans ces expériences, la polarisation incidente est linéaire et la géométrie du système complètement différente (détection à 90° de l'excitation...). Pour comparer à nos mesures (cf. IV.3.1), il est alors nécessaire de calculer l'hyperpolarisabilité effective β_{eff}^{HRS} d'une triple hélice dans le plan focal illuminée en polarisation circulaire.

IV.3.2.2 Hyperpolarisabilité effective en polarisation circulaire

Dans la géométrie utilisée pour les expériences SHG, la polarisation incidente est circulaire :

$$\mathbf{E}_\omega = \frac{E_0}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} 1 \\ i \\ 0 \end{pmatrix} \quad (\text{IV.58})$$

sans analyseur à la détection. Ainsi, la puissance SHG rayonnée vaut :

$$P_{2\omega} = N\beta E_\omega.E_\omega \quad (\text{IV.59})$$

Par souci de simplicité on considérera le cas d'une fibrille de collagène selon l'axe (OX) dans le référentiel du laboratoire. Puisque l'on considère la génération de seconde harmonique par une unique fibrille de collagène située dans le plan focal, le référentiel propre d'une triple hélice (désigné par les lettres minuscules) est confondu avec celui de la fibrille (lettres majuscules) et donc du laboratoire. La puissance rayonnée se réécrit alors :

$$\begin{cases} P_X = \beta_{xxx} \frac{E_0}{\sqrt{2}} \frac{E_0}{\sqrt{2}} + \beta_{xyy} \frac{iE_0}{\sqrt{2}} \frac{iE_0}{\sqrt{2}} \\ P_Y = \beta_{yxy} \frac{E_0}{\sqrt{2}} \frac{iE_0}{\sqrt{2}} + \beta_{yyx} \frac{iE_0}{\sqrt{2}} \frac{E_0}{\sqrt{2}} \end{cases} \quad (\text{IV.60})$$

or $\beta_{yxy} = \beta_{yyx} = \beta_{xyy}$ donc :

$$\begin{cases} P_X = \frac{E_0^2}{2} (\beta_{xxx} - \beta_{xyy}) \\ P_Y = iE_0^2 \beta_{xyy} \end{cases} \quad (\text{IV.61})$$

L'intensité SHG détectée en polarisation circulaire s'écrivant :

$$I_{2\omega} \propto |P_X^2| + |P_Y^2| \quad (\text{IV.62})$$

on :

$$I_{2\omega} \propto I(\omega)^2 \frac{|\beta_{xxx} - \beta_{xyy}|^2 + 4|\beta_{xyy}|^2}{4} \quad (\text{IV.63})$$

On définit alors l'hyperpolarisabilité effective d'une triple hélice excitée en polarisation circulaire :

$$\beta_{eff}^{HRS} = \sqrt{\frac{|\beta_{xxx} - \beta_{xyy}|^2 + 4|\beta_{xyy}|^2}{4}} \quad (\text{IV.64})$$

Ainsi l'hyperpolarisabilité effective obtenue à partir des mesures HRS vaut :

$$\beta_{eff}^{HRS} = (1,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-37} \text{ m}^4 \cdot \text{V}^{-1} \quad (\text{IV.65})$$

Cette valeur est à comparer à l'hyperpolarisabilité mesurée à partir de nos courbes de calibration (table IV.2).

$$\beta_{TH} = (1,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-37} \text{ m}^4 \cdot \text{V}^{-1} \quad (\text{IV.66})$$

Cette bonne correspondance valide l'approche additive, utilisée dans ce chapitre (eq. IV.33), permettant d'exprimer la susceptibilité non-linéaire $\chi^{(2)}$ d'une fibrille de collagène à partir de l'hyperpolarisabilité β des triples hélices.

IV.4 Conclusion et perspectives

Dans ce travail nous avons réalisé à notre connaissance, les premières images corrélatives TEM/SHG et mesuré la sensibilité de notre microscope SHG en terme de diamètre (30 nm) et de nombre de molécules (390 triples hélices). Nous avons aussi calibré l'intensité SHG provenant de fibrilles isolées et vérifié la validité de cette calibration avec des modèles théoriques et numériques. Enfin, le calcul de l'hyperpolarisabilité d'une triple hélice nous a permis, par comparaison aux mesures HRS, de valider le modèle additif de calcul de la susceptibilité non-linéaire. D'ores et déjà cette calibration devrait nous permettre de faire des études plus poussées sur la fibrillogénèse du collagène (cf. chapitre III) en exploitant l'évolution du diamètre, mesuré in situ, durant la croissance des fibrilles de collagène.

L'étape suivante consiste à calibrer le signal provenant d'un ensemble de fibrilles dans le volume focal. Pour cela il est nécessaire de déterminer non seulement la densité de molécules (ou le diamètre des fibrilles), comme fait dans ce chapitre, mais aussi le nombre de fibrilles dans le volume focal. Ainsi il ne suffit plus de mesurer l'intensité mais il est indispensable d'obtenir une information supplémentaire sur le signal (par exemple la phase ou la polarisation). Pour ce faire, plusieurs pistes seront à envisager comme par exemple la mesure des diagrammes d'émission SHG vers l'avant et vers l'arrière [138, 188, 189], l'interférométrie SHG [190], la variation de l'ouverture numérique [191] ou encore, option particulièrement intéressante, l'étude de la réponse en polarisation de l'échantillon. En effet, comme il a été décrit précédemment [15, 129, 192], des mesures

IV.4. Conclusion et perspectives

polarimétriques permettent de sonder le rapport des deux composantes indépendantes de l'hyperpolarisabilité ($\rho = \chi_{xxx}^{(2)}/\chi_{xyy}^{(2)}$), qui fournit une mesure du désordre au sein du volume focal. Ainsi, si la P-SHG ne permet pas de dépasser la limite de résolution imposée par la diffraction, elle fournit des informations structurales à l'intérieur du volume focal permettant de quantifier l'orientation des fibrilles à cette échelle [22, 121]. Puisque l'on peut raisonnablement induire que le désordre augmente avec le nombre de fibrilles, en combinant des mesures en polarisation incidente circulaire et linéaire tournante [15, 16] on espère pouvoir calibrer complètement la réponse SHG d'un ensemble de fibrilles. Enfin la P-SHG, en sondant les différentes composantes de l'hyperpolarisabilité pourrait permettre de caractériser plus finement la réponse tensorielle d'une fibrille de collagène et mettre en exergue l'influence des composantes chirales comme observé dans des films minces de collagène [134]. Couplées avec des mesures en *time-lapse* durant la fibrillogénèse, ces expériences pourrait fournir de nouvelles données à propos de la chiralité des fibrilles à différents stades de formation.

À l'heure actuelle, il semble réaliste d'utiliser l'intensité des signaux SHG pour quantifier le diamètre des fibrilles dans des tissus collagéniques très peu denses, tels que le derme réticulaire (cf. chapitre V), ou sur des matrices de collagène diluées. Toutefois, dans le but de calibrer intégralement, en profondeur, la réponse SHG provenant de tissus collagéniques denses, il sera nécessaire de contrôler l'ensemble des paramètres pouvant perturber la propagation du faisceau. En effet, comme on peut le voir dans la formule IV.36, la relation entre le nombre de photons SHG mesurés et le diamètre de la fibrille fait intervenir la puissance au foyer (P_1^2) et la taille du volume focal (w_1^4), qui peuvent être fortement modifiés par l'absorption, la diffusion et les aberrations dans le tissu. Néanmoins, ces sempiternelles limitations des techniques de microscopie font l'objet, à l'heure actuelle, de nombreuses études (modélisation des tissus, optique adaptative...) qui permettent d'espérer s'affranchir de ces problèmes à moyen terme. Enfin, il est intéressant de noter que, malgré une résolution relativement faible, comparée à la microscopie électronique, la calibration de l'intensité peut fournir une méthode pour sonder non-invasivement les modifications de la densité collagénique ou du diamètre des fibrilles dans des tissus pathologiques. En particulier, des études rapportent qu'une insuffisance en certains protéoglycanes peut conduire à une augmentation du diamètre moyen des fibrilles dans la peau de 90 nm à 130 nm [193], variations qui apparaissent *a priori* mesurables par ce type d'approche. Enfin cette calibration des signaux pourrait permettre une quantification plus complète de la progression des fibroses [26].

Les devises Shadok



S'IL N'Y A PAS DE SOLUTION
C'EST QU'IL N'Y A PAS DE PROBLÈME.

Chapitre V

Biomécanique sur peau de souris

*Il est difficile d'attraper un chat noir dans une pièce sombre,
surtout lorsqu'il n'y est pas.
- Proverbe Chinois*

Sommaire

V.1	Le syndrome d'Ehlers-Danlos	126
V.1.1	Pathologie : origine et manifestations	127
V.1.2	Modèles de souris génétiquement modifiées pN et K14-COL5A1	129
V.1.3	La peau	130
V.2	Dispositif expérimental	132
V.2.1	Manipulation des échantillons	132
V.2.2	Machine de traction	134
V.2.3	Imagerie	136
V.3	Analyse des images	138
V.3.1	Déformation des follicules pileux	138
V.3.2	Orientation des fibrilles de collagène	145
V.4	Résultats et discussion	150
V.4.1	Déformation du tissu	150
V.4.2	Réorganisation du collagène	152
V.4.3	Réponse mécanique	156
V.4.4	Différences entre souris mutantes et contrôles	158
V.4.5	Conclusion et perspectives	160

Dans ce chapitre nous allons présenter un projet à l'interface entre la biologie, la mécanique et la microscopie dans le cadre d'une étude de la biomécanique de peaux de souris modèles du syndrome d'Ehlers-Danlos (EDS). Comme nous venons de le voir au chapitre précédent, il est aujourd'hui difficile d'obtenir des mesures quantitatives de la densité collagénique d'un tissu conjonctif en microscopie multiphoton. Ainsi nous nous sommes attachés ici à développer une approche phénoménologique pour obtenir des informations quantitatives sur la structure du réseau de fibrilles à l'échelle micrométrique. Pour cela nous avons développé une analyse multi-échelle permettant une meilleure compréhension de la réponse mécanique d'un tissu riche en collagène fibrillaire (tendons, cornée,

peau...), le but étant d'explorer la relation entre la déformation macroscopique subie par un tissu, caractéristique de sa fonction, et la réponse microscopique locale propre à sa microstructure.

La matrice extracellulaire est constituée de quatre grandes familles de composés : les collagènes, les protéoglycanes, les glycoprotéines¹ et les protéines élastiques (élastine). Ces composés peuvent, pour la plupart, s'auto-assembler mais également interagir directement entre eux ou avec les cellules par l'intermédiaire de récepteurs. C'est grâce à cette trame de connexions que se réalise la vie cellulaire (adhérence, morphogenèse, apoptose...) et que se forgent les caractéristiques tissulaires (solidité, souplesse, transparence...). Il est important de rappeler que des tissus aux propriétés aussi différentes que l'os, la peau, la cornée ou encore les tendons, sont souvent structurés à partir des mêmes matériaux de base et notamment à partir des collagènes. Les propriétés tissulaires résultent donc de différences quantitatives entre les composés matriciels d'un tissu à un autre, d'interactions spécifiques ou d'agencements topologiques propres à un type de tissu.

Ce projet a été réalisé en étroite collaboration avec Florence Ruggiero et Christelle Bonod-Bidaud, de l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon (IGFL, ENS Lyon), en raison de leur excellente expertise sur des lignées de souris génétiquement modifiées, modèles de l'EDS, ainsi qu'avec Jean-Marc Allain et Barbara Lynch, du Laboratoire de Mécanique des Solides (LMS, Ecole Polytechnique), qui développent des modèles et des techniques de mesure de déformations dans les tissus mous.

Nous allons dans un premier temps présenter le syndrome d'Ehlers-Danlos, en nous focalisant sur le rôle du collagène V, et les modifications structurales induites dans le derme. Nous verrons ensuite le protocole expérimental adopté pour ce projet dans lequel nous avons adapté nos conditions d'imagerie aux modèles de souris, afin d'éviter toute modification des lignées actuelles, et travaillé sur des échantillons de peaux les plus intacts possibles, pour minimiser l'invasivité. Dans le but d'extraire des informations quantitatives de nos images nous avons développé des méthodes d'analyse d'image permettant d'étudier la déformation mécanique locale et la réorganisation du réseau collagénique concomitante. Enfin, nous verrons qu'il est possible d'observer des différences, entre les réponses mécaniques des échantillons génétiquement modifiés et contrôles, et de les relier à la réorganisation du tissu lors de la traction.

V.1 Le syndrome d'Ehlers-Danlos

Les syndromes d'Ehlers-Danlos forment un groupe hétérogène d'affections génétiques rares, nommées, dans les années 1930, d'après les travaux d'Edvard Ehlers (1863-1937) et Henri-Alexandre Danlos (1844-1912). Il s'agit d'une anomalie des tissus conjonctifs non-cartilagineux [194], affectant la matrice extracellulaire. Les anomalies moléculaires responsables de cette maladie portent souvent sur les collagènes et les enzymes assurant leur maturation. Les manifestations cliniques diffèrent selon les types de syndrome, les principales étant une hyper-mobilité articulaire, une hyper-élasticité de la peau et une grande fragilité des tissus. Il n'y a pas de traitement connu actuellement, hormis des traitements d'accompagnement. La forme classique du syndrome, qui sera exclusivement discutée dans ce chapitre, est majoritairement due à des mutations du collagène V, un

1. Une glycoprotéine est une protéine portant un ou plusieurs groupements oligosaccharides.

V.1. Le syndrome d'Ehlers-Danlos

collagène fibrillaire présent en petite quantité dans les tissus affectés.

V.1.1 Pathologie : origine et manifestations

V.1.1.1 Types d'EDS, symptômes, prévalence...

Ce syndrome appartenant à un groupe hétérogène de formes cliniques d'atteinte du tissu conjonctif, en 1997 un groupe de chercheurs a proposé de les réduire à six types majeurs :

- EDS de type hyper-mobile (1 personne sur 10 à 15 000)
- EDS de type classique (1 personne sur 20 à 50 000)
- EDS de type vasculaire (1 personne sur 100 à 250 000)
- EDS de type cypho-scoliotique (moins de 60 cas connus)
- EDS de type arthro-chalasique (une trentaine de cas)
- EDS de type dermato-sparaxique (une dizaine de cas).

La forme classique de cette maladie héréditaire est à transmission autosomique dominante² en ce qui concerne les gènes de collagènes I et V mais pourrait être récessive dans le cas du gène de la ténascine X. En France, la prévalence est estimée à 1/5000 (tous types confondus) mais reste imprécise car il existe probablement de nombreux cas infra-cliniques. Cette affection, sans prédisposition ethnique ou raciale, se place en terme de nombre de patients comme la troisième pathologie génétique du tissu conjonctif. Aujourd'hui, il n'y a pas de traitement de la maladie et cette dernière nécessite une prise en charge pluridisciplinaire adaptée à chaque type de syndrome.

L'EDS conduit à des symptômes variables suivant les types de syndrome :

- peau hyper-extensible et fragile
- mauvaise cicatrisation (cicatrice atrophique)
- hyper-mobilité et fragilité articulaire
- peau douce et veloutée
- hématomes nombreux et spontanés, sans troubles de la coagulation
- vaisseaux sanguins facilement endommagés (surtout dans le cas de l'EDS vasculaire, le plus sévère)
- rupture prématurée des membranes durant la grossesse
- problèmes de vision.

Des douleurs chroniques très invalidantes rythment le quotidien des malades des syndromes d'Ehlers Danlos, avec parfois la survenue de crises de durée variable allant de quelques jours à plusieurs mois. Les facultés de contorsions des sujets atteints sont telles que, jadis, certains firent l'objet d'attraction dans les foires.

V.1.1.2 Causes

L'EDS illustre particulièrement bien l'imbrication des divers constituants matriciels au service du maintien des propriétés tissulaires. Cette maladie a longtemps semblé résulter d'anomalies génétiques portant sur les collagènes fibrillaires I et III, ou sur des enzymes assurant la maturation des collagènes telles que la N-protéinase, qui est responsable du

2. Une maladie génétique est dite à transmission autosomique dominante lorsque l'allèle morbide (version mutée du gène en cause) est porté par un chromosome non sexuel (ni X, ni Y) et que la présence d'un seul allèle morbide est suffisante pour que la maladie s'exprime.

clivage amino-terminal de ces collagènes, ou encore la lysyl-hydroxylase, garante de la réticulation des collagènes (cf. I.2.3.1). Cependant, en ce qui concerne la forme classique de la maladie, il a été établi que des mutations affectant les gènes du collagène V (*COL5A1* et *COL5A2*) sont responsables de pratiquement 90% [195] des cas rapportés. Toutefois ce type d'EDS peut effectivement, mais plus rarement, être dû à des anomalies moléculaires au niveau de la chaîne α_1 du collagène I [196].

Pour autant, si certaines pathologies génétiques matricielles comme l'ostéogénèse imparfaite ou le syndrome de Marfan résultent de défauts qui touchent principalement une seule molécule matricielle, en l'occurrence respectivement le collagène I et la fibrilline I³, il est désormais acquis que l'EDS n'est pas strictement lié à des mutations affectant la synthèse ou la maturation des collagènes, mais résulte de mutations siégeant sur des gènes de protéines différentes, qui donnent lieu à des symptômes cliniques proches. En effet, des anomalies d'une protéine matricielle non collagénique, la ténascine X, sont à l'origine de quelques cas avérés d'EDS classique [197, 198, 199]. Le rôle de la ténascine X dans la genèse de l'EDS reste cependant encore à clarifier car les patients souffrent également d'hyperplasie médullosurrénalienne congénitale⁴ (syndrome de Cushing). De plus, le phénotype diffère légèrement par rapport aux cas où les collagènes I et V sont impliqués, puisqu'il n'y a pas de cicatrices atrophiques et que les fibres de collagène n'ont pas l'aspect singulier en "chou-fleur", décrit pour les mutations sur le collagène V [200].

A l'heure actuelle, les causes moléculaires de l'EDS classique ne sont pas encore toutes élucidées et des expériences d'inactivation de gènes chez la souris laissent présumer que d'autres constituants matriciels (décorine, lumican...) ou d'autres ligands du collagène V [201] pourraient être en cause, élargissant ainsi le spectre des protéines impliquées dans cette maladie.

Néanmoins, puisque le collagène V demeure la principale cause avérée de l'EDS classique, nous allons dans la suite étudier l'impact des mutations de gènes codant pour sa synthèse sur le phénotype des lignées de souris génétiquement modifiées développées à l'IGFL.

V.1.1.3 Le collagène V

Dès 1994, des études de liaison génétique chez des patients atteints d'EDS ont permis de mettre en évidence l'importance fonctionnelle du collagène V, pourtant peu abondant dans les tissus [202]. Depuis lors, de nombreuses mutations des gènes du collagène V conduisant à des EDS ont été décrites. Celles-ci sont de nature variée (délétion d'exons, mutation ponctuelle, translocation ...), et touchent principalement la triple hélice et le carboxy-propeptide [203, 204, 205]. Les répercussions de ces mutations au niveau protéique peuvent être quantitatives (haplo-insuffisance⁵ ou nombre de molécules diminué) ou qualitatives (protéines anormales produisant un effet dominant négatif), sans que puisse y être associé un degré de gravité [206, 207]. Il existe trois chaînes α de collagène V pouvant s'associer en au moins trois isoformes moléculaires différentes [208, 209, 210] :

- l'hétérotrimère $[\alpha_1(V)]_2\alpha_2(V)$: la plus abondante et ubiquitaire, qui joue un rôle déterminant dans la nucléation et le contrôle de la croissance des fibrilles de collagène

3. Protéine impliquée dans les propriétés d'élasticité des tissus.

4. Déficit en cortisol et surproduction d'androgène.

5. Un seul allèle "actif" est insuffisant pour maintenir une action normale du gène.

V.1. Le syndrome d'Ehlers-Danlos

hétérotypiques I/V

- l'isoforme $\alpha_1(V)\alpha_2(V)\alpha_3(V)$: minoritaire, que l'on trouve principalement dans le placenta
- l'homotrimère $[\alpha_1(V)]_3$: présentant une distribution tissulaire restreinte.

Des mutations des gènes *Col5a1*, le plus fréquemment, et *Col5a2*, plus rarement, codant la synthèse des chaînes α_1 et α_2 du collagène V, sont responsables d'un fort pourcentage ($\sim 90\%$) des cas d'EDS classique [195, 211, 212]. Le gène *Col5a3* codant pour la chaîne $\alpha_3(V)$ a été plus récemment caractérisés [213, 214], sans que ses mutations puissent être reliées à un EDS.

Les biopsies apportent peu de renseignements sur la structure des tissus conjonctifs atteints mais ont permis de montrer que, d'un point de vue ultrastructural, les fibrilles apparaissent fusionnées, clairsemées et que leurs contours et leurs diamètres sont irréguliers (fibres en "chou-fleur" dans le cas de la peau). Ce diamètre n'est pas systématiquement accru alors que dans les tissus les fibrilles sont d'autant plus grosses que le collagène V est faiblement représenté [215]. En effet les fibrilles présentes dans les tissus conjonctifs (peau, tendon, os ...) sont presque exclusivement composées de collagènes I, III et V et la stœchiométrie de chacun de ces composants au sein d'une même fibrille a une incidence directe sur son diamètre, qui, en retour, semble déterminer certaines propriétés tissulaires. Par exemple, l'os, où la solidité est requise, présente de larges fibrilles hétérotypiques I/V (100–150 nm de diamètre moyen) dans lesquelles le collagène V est largement minoritaire (moins de 1%). A l'opposé dans la cornée, comportant les mêmes types de collagène (I/V) mais où l'on trouve près de 25% de collagène V, les fibrilles sont plus fines (25 – 30 nm de diamètre moyen) et agencées de manière très régulière, caractéristique cruciale pour la transparence de ce tissu [216, 217, 218, 219]. Ainsi plusieurs études convergentes montrent que le taux de collagène V est un des facteurs responsables de la régulation du diamètre des fibrilles hétérotypiques I/V, notamment grâce à une particularité dans la maturation de son extrémité amino-terminale. En effet, contrairement aux collagènes I et III, le collagène V, après sécrétion dans l'ECM, conserve un large domaine globulaire amino-terminal qui, par encombrement stérique, limite le dépôt de molécules de collagène I au sein des fibres hétérotypiques I/V [220, 208].

V.1.2 Modèles de souris génétiquement modifiées pN et K14-COL5A1

La dérégulation de la structure collagénique de l'ECM est une caractéristique commune des différents types d'EDS. Comme les anomalies du collagène V restent à ce jour la principale cause de cette affection, nous avons travaillé sur des modèles de souris présentant différentes modifications de l'expression des gènes du collagène V, conduisant à différents phénotypes. Le but de la réalisation de ces lignées étant d'essayer de mieux comprendre comment le collagène V interagit avec les autres composants matriciels pour déterminer les caractéristiques tissulaires.

La première lignée de souris génétiquement modifiées utilisée, appelée pN, est un modèle de souris pour l'EDS [221, 222] qui présente une déficience pour le collagène V. Elle est porteuse d'une délétion sur la séquence codant l'amino-télopeptide de la chaîne $\alpha_2(V)$ (exon 6 du gène *Col5a2*) et présente des manifestations cutanées voisines de celles observées dans l'EDS, notamment l'hyper-élasticité de la peau, sans pour autant que le

phénotype observé en soit la réplique exacte (pas d'hyper-mobilité articulaire démontrée) [222]. L'analyse de l'ultrastructure des peaux de souris pN révèle le rôle spécifique des isoformes du collagène V [221, 223]. Il apparaît que les $[\alpha_1(V)]_3$ ne contribuent pas à la formation de fibrilles hétérotypiques I/V mais s'organisent en de fines structures fibrillaires ($\emptyset \sim 5 - 10$ nm), à la surface des fibrilles de collagène I. La mutation nulle étant très rapidement létale pour les souris [221] (elles ne survivent pas au-delà de quelques jours), seuls des mutants hétérozygotes seront étudiés ici. Quelques équipes, dont nos collaborateurs de l'IGFL, s'attachent à étudier en profondeur les répercussions de cette délétion sur la fibrillogenèse.

La seconde lignée, appelée K14-COL5A1, a été récemment créée par nos collaborateurs à l'IGFL [223]. C'est une lignée de souris transgéniques sur-exprimant l'homotrimère $[\alpha_1(V)]_3$ humain (gène *COL5A1*) sous contrôle du promoteur de la kératine 14 (K14), spécifique de l'épiderme. Ceci permet de produire l'homotrimère dans des cellules n'exprimant pas le gène *Col5a2* dans le but d'induire une accumulation au niveau de la jonction dermo-épidermique. Nos collaborateurs ont alors observés une augmentation de la densité en petites fibrilles sous la membrane basale épidermique [223]. Cette sur-représentation de l'homotrimère, normalement minoritaire, entraîne des modifications structurales au niveau de la jonction dermo-épidermique et provoque le changement de certaines propriétés biomécaniques. Préablement à ce projet, nos collaborateurs lyonnais ont réalisé des expériences préliminaires, pour caractériser la réponse mécanique des peaux de souris, qui semble indiquer, quoique les résultats ne soient pas significatifs, en statique, une relaxation plus lente du tissu, et en traction rapide ($10\%/min$) une diminution de la rigidité [223].

Attendu que le collagène V est nécessaire à la fibrillogenèse du collagène I dans les tissus ainsi que pour la structuration de l'ECM, ces différentes lignées de souris génétiquement modifiées représentent des modèles inestimables pour l'étude de la relation structure/fonction dans un tissu vivant, ainsi que pour la compréhension des modifications tissulaires pouvant découler d'une pathologie. Dans ce chapitre, nous allons étudier le lien entre la modification du réseau de collagène et l'altération des propriétés mécaniques de la peau dans le cadre de souris pN et K14-COL5A1 hétérozygotes (PCR positives) et de souris sauvages (PCR négatives).

V.1.3 La peau

La peau est un organe composée d'environ 2000 milliards de cellules (chez l'adulte) formant plusieurs couches de tissus (figure V.1). Elle représente une surface d'environ 2 m^2 sur une épaisseur de 1 à 4 mm et pèse, chez l'humain, environ 5 kg. Elle est la première barrière de protection (notamment contre les infections) de l'organisme et intervient aussi dans les processus de régulation de la température corporelle. La peau est caractérisée par une grande capacité de régénération et de cicatrisation et est résistante à la plupart des infections tant que son intégrité physique et fonctionnelle est assurée. Par ailleurs, elle joue un rôle de protection contre les rayons solaires, en particulier les ultraviolets, notamment grâce à la présence de mélanocytes.

La peau est composée de trois couches de tissus superposées : l'épiderme, le derme et l'hypoderme et forme, avec ses annexes, le système tégumentaire.

V.1. Le syndrome d'Ehlers-Danlos

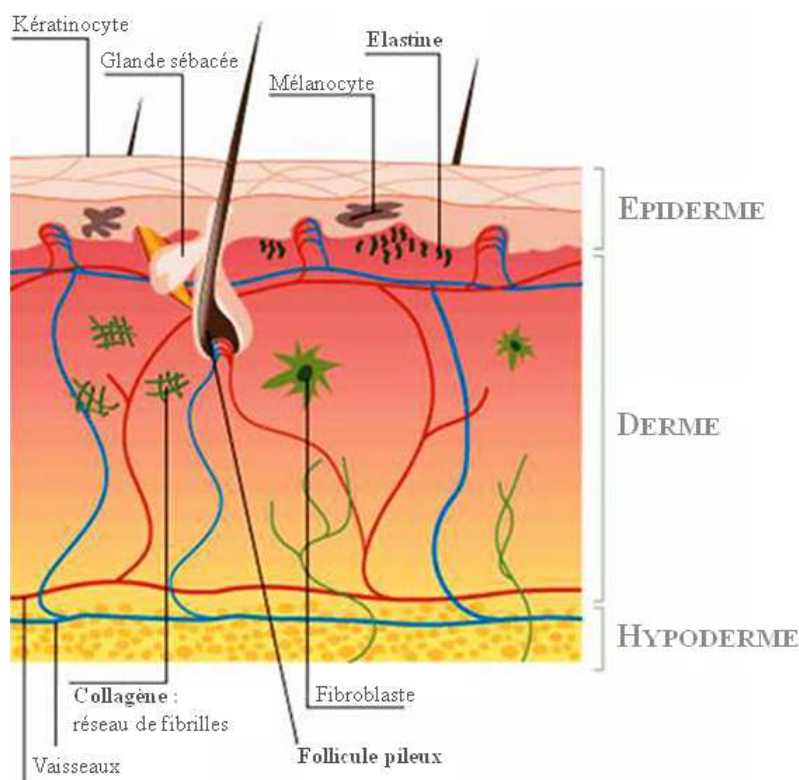


FIGURE V.1 – Structure de la peau : Couches superposées (épiderme, derme et hypoderme) ainsi que leurs principaux constituants [source : http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doschim/decouv/peau/voir_chimie_cosm.html].

L'épiderme - L'épiderme est la partie la plus superficielle de la peau, en contact avec l'extérieur. Il est composé de plusieurs couches (cornée, claire, granuleuse, épineuse...) de cellules, la couche extérieure correspondant à des cellules mortes kératinisées qui sont éliminées continuellement. L'épiderme n'est irrigué par aucun vaisseau sanguin et est seulement alimenté en nutriments par diffusion depuis le derme. Il contient en revanche de nombreuses terminaisons nerveuses. Il est composé de différents types de cellules formant plusieurs couches : les kératinocytes (95%), produisant une variété de protéines protectrices (la kératine), les mélanocytes, sécrétant un pigment (la mélanine) à l'origine du bronzage et protégeant des effets pervers du soleil et enfin les cellules de Langerhans ainsi que les lymphocytes qui interviennent dans les mécanismes immunitaires.

Le derme - Le derme est la seconde couche de la peau. Beaucoup plus épaisse que l'épiderme, c'est un tissu conjonctif formé de cellules (en particulier les fibroblastes), de fibres de collagène (principalement de type I et V) et de fibres élastiques (élastine). Celles-ci baignent dans un liquide interstitiel contenant notamment des protéoglycanes. Contrairement à l'épiderme, le derme est vascularisé. Grâce à sa richesse en fibres élastiques et en collagène, le derme assure la résistance, l'extensibilité et l'élasticité de la peau. De plus le collagène joue un rôle crucial dans les processus cicatriciels. Une fine couche cutanée de structure complexe, appelée jonction dermo-épidermique, sépare l'épiderme du derme et assure la cohésion et les échanges entre ces deux tissus. Le derme est lui-même constitué

de deux couches différentes :

- la couche papillaire : fermement liée à la couche basale de l'épiderme, présentant de fines fibres de collagène sans orientation particulière et contenant les follicules pileux et la majorité des fibroblastes
- la couche réticulaire : contenant un réseau dense de grosses fibres de collagène et de fibres élastiques, organisées en faisceaux relativement ordonnés.

Les différences de structure entre les deux parties du derme conduisent à différentes propriétés mécaniques : la déformabilité pour le derme papillaire et la résistance pour le derme réticulaire [224]. Les modifications structurales de l'ECM, qui peuvent être dues à une mutation génétique ou à une dérégulation d'expression de protéines spécifiques (vieillesse, cancer, cicatrice atrophique ...), peuvent entraîner des modifications de ces propriétés mécaniques délétères pour le fonctionnement et le remodelage de la peau.

L'hypoderme et les annexes - L'hypoderme est la couche la plus profonde et la plus épaisse de la peau. C'est une couche adipeuse, riche en vaisseaux sanguins, et rattachée au derme par des fibres de collagène et d'élastine, dans laquelle sont entreposés les adipocytes qui fournissent des graisses à l'organisme lors d'un effort. Son rôle est d'amortir les pressions auxquelles la peau est soumise, de protéger l'organisme des variations de température et de donner à la peau sa capacité à se remodeler (paume de la main) ou non (le talon).

Les annexes de la peau comprennent les follicule pileux, très riches en kératine, les glandes sudoripares, qui sécrètent la sueur, et les glandes sébacées, sécrétant le sébum.

V.2 Dispositif expérimental

V.2.1 Manipulation des échantillons

Les expériences sont effectuées sur des peaux *ex vivo* fournies par l'IGFL et provenant de souris C57/Bl6, sauvages ou génétiquement modifiées (K14-COL5A1 et pN), sacrifiées à 1 mois. Le tissu du dos⁶ est prélevé en prenant soin de marquer l'axe antéro-postérieur par un point d'encre au niveau de la patte antérieure droite (figure V.2.a-b). Les peaux sont ensuite épilées (à la crème dépilatoire) et l'épiderme, noir, est retiré pour éviter de perturber l'imagerie SHG. Les échantillons sont placés dans un milieu de culture (*Dulbecco's modified eagle medium*, PAA) contenant des antibiotiques et des antifongiques (Pénicilline et streptomycine). Ils sont ensuite acheminés au LOB par courrier express (*DHL*). Après réception, les milieux de cultures sont changés sous PSM en L2 de biologie cellulaire et les échantillons sont conservés à 6°C jusqu'à leur utilisation, moins de cinq jours après le sacrifice. En parallèle des expériences au LOB, des PCR sont faites par nos collaborateurs à l'IGFL sur les souris sacrifiées pour déterminer leur génotype (sauvages *vs* mutées). Les expériences au LOB sont donc faites "en aveugle" puisque l'on ne connaît le phénotype de l'échantillon qu'après sa manipulation. Sur l'ensemble des 31 échantillons K14-COL5A1, pN et sauvage (table V.1), 19 donnent des résultats probants, 7 ne permettent pas de conclure car leurs génotypes n'ont pu être déterminés pour des

6. Nous avons aussi fait quelques essais sur la peau du ventre, mais les résultats sont plus difficiles à interpréter puisque les propriétés mécaniques diffèrent entre femelles et mâles.

V.2. Dispositif expérimental

raisons expérimentales, et 5 sont infructueux pour des raisons expérimentales (soit des problèmes sur le dispositif de traction, soit un défaut d'imagerie).

Souris	K14-COL5A1	sauvage	pN	Indéterminé
Nombre	10	11	3	7

TABLE V.1 – Bilan des échantillons étudiés : *Les deux lignées étant obtenues à partir de souris de même fond génétique, les souris négatives correspondent à la même population contrôle. Le génotype de certains échantillons pN n'a pu être déterminé pour des raisons expérimentales.*

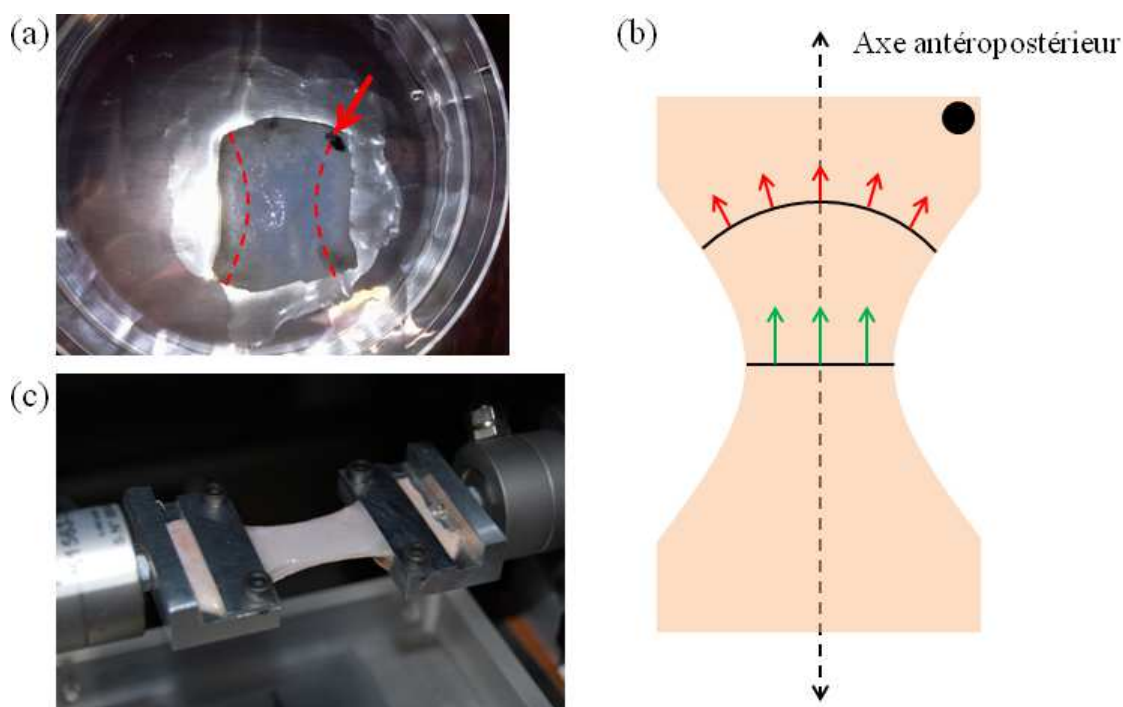


FIGURE V.2 – Préparation d'un échantillon : (a) *Échantillon avant la découpe. Le point à l'encre au niveau de la patte avant droite permet de repérer l'axe antéro-postérieur.* (b) *Schéma de la découpe selon une éprouvette. Cette forme permet d'éviter les effets de bord ou une rupture au niveau des mors.* (c) *Image de l'échantillon découpé et fixé sur le dispositif de traction. A ce stade l'échantillon est légèrement étiré, sans pour autant que la force mesurée dépasse le bruit de mesure, pour défaire les plis en surface et obtenir la référence de déformation (0%).*

Pour chaque expérience, l'échantillon est découpé selon une éprouvette (figure V.2.b), selon la direction tête/queue, pour éviter les effets de bord liés à l'attache dans les mors. Après quoi l'échantillon est solidement fixé entre deux mors (figure V.2.c). L'écartement entre les mors est ensuite ajusté pour rendre l'échantillon horizontal sans toutefois obtenir de force supérieure au bruit de mesure. Les dimensions de l'échantillon (longueur entre

les mors, largeur et épaisseur) sont systématiquement mesurées au pied à coulisse avant sa mise en place sous le microscope. Les dimensions typiques sont $15 \times 10 \times 1 \text{ mm}^3$.

V.2.2 Machine de traction

Les tests mécaniques sont effectués avec un dispositif de traction uniaxiale conçu au Laboratoire de Mécanique des Solides (LMS, École Polytechnique), placé directement sous le microscope SHG (figure V.3). Les objectifs utilisés sur le microscope étant à immersion, un gel d'adaptation d'indice est utilisé pour faire le contact optique entre l'objectif et la peau. L'utilisation d'eau n'étant pas pratique expérimentalement sur des peaux grasses, nous utilisons du gel ophtalmique (*Lacrigel*, *Europhta*) présentant l'avantage d'avoir le même indice optique que l'eau.

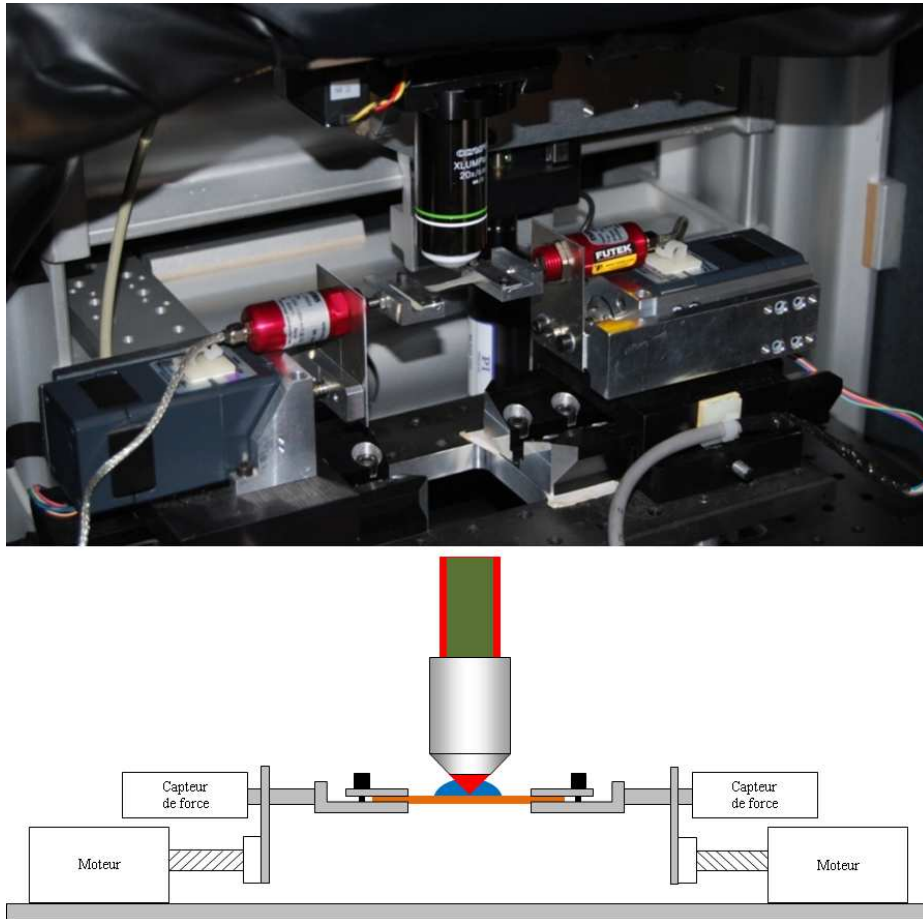


FIGURE V.3 – Dispositif expérimental : *La traction est effectuée directement sous le microscope SHG, le liquide d'immersion permettant à la fois le contact optique et l'hydratation de la pour la durée de l'expérience. La traction est symétrique et les capteurs de force permettent de mesurer la réponse de l'échantillon à la déformation imposée.*

L'ajout de la goutte de gel déformant légèrement la peau sous l'effet de son poids, l'écartement des mors est ajusté pour éviter tout mouvement vertical de l'échantillon. La

V.2. Dispositif expérimental

position à laquelle l'échantillon ne bouge plus verticalement est prise comme référence (0% de déformation). A noter qu'à ce stade la force mesurée ne dépasse pas le bruit de mesure. Les capteurs utilisés autorisent à travailler sur une gamme de forces faibles (jusqu'à 9N) avec une précision de 0,2% (soit 0,02 N). La vitesse de chargement est réglée à 0,01%/s de la taille initiale de l'échantillon (longueur entre les mors), ce qui en pratique correspond généralement à 0,002 mm/s. La traction est symétrique pour permettre d'imager la même portion de l'échantillon au cours de la déformation (figure V.3). Il subsiste toutefois une légère dérive horizontale de la ROI lors de la traction. Une translation micrométrique de la plateforme du microscope permet de corriger ces déplacements latéraux éventuels, en se repérant sur les structures caractéristiques du tissu, afin d'imager toujours la même zone. Un déplacement axial de l'objectif permet quant à lui de corriger tout déplacement vertical, particulièrement gênant en début de traction lorsque, l'échantillon n'étant pas encore tendu, le tissu suit les déplacements de l'objectif.

On effectue des pas de 5% de déformation, en 10 minutes environ, tout en mesurant la force simultanément. A chaque palier, la traction est stoppée pour permettre l'imagerie de l'échantillon (figure V.4.a). On poursuit l'expérience jusqu'à la rupture du tissu (typiquement entre 50% et 70%) qui se traduit par une diminution nette de la force mesurée, alors même que la traction continue. La figure V.4.a (en bleu) montre l'allure typique des courbes de force mesurées en fonction du temps de traction. Les flèches rouges correspondent aux arrêts pour l'imagerie durant lesquels le tissu relaxe, ce qui conduit à une légère diminution de la force. Connaissant la taille initiale (l_0) de l'échantillon et le déplacement (Δl) des moteurs, on en déduit l'allongement relatif ($\Delta l/l_0$), ou déformation machine, tandis que la force (F) et la section (S) de l'échantillon nous permettent de calculer la contrainte nominale (F/S). On en déduit les courbes contraintes/déformation classiques en biomécanique (figure V.4.b).

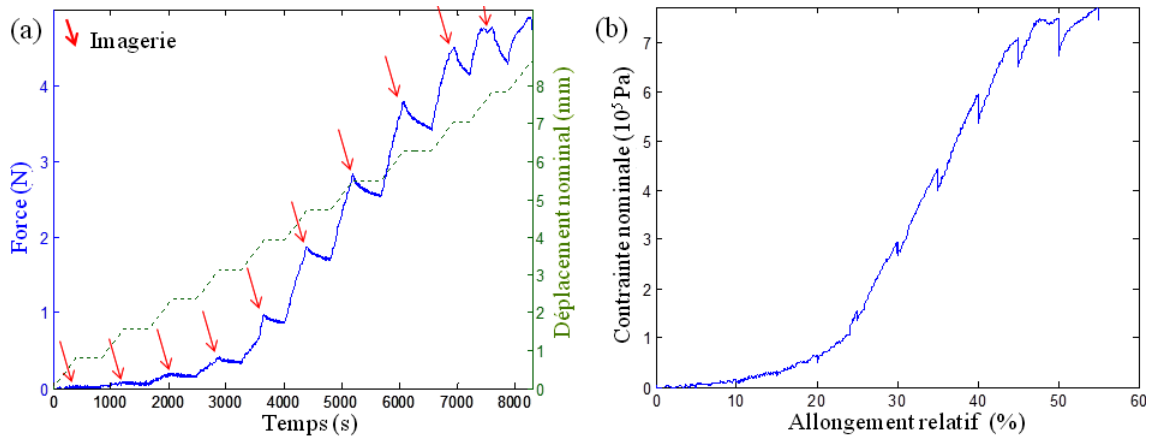


FIGURE V.4 – Mesures mécaniques : (a) Courbe de force (bleu) et de déplacement nominal (vert) en fonction du temps. Les flèches rouges indiquent les arrêts de traction pour l'imagerie durant lesquels la force relaxe. (b) Courbe de la contrainte nominale en fonction de l'allongement relatif du tissu. Échantillon de peau de souris K14-COL5A1.

V.2.3 Imagerie

L'échantillon est imagé à 860 nm avec une polarisation circulaire ($\epsilon = 12\%$), pour ne pas favoriser d'orientation. Le faisceau est focalisé par un objectif 20x, 0,95 NA offrant un champ de vue relativement large ($480 \times 480\text{ }\mu\text{m}^2$). La puissance incidente est de $29 \pm 6\text{ mW}$ (en fonction de l'échantillon) et la fréquence d'acquisition de 100 kHz ($10\text{ }\mu\text{s}$ par pixel). Le tissu étant épais et très diffusant, l'acquisition est faite en épi-détection. L'épaisseur des piles d'images obtenues varie fortement suivant le degré de déformation de l'échantillon. Avant la traction la profondeur de pénétration est typiquement autour de $100\text{ }\mu\text{m}$ mais chute rapidement jusqu'à $40\text{ }\mu\text{m}$ avant la rupture. Au vu de la résolution de notre objectif (table II.1), et pour limiter le temps d'exposition, la taille des voxels utilisés est de $0,5 \times 0,5 \times 2\text{ }\mu\text{m}$. Dans ces conditions, l'acquisition d'une pile d'images prend environ 5 minutes.

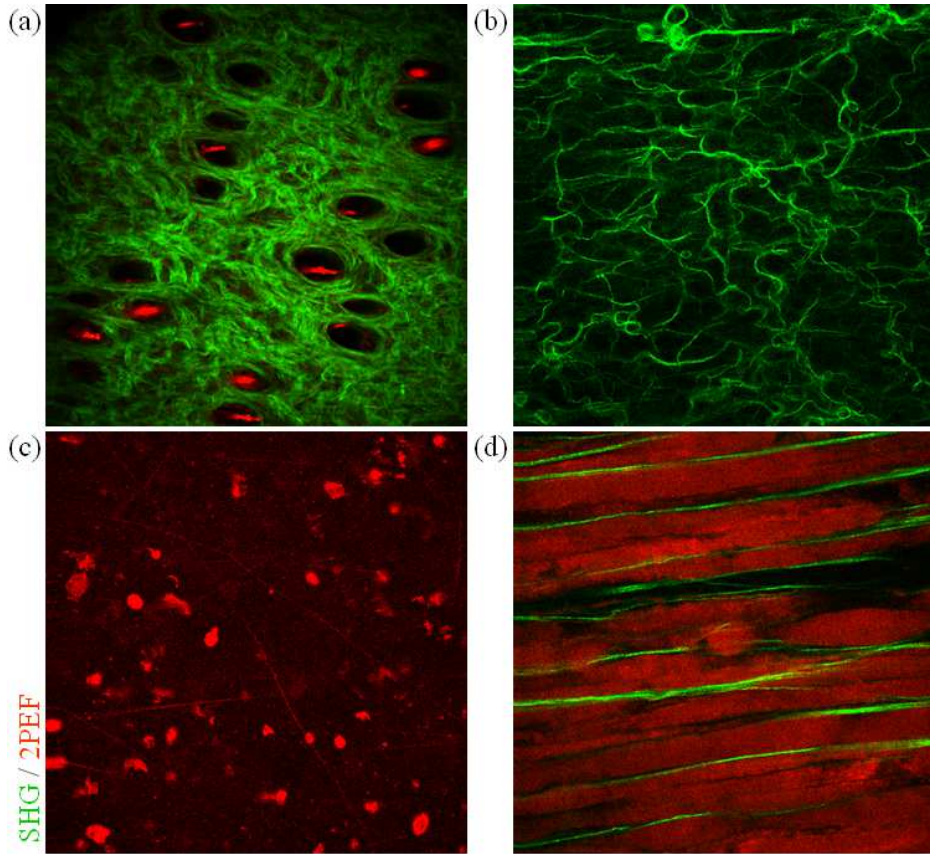


FIGURE V.5 – Images des dermes papillaire et réticulaire : (a) *Derme papillaire d'une souris K14-COL5A1 à $20\text{ }\mu\text{m}$ de profondeur. Champ de vue : $480 \times 480\text{ }\mu\text{m}^2$. La 2PEF (en rouge) montre des débris d'épiderme en surface et la kératine des poils restant après l'épilation.* (b) et (c) *Derme réticulaire d'une souris pN à $166\text{ }\mu\text{m}$ de profondeur. La 2PEF montre des cellules et des fibres d'élastine.* (d) *Derme réticulaire d'une souris pN à $274\text{ }\mu\text{m}$ de profondeur. Champ de vue : $300 \times 300\text{ }\mu\text{m}^2$. Dans les deux cas la SHG (en vert) dénote la présence de collagène fibrillaire, et il est patent que la structure du réseau diffère en fonction de la profondeur dans le derme.*

V.2. Dispositif expérimental

En pratique la durée totale d'une expérience est d'environ 3h, durant lesquelles l'échantillon reste hydraté grâce au liquide d'immersion. Ceci permet de considérer, raisonnablement, le tissu comme *ex vivo* pendant toute la longueur de l'expérience. L'imagerie est en générale faite sur le derme papillaire mais nous avons fait quelques essais sur le derme réticulaire qui présente une structure plus complexe (figure V.5).

Des piles d'images sont ainsi obtenues séquentiellement, à chaque pas de déformation (figure V.6), où le réseau de collagène apparaît très distinctement sur le canal SHG (vert). On voit de plus des "trous" dans le tissu correspondant aux follicules pileux. Sur le canal de 2PEF (rouge) on voit la kératine des follicules pileux (figure V.5.a) ainsi que les cytoplasmes cellulaires, en particulier les restes d'épiderme pouvant subsister à la surface du derme. A noter que dans le derme papillaire on voit très peu de fibroblastes ou d'élastine (visible en 2PEF), contrairement au derme réticulaire (figure V.5.c).

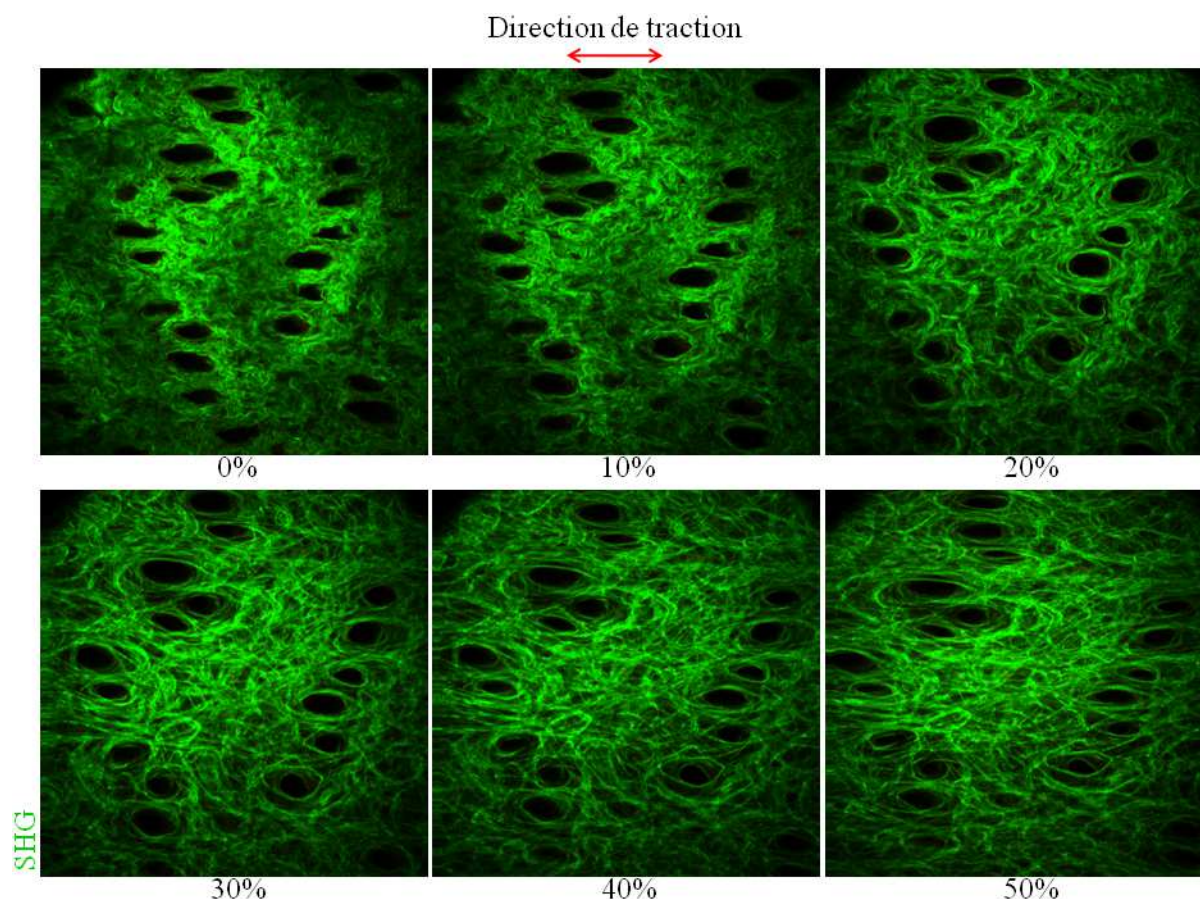


FIGURE V.6 – Images SHG à différents pas de déformation : *Imagerie du derme papillaire d'une peau de souris K14-COL5A1 à 20 μm de profondeur. La légende indique l'élongation relative à chaque palier. Champ de vue : $480 \times 480 \mu\text{m}^2$.*

En comparant les images de 0% à 50% de déformation (figure V.6), on voit que le tissu se réorganise au fur et à mesure de la traction. Dans l'idée d'étudier cette réorganisation locale en fonction de la contrainte mécanique appliquée, nous avons développé une analyse d'images spécifique permettant d'investiguer la microstructure du tissu.

V.3 Analyse des images

Le but de l'analyse d'image développée ci-après est de corrélérer la déformation macroscopique appliquée à la déformation microscopique, mesurée dans l'échantillon directement durant la traction, et de quantifier le degré de réorganisation du réseau collagénique pour objectiver les différences entre les réponses mécaniques des échantillons de souris sauvages et génétiquement modifiées. Cette analyse requiert le suivi de la déformation du tissu ainsi que la quantification de l'orientation des fibrilles de collagène. Pour cela différentes étapes sont nécessaires :

1. Tout d'abord les images sont rognées pour définir une ROI commune à tous les pas de déformation. En particulier, l'observation du même réseau de follicules à différents degrés de déformation du tissu est cruciale pour l'analyse d'image décrite ci-après. En outre on sélectionne, à chaque pas de déformation, une unique image de la pile, correspondant approximativement à la même section de l'échantillon
2. Dans un second temps, on mesure la déformation mécanique locale, en se basant sur l'analyse du réseau de follicule pileux visible sur les images SHG, pour la corrélérer à l'allongement relatif de l'échantillon
3. Enfin, on mesure l'orientation des fibrilles de collagènes pixel par pixel pour obtenir une carte des orientations et définir des paramètres quantitatifs (index d'orientation et entropie) caractérisant le degré d'organisation du tissu à chaque palier de déformation. Ces paramètres sont alors moyennés sur $10\ \mu m$ d'épaisseur (*i.e.* 6 images) correspondant à la densité maximale de signal dans la pile d'images.

L'intégralité de cette analyse d'image est effectuée par un programme Matlab implémenté spécifiquement pour ce projet, à l'exception de l'algorithme d'analyse des orientations qui a été développé par Petr Dokladal et Etienne Decencière (CMM) et intégré ensuite au programme principal.

V.3.1 Déformation des follicules pileux

La première analyse consiste à mesurer la déformation mécanique locale. En effet, si l'échantillon glisse entre les mors, même légèrement, la valeur de l'allongement relatif calculé précédemment est faussée et il n'est pas pertinent de la relier à la réorganisation du réseau collagénique. De plus, les milieux biologiques étant intrinsèquement hétérogènes, la déformation appliquée pourrait ne pas être transmise de manière homogène. Pour cela, les méthodes usuelles consistent à utiliser un mouchetis ou une grille marquant la surface de l'échantillon dont on va pouvoir suivre la déformation. Alternativement on peut déposer des billes fluorescentes à la surface de l'échantillon et les imager lors de la traction, pour mesurer le tenseur de déformation [225]. Dans notre cas, la présence des follicules pileux bien visibles, sous forme de trous⁷, sur les images SHG (figure V.6) nous a permis de directement travailler sur ce réseau de points. Cette méthode présente l'avantage d'être non-invasive puisqu'aucun marquage n'est nécessaire. Différentes étapes de traitement d'images sont nécessaires pour segmenter ces objets sur les images SHG puis mesurer leur déformation, à la fois à partir de la forme de chaque follicule et de l'évolution de leur réseau.

7. Le signal 2PEF à l'intérieur des follicules (figure V.5.a) est dû à la kératine résiduelle après épilation.

V.3. Analyse des images

V.3.1.1 Segmentation des follicules

Les images brutes (figure V.7.a) sont d'abord filtrées par un filtre médian (2 pixels de rayon) pour s'affranchir de la majeure partie du bruit de fond poivre et sel et lisser les fibrilles sans modifier significativement les images (figure V.7.b). Le contraste est ensuite inversé ce qui fait apparaître le collagène en noir et les follicules en blanc (figure V.7.c). On utilise ensuite une ouverture circulaire (cf. annexe D) sur l'image, permettant d'affiner le filtrage des images tout en préservant les contours des follicules (figure V.7.d). Finalement l'image est segmentée (figure V.7.e) en seuillant "brutalement" tous les pixels en dessous de 250 (0 en dessous et 1 au-dessus)⁸. Cette étape fait apparaître distinctement le réseau de follicules ce qui permet d'utiliser une détection de forme sur l'image (figure V.7.f). On obtient ainsi pour chaque follicule un jeu de paramètres structuraux tels que l'aire, le centre de masse, les grand (a) et petit (b) axes de l'ellipse équivalente ainsi que leurs orientations.

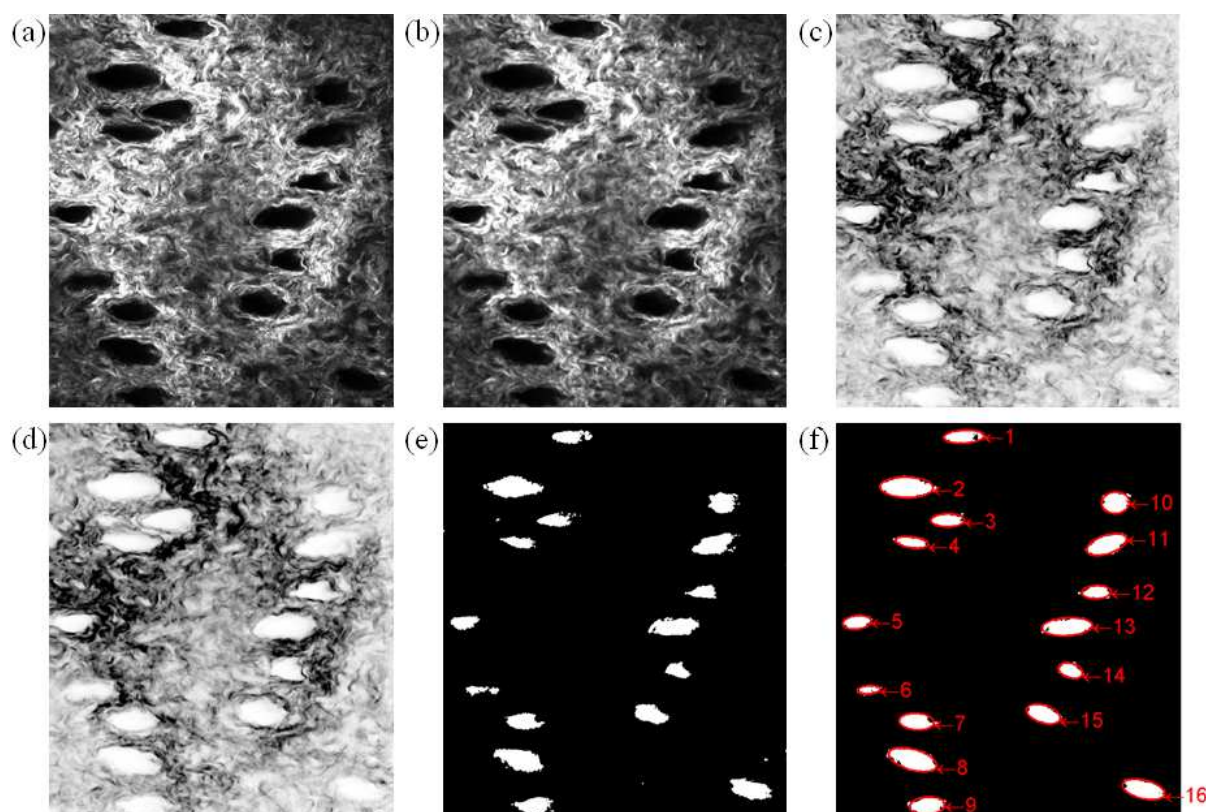


FIGURE V.7 – Segmentation des follicules pileux : (a) Image initiale, (b) Filtrage médian (2 pixels de rayon), (c) Inversion du contraste, (d) Résultat de l'ouverture circulaire (élément structurant circulaire de 2 pixels de rayon), (e) Seuillage de l'image (valeur de seuil : 250) et (f) Détection des composantes connexes dans l'image. Taille de la ROI : $324,5 \times 371,0 \mu m^2$.

8. La valeur du seuil est choisie empiriquement et peut, en tout état de cause, varier légèrement d'un échantillon à un autre selon le niveau de signal.

Les follicules détectés sont alors re-numérotés en fonction de la position de leur centre de masse, dans le but de pouvoir suivre leur évolution à chaque palier de déformation. On numérote préférentiellement les follicules suivant leur position selon l'axe X (direction de traction) puisque l'éloignement résultant de la traction limite le nombre d'inversion possible. Toutefois, pour des follicules trop proches⁹ sur l'axe horizontal, on re-numérote en fonction de la position selon Y. On obtient ainsi une carte du réseau de follicules avec le même index par follicule à chaque pas de déformation (figure V.8).

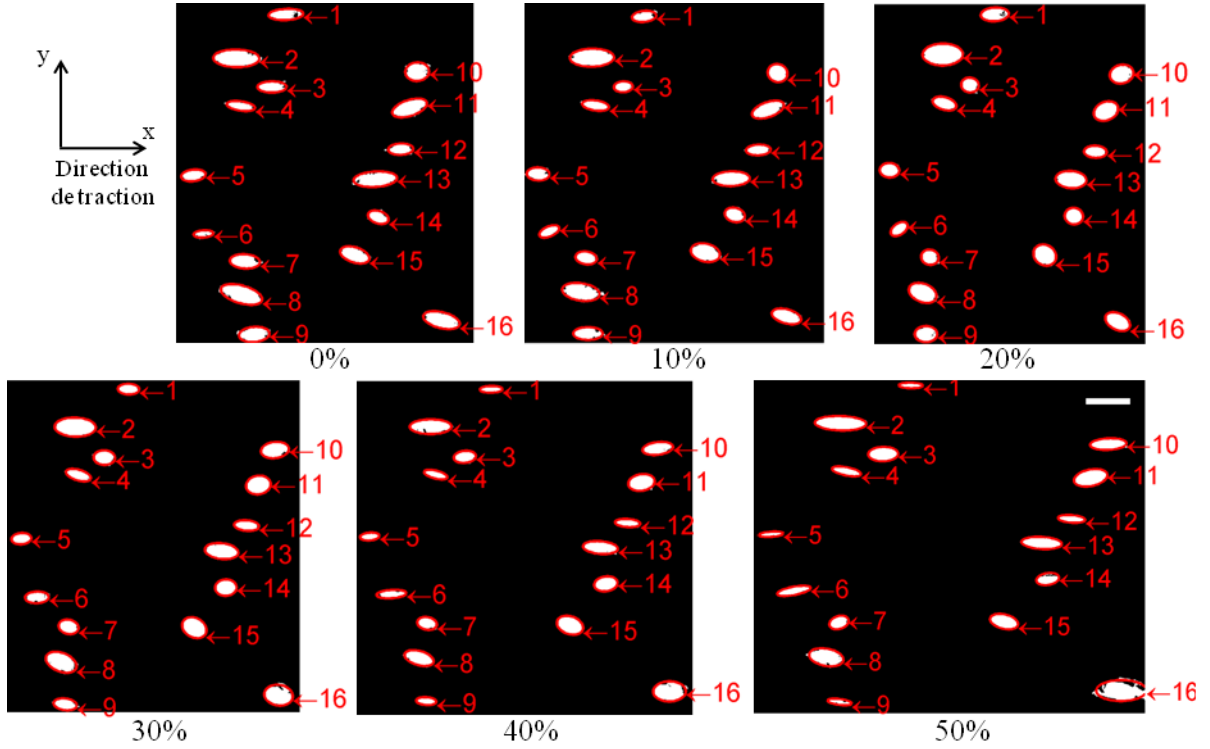


FIGURE V.8 – Images segmentées des follicules pileux : *Palier de déformation pour un échantillon de peau de souris K14-COL5A1. Barre d'échelle : 50 µm.*

V.3.1.2 Déformation des follicules

Pour chaque follicule l'ensemble des paramètres obtenus par la détection de forme (figure V.9.a) permet de calculer l'orientation du grand axe de l'ellipse (θ) ainsi que l'ellipticité ϵ du follicule (figure V.9.b) :

$$\epsilon = 1 - \frac{b}{a} \quad (\text{V.1})$$

et ce à chaque pas de déformation.

En moyennant¹⁰ θ et ϵ sur l'ensemble des follicules de l'image on obtient une première

9. Typiquement $\Delta x \leq 15$ pixels.

10. Dans le cas de θ il s'agit d'une moyenne circulaire. En pratique, l'écart entre les angles extrêmes de la distribution ($\theta_{max} - \theta_{min}$) n'excédant pas 90° les moyennes arithmétique et circulaire coïncident.

V.3. Analyse des images

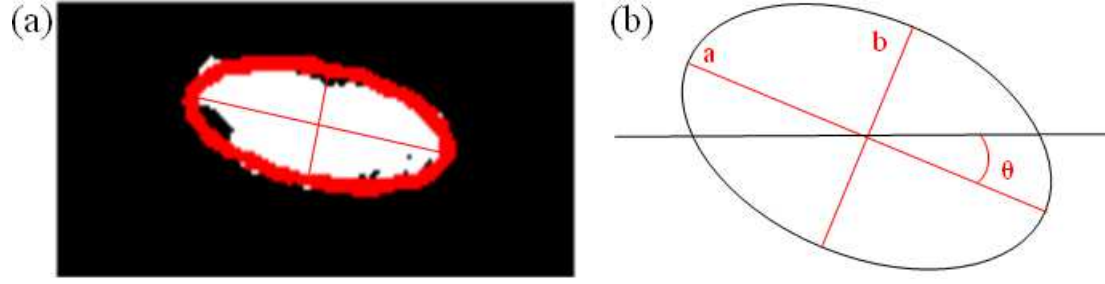


FIGURE V.9 – Déformation des follicules : (a) *Détection de forme et ajustement elliptique* et (b) *Petit et grand axes permettant de calculer l'orientation (θ) et l'ellipticité ($\epsilon = 1 - b/a$) du follicule considéré.*

information sur le niveau de déformation des follicules dans le champ de vue et sur la réponse locale de l'échantillon à la contrainte appliquée (figure V.10).

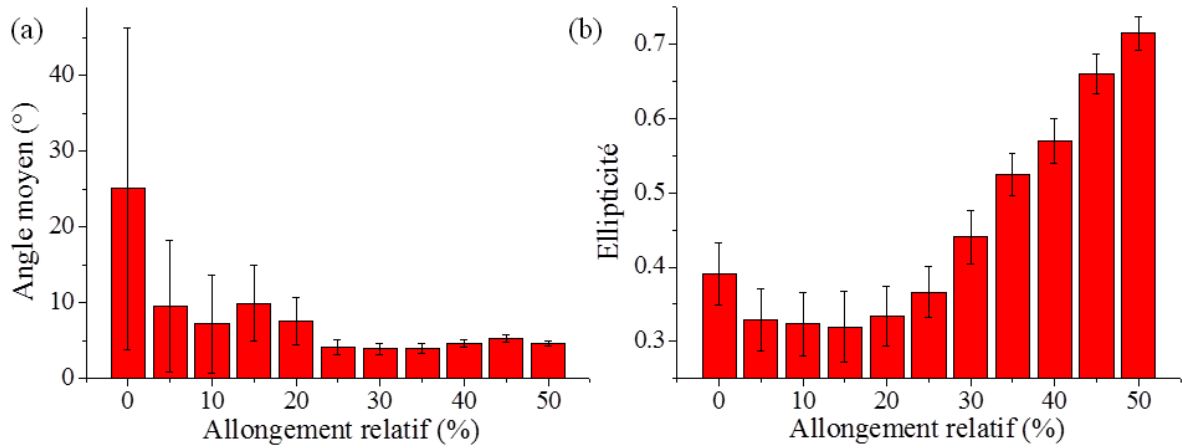


FIGURE V.10 – Déformation moyenne des follicules pileux : *Évolution (a) de l'orientation et (b) de l'ellipticité moyenne des follicules en fonction de l'allongement relatif pour un échantillon de peau de souris K14-COL5A1. Les incertitudes correspondent à l'écart-type de la distribution des follicules à chaque pas de déformation. La traction se fait dans la direction 0° .*

V.3.1.3 Tenseur de déformation

Pour corréler plus précisément les déformations locale et globale on va maintenant s'intéresser au tenseur des déformations du réseau de follicules.

Définition - Dans le cadre d'une étude en deux dimensions suivant les directions (Ox) et (Oy), le champ de déplacement en chaque point est défini par deux composantes :

$$\mathbf{u}(x, y) = \begin{pmatrix} u_x(x, y) \\ u_y(x, y) \end{pmatrix} \quad (\text{V.2})$$

Sous l'action d'une contrainte mécanique, un corps subit une transformation géométrique décrivant le changement entre l'état initial (u_i), avant l'application de la contrainte, et l'état final (u_f), consécutif à son application :

$$u_f = \mathbf{D} : u_i \quad (\text{V.3})$$

où $\mathbf{D}$ est le tenseur des déformations. La transformation entre ces deux états se décompose en 3 termes : une translation, une rotation et une déformation pure. Dans toute la suite nous nous intéresserons uniquement à ce 3^e terme pour décrire l'évolution mécanique du tissu.

Dans le cas général, le tenseur de déformation pure (ϵ) est la partie symétrique de $\mathbf{D}$, et décrit l'état de déformation locale résultant de contraintes appliquées.

$$\epsilon = \frac{1}{2} (\mathbf{D} + \mathbf{D}^T) \quad (\text{V.4})$$

Le tenseur de déformation pure (ϵ) est défini en tout point d'un solide, et donne accès au champ de déformation [226]. Dans notre cas, au vu de la géométrie du dispositif de traction, la déformation est calculée dans chaque plan (Oxy), ce qui fait que le tenseur obtenu est une matrice 2×2 , s'écrivant sous la forme :

$$\epsilon = \begin{pmatrix} \epsilon_{xx} & \epsilon_{yx} \\ \epsilon_{xy} & \epsilon_{yy} \end{pmatrix} \quad (\text{V.5})$$

Les termes diagonaux décrivent la déformation surfacique correspondant à une modification des dimensions d'un élément de surface par dilatation ou compression (figure V.11). Ces variations de longueur se mesurent par des variations linéiques relatives (allongement relatif) selon la direction considérée (ϵ_{xx} et ϵ_{yy} suivant les directions (Ox) et (Oy), respectivement)¹¹.

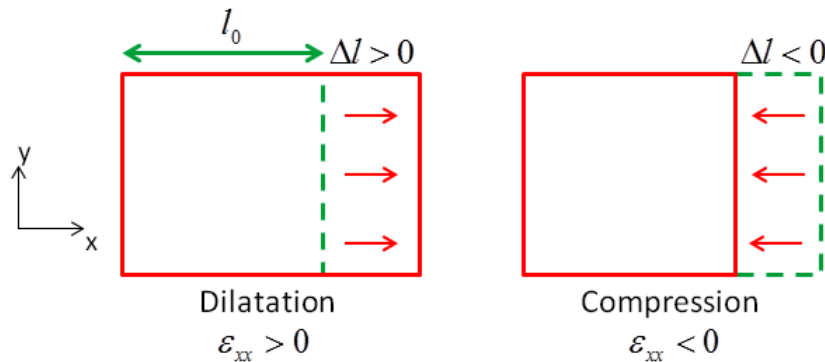


FIGURE V.11 – Termes diagonaux du tenseur des déformations : Ceux-ci indiquent l'allongement relatif (dilatation ou compression) dans la direction considérée.

11. Dans le cas 1D la déformation selon (Ox) s'exprime comme l'allongement relatif $\epsilon_{xx} = \frac{\Delta l}{l_0}$ avec Δl la variation de longueur de l'échantillon imposée par la traction et l_0 sa longueur initiale.

V.3. Analyse des images

Dans l'approximation des petites déformations¹² ces termes s'expriment sous la forme :

$$\varepsilon_{xx} = \frac{\partial u_x}{\partial x} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_x}{\partial x} + \frac{\partial u_x}{\partial x} \right) \quad (\text{V.6})$$

Les termes antidiagonaux décrivent quant à eux le cisaillement qui modifie les angles définis par les arrêtes des éléments de surface (figure V.12). Le tenseur étant symétrique on a directement $\varepsilon_{yx} = \varepsilon_{xy} = \frac{l_y}{l_x} = \gamma$. Toujours dans le cadre de l'approximation des petites déformations :

$$\varepsilon_{xy} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_x}{\partial y} + \frac{\partial u_y}{\partial x} \right) \quad (\text{V.7})$$

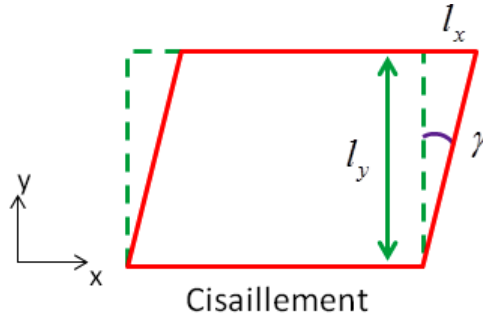


FIGURE V.12 – Termes anti-diagonaux du tenseur des déformations :
Ceux-ci indiquent le cisaillement de l'échantillon.

Par soucis de lisibilité, dans toute la suite de ce chapitre nous utiliserons le terme de tenseur de déformation pour parler du tenseur ε .

Cartes des déformations - En considérant l'ensemble du réseau de follicules de la ROI soigneusement choisie, on peut calculer, à chaque palier, le tenseur de déformation entre l'état initial (0%) et l'état final (le palier considéré). Pour cela, on découpe l'image initiale en triangles dont chaque sommet coïncide avec un follicule (triangulation de Delaunay). Puis, pour un palier donné, on calcule les trois composantes de déformation ($\varepsilon_{xx}, \varepsilon_{yy}, \varepsilon_{xy}$), associées à chaque triangle. Chacune des composantes (ε_{ij}) donne alors une carte des déformations où les sommets indiquent la position initiale (0%) des follicules et où la valeur ε_{ij} est codée en couleur. Ainsi, à chaque palier de déformation est associé un triplet de cartes des déformations, donnant l'allongement relatif selon x, selon y et le cisaillement (figure V.13.b,c et d respectivement).

12. A noter que dans notre cas, la rupture se faisant vers 50% d'allongement relatif, cette approximation devient rapidement incorrecte. Toutefois ces expressions restent exactes dans le cas plus général d'une réponse homogène.

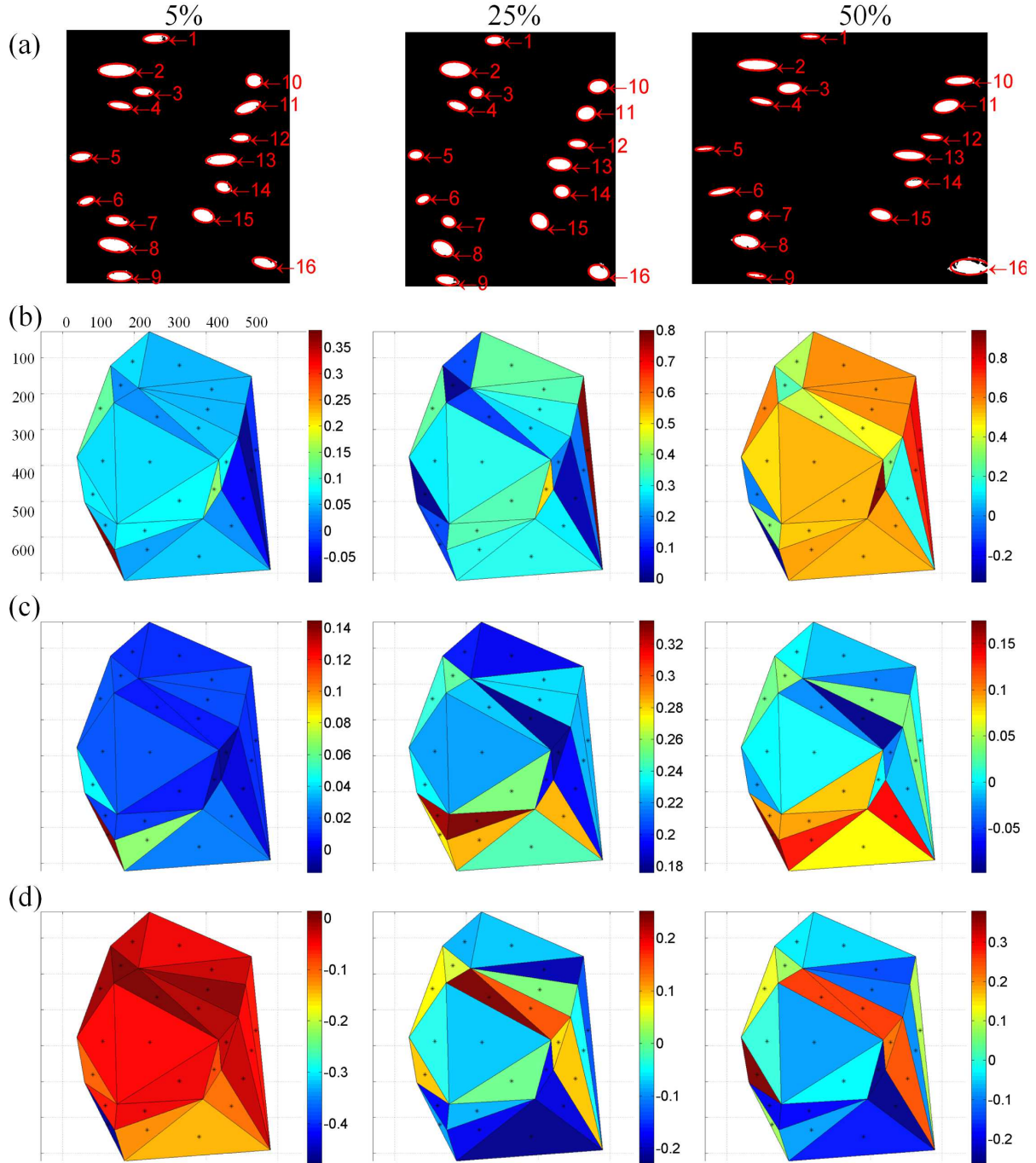


FIGURE V.13 – Carte du tenseur de déformation : (a) Images segmentées des follicules, et (b), (c) et (d) Cartes des déformations des composantes ϵ_{xx} , ϵ_{yy} et ϵ_{xy} respectivement. Le code couleur donne la valeur de la déformation ϵ_{ij} pour chaque triangle. Échantillon de peau de souris K14-COL5A1.

V.3. Analyse des images

Finalement la moyenne sur l'ensemble de l'image (*i.e.* l'ensemble des déformations des triangles) donne la valeur moyenne de la déformation locale du tissu à chaque palier (figure V.14).

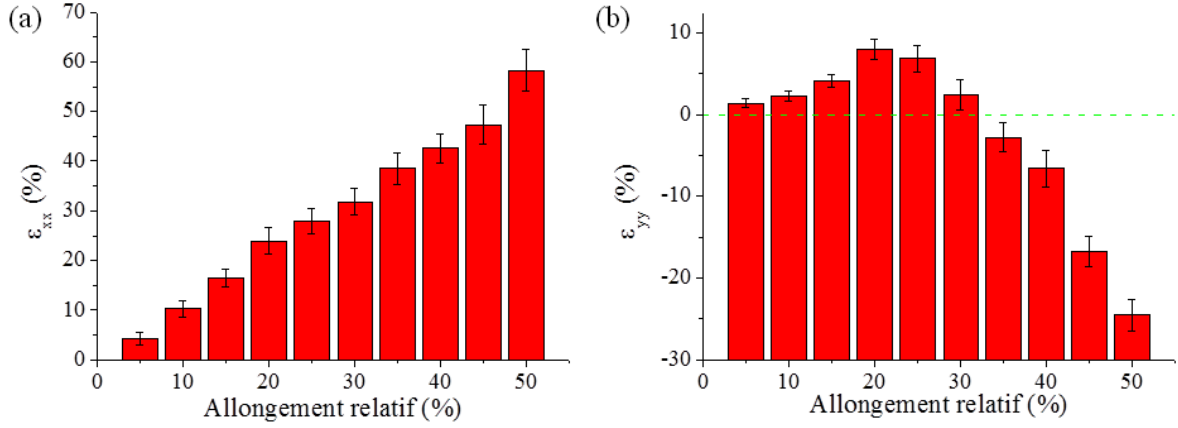


FIGURE V.14 – Déformation des follicules pileux : (a) *Allongement relatif selon l'axe de traction (ϵ_{xx})* et (b) *Contraction selon l'axe orthogonal à la direction de traction (ϵ_{yy})*. Échantillon de peau de souris K14-COL5A1.

V.3.2 Orientation des fibrilles de collagène

L'autre information intéressante que l'on peut obtenir de ces images est l'orientation des fibrilles de collagène et leur réorganisation au cours de la déformation du tissu. Pour obtenir l'orientation des fibrilles de collagène nous avons utilisé un algorithme développé par le Centre de Morphologie Mathématiques (CMM, MINES ParisTech) de Fontainebleau. Il est basé sur une ouverture linéaire permettant de reconstruire les fibrilles dans une direction donnée. Si l'on fait tourner l'élément structurant, on reconstruit tour à tour chaque orientation. En prenant le maximum du résultat de l'ouverture pour l'ensemble des angles de l'élément structurant on détermine l'orientation locale du collagène, pixel par pixel.

À noter que l'analyse d'orientation décrite ici ne se restreint pas à cette application spécifique sur la déformation des peaux de souris, mais permet *a priori* de quantifier le degré d'organisation de n'importe quel tissu collagénique, voire d'étudier le degré de pathologie d'un tissu. En effet la structure du collagène étant étroitement liée à la biomécanique des tissus, nombre de pathologies affectant la réponse fonctionnelle mécanique des tissus sont reliées à un défaut de structuration du collagène. Par exemple, cette méthode a aussi été appliquée sur des coupes minces de col utérin, lors d'une étude annexe faite en collaboration avec le Laboratoire de Physique des Interfaces et Couches Minces (LPICM, Ecole Polytechnique), le but étant alors de caractériser, par des paramètres d'orientation, le remodelage du tissu lors de cancer du col de l'utérus.

V.3.2.1 Ouverture linéaire

Les images sont d'abord pré-filtrées en utilisant un filtre moyennneur (à partir d'une matrice de convolution 3×3 sous la forme $M = 1/9.I$). Cette étape permet de s'affranchir

de la majeure partie du bruit de fond sur les images. Les zones de bruit pouvant être exaltées par le filtre moyen seront ensuite supprimées par l'ouverture linéaire.

Une ouverture linéaire (cf. annexe D) est la succession d'une érosion et d'une dilatation morphologique par une droite (élément structurant). Cet opérateur permet notamment de rehausser des structures alignées avec l'élément structurant en éliminant le bruit et en reconstruisant efficacement les contours de l'objet observé (figure V.15).

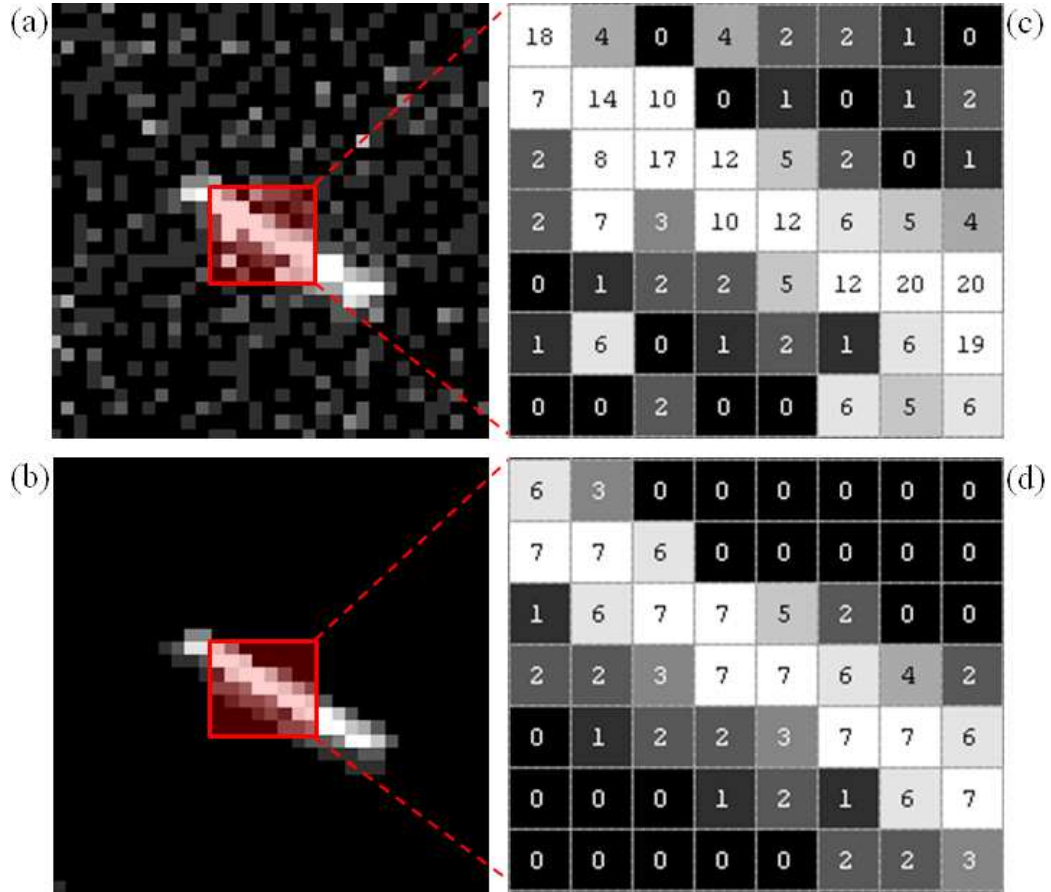


FIGURE V.15 – Ouverture linéaire :(a) Image brute d'une fibrille de collagène et (b) Images lissées après l'ouverture linéaire (taille de la ROI : $7,92 \times 7,92 \mu m^2$). (c) et (d) Zoom sur la fibrille et valeurs des pixels en niveaux de gris (taille de la ROI : $1,92 \times 1,68 \mu m^2$).

On voit ainsi que l'ouverture permet de lisser l'image tout en rehaussant visiblement les structures fibrillaires que l'on cherche à détecter dans l'image.

V.3.2.2 Rotation de l'élément structurant

L'orientation de l'élément structurant utilisé est alors cruciale pour le lissage des structures dans l'image. Ainsi, une fibrille dans la direction de l'élément structurant sera efficacement reconstruite par l'ouverture morphologique alors qu'une fibrille orthogonale à l'élément structurant peut être totalement effacée (figure V.16).

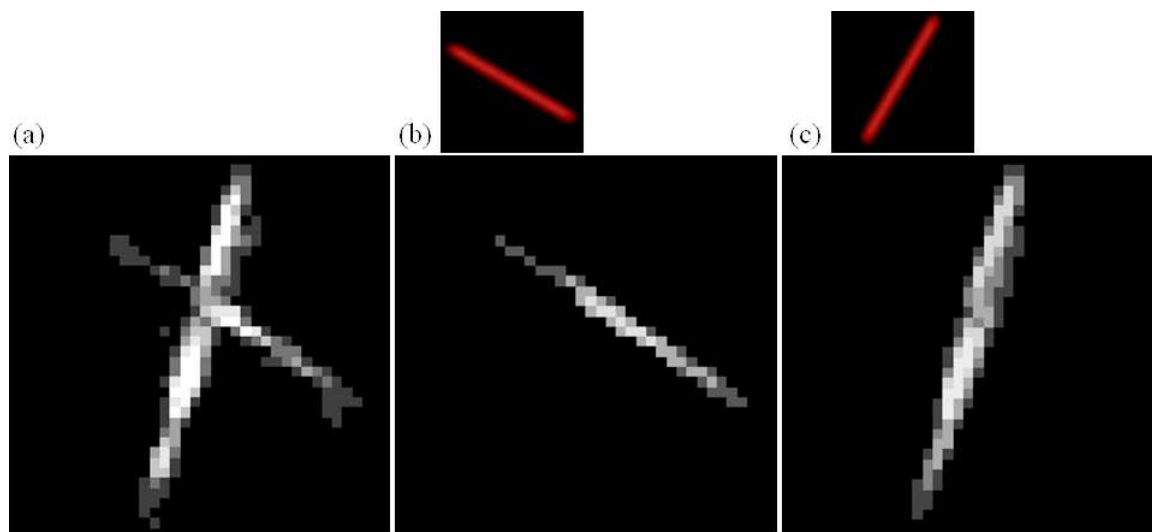


FIGURE V.16 – Ouverture linéaire pour deux orientations d’élément structurant : (a) Image brute où deux fibrilles de collagène se croisent, (b) et (c) Ouverture linéaire avec un élément structurant orienté à -33° et 75° respectivement. Taille de la ROI : $9,12 \times 9,12 \mu\text{m}^2$.

L’analyse de l’orientation développée par le CMM est fondée sur cette propriété. En faisant tourner l’élément structurant il est alors possible de reconstruire successivement toutes les orientations dans l’image. A partir d’une image de l’échantillon on crée une série d’images, chacune correspondant à l’ouverture linéaire pour un angle donné. Il reste alors à synthétiser l’ensemble de ces images en ne conservant, pour chaque angle de l’élément structurant que les fibrilles qui sont bien reconstruites. Pour se faire, comme le rehaussement des fibrilles est d’autant plus efficace que l’élément structurant est aligné avec la fibrille, on prend, en chaque pixel, le maximum des valeurs prises pour chaque orientation (figure V.19). La valeur d’angle réalisant ce maximum correspond à la direction de l’élément structurant reconstruisant le mieux l’orientation locale, c’est-à-dire l’angle de la fibrille.

V.3.2.3 Orientation locale

L’orientation étant ainsi obtenue pixel par pixel, on peut mesurer l’histogramme des orientations donnant accès à la distribution angulaire du collagène dans l’échantillon. Pour ce faire, l’algorithme a d’abord été calibré sur une mire, dans le but de valider l’analyse d’orientation et d’en observer les limites (figure V.17). A noter que les histogrammes présentent un fond continu non nul (figure V.17.d). Ceci est dû au fait qu’ici la taille de l’élément structurant utilisé est adaptée pour traiter les images de peau de souris. Dans ce cas au centre de la mire les rayons ne sont pas résolus et l’algorithme détecte des orientations erronées. En pratique pour les images des tissus cela indique que de petites structures, et notamment des agglomérats de fibrilles peuvent induire un biais dans nos mesures. Cependant l’usage d’un élément structurant plus petit limite la précision angulaire accessible, c’est pourquoi sa longueur (21 pixels dans notre cas) a été optimisé pour permettre un compromis entre résolution angulaire et qualité du lissage.

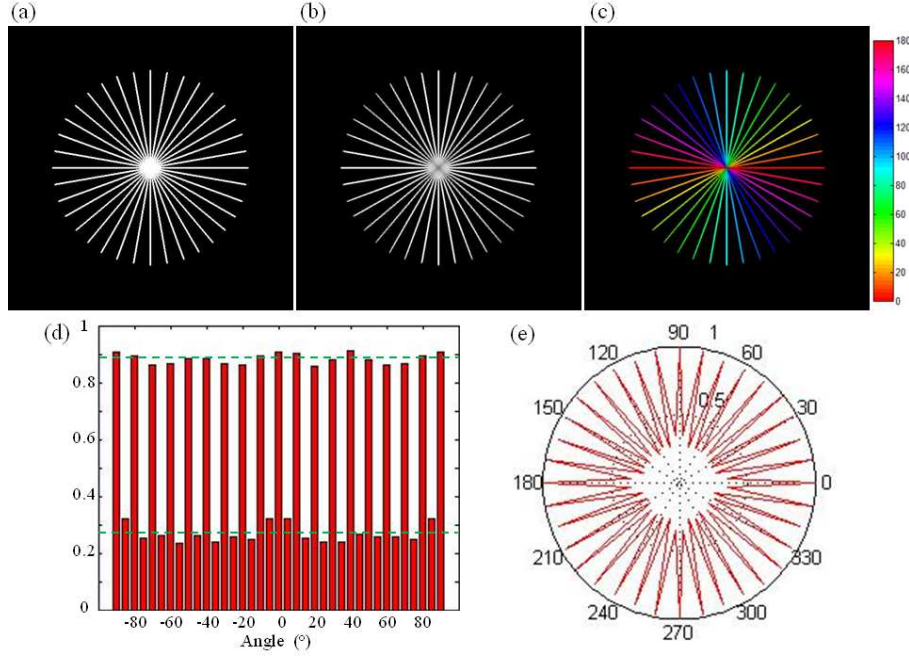


FIGURE V.17 – Détection de l’orientation locale sur une mire : (a) Image d’une mire, (b) Rehaussement des orientations par ouverture linéaire tournante, (c) Carte des orientations, (d) et (e) Histogrammes des orientations en barres et en polaires.

En partant de l’image initiale et en effectuant une ouverture linéaire selon un élément structurant tournant, on obtient alors une image présentant les structures fibrillaires rehaussées et une carte des orientations pixel par pixel (figure V.19.c et d). Enfin, en observant la distribution des orientations locales (par pixel) sur l’ensemble de la ROI on en déduit l’histogramme normalisé des orientations (figure V.18) dans le champ de vue.

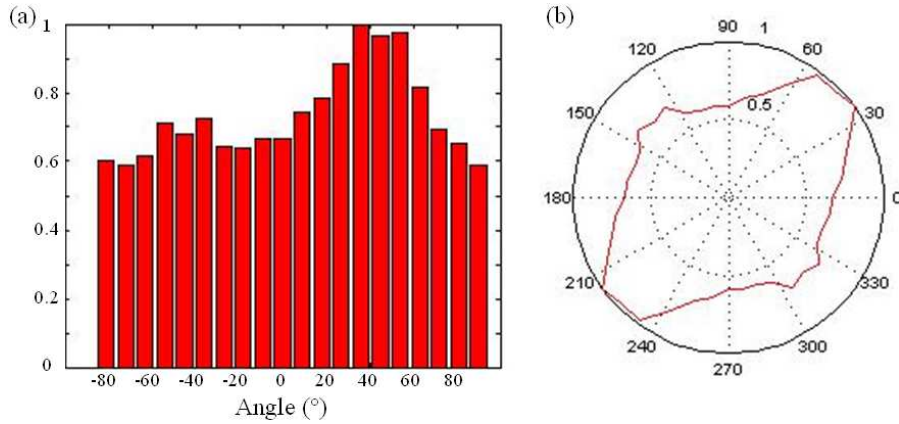


FIGURE V.18 – Histogrammes des orientations : Diagrammes (a) en barre et (b) en polaire, pour un échantillon de peau de souris K14-COL5A1. La distribution est normalisée par sa valeur maximale.

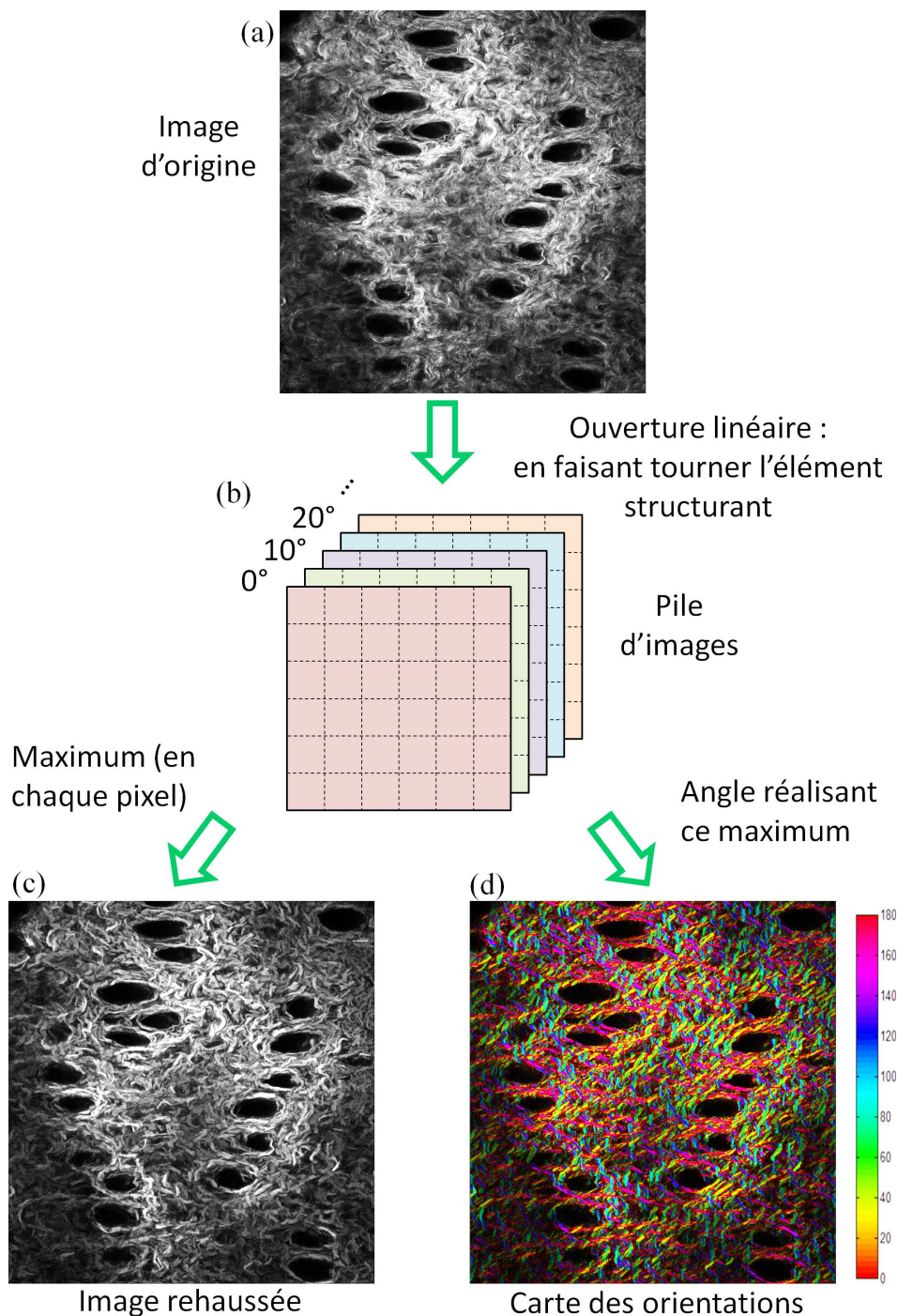


FIGURE V.19 – Orientation de fibrilles de collagène : (a) Image initiale, (b) Formation d'une pile d'images, chacune correspondant à une orientation de l'élément structurant. On calcule ensuite, pour chaque pixel, sa valeur maximale dans la pile précédente et l'angle de l'élément structurant réalisant ce maximum. (c) Image rehaussée des fibrilles, obtenue à partir du maximum en chaque pixel et (d) Carte d'orientation obtenue à partir de l'angle réalisant ce maximum. L'orientation en chaque pixel est donnée par le code couleur. Échantillon de peau de souris K14-COL5A1.

V.3.2.4 Index d'orientation et entropie

Les cartes d'orientations permettent de calculer la fréquence d'occurrence normalisé ($I(\theta)$) de l'angle θ pixel par pixel, et d'obtenir l'orientation principale dans le champ de vue (θ_m). A partir des cartes d'orientations on définit deux autres paramètres permettant de quantifier le degré d'organisation du collagène. Le premier, l'index d'organisation (OI), indique la fraction de fibrilles parallèles à la direction considérée :

$$OI(\theta) = \left[2 \left(\frac{\int_{-90^\circ}^{90^\circ} I(x) \cos^2(x - \theta) dx}{\int_{-90^\circ}^{90^\circ} I(x) dx} \right) - 1 \right] .100 \quad (V.8)$$

Dans le cas d'une distribution isotrope de fibrilles, $OI(\theta) = 0$, $\forall \theta$. Dans le cas où toutes les fibrilles sont orientées selon la direction α :

$$OI(\theta) = (2\cos^2(\alpha - \theta) - 1) .100 \quad (V.9)$$

En particulier $OI(\alpha) = 100\%$ et $OI(\alpha + 90^\circ) = -100\%$. Dans toute la suite on calculera l'index d'orientation maximal ($OI(\theta_m)$) qui permet d'avoir accès à une information sur le degré d'alignement dans la direction majoritaire. A noter que l'on ne considère pas dans ce cas l'existence potentielle d'autres directions significatives. C'est pourquoi on définit aussi l'entropie statistique (S), qui permet de déterminer le degré d'organisation des fibrilles :

$$S = - \sum_{\theta=-90^\circ}^{90^\circ} p(\theta) \ln [p(\theta)] \quad (V.10)$$

où

$$p(\theta) = \frac{I(\theta)}{\sum_{\theta=-90^\circ}^{90^\circ} I(\theta)} \quad (V.11)$$

est la probabilité pour une fibrille de se trouver dans la direction θ . Bien que plus difficile à interpréter, l'entropie présente l'avantage de ne pas favoriser de direction. Ainsi un échantillon présentant deux orientations majoritaires sera plus organisé, et aura donc une entropie plus basse, qu'un échantillon isotrope.

V.4 Résultats et discussion

Maintenant que nous avons mis en place et caractérisé les outils utilisés, nous allons étudier la réponse mécanique du tissu à une traction contrôlée ainsi que la réorganisation du collagène concomitante, dans le cas de peaux de souris sauvages et modèles pour l'EDS.

V.4.1 Déformation du tissu

V.4.1.1 Réorganisation des follicules

L'analyse de la déformation du réseau folliculaire (figure V.10) montre que la réorganisation semble se faire en deux phases. Dans un premier temps, l'angle moyen tend vers

V.4. Résultats et discussion

4° (dans ce cas) et l'écart-type de la distribution décroît drastiquement, ce qui montre que les follicules tendent à s'aligner progressivement dans la direction de traction. Dans un second temps, une fois les follicules alignés, l'ellipticité moyenne des follicules croît indiquant, en parallèle de leur réorientation, un allongement des follicules pileux qui deviennent de plus en plus elliptiques au fur et à mesure que le tissu se déforme. En outre, la légère diminution de l'ellipticité jusqu'à 15% semble indiquer que les follicules se recircularisent avant de s'étirer dans la direction de traction.

V.4.1.2 Déformation locale

En parallèle, l'étude des cartes de déformation (figure V.13) montre que la déformation selon l'axe de traction (ε_{xx}) croît linéairement avec l'allongement relatif (d) imposé par la machine, tandis que la composante (ε_{yy}) décroît, indiquant, comme attendu, une contraction du tissu selon l'axe (Oy). Il est alors possible de relier ces deux déformations en effectuant un ajustement linéaire (figure V.20) de ε_{ii} sous la forme :

$$\varepsilon_{ii}(d) = A_{ii} \cdot d + \varepsilon_{ii,0} \quad (\text{V.12})$$

et ce pour chaque échantillon (table V.2). Ainsi, on voit apparaître le lien entre les déformations micro- et macroscopiques puisque $\varepsilon_{xx}(d)$ représente la déformation locale, calculée sur l'image, et d la déformation globale, appliquée à l'échantillon.

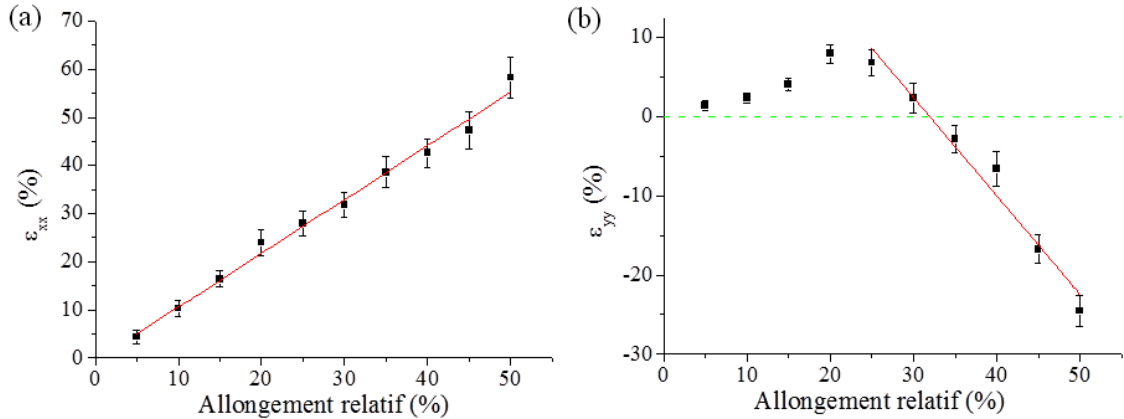


FIGURE V.20 – Moyenne de la déformation locale : Ajustement linéaire des composantes (a) ε_{xx} et (b) ε_{yy} du tenseur de déformation en fonction de la déformation appliquée, pour un échantillon de peau de souris K14-COL5A1.

Tout d'abord la valeur de déformation initiale dans la direction de traction $\varepsilon_{xx,0} \approx 0$ indique qu'il n'y a pas de dépliement de l'échantillon en début de traction ce qui valide notre choix du zéro de déformation. De plus, pour ε_{xx} , on obtient un coefficient directeur $A_{xx} \approx 1$ indiquant que l'échantillon ne glisse pas entre les mors et donc que la force appliquée est intégralement transmise à l'échantillon. Enfin ce coefficient directeur unitaire montre que la réponse du tissu est homogène à l'échelle locale, tant pour les souris sauvages que pour les mutantes (pN et K14-COL5A1), en accord avec les cartes de déformations (figure V.13) qui donnent des valeurs relativement constantes.

Type	Souris	ε_{xx}			ε_{yy}		
		$\varepsilon_{xx,0}$	A_{xx}	R^2	$\varepsilon_{yy,0}$	A_{yy}	R^2
Sauvage	92-	$0 \pm 0,01$	$1,0 \pm 0,1$	0,89	$0,46 \pm 0,03$	$-1,46 \pm 0,07$	0,99
	93-	$-0,11 \pm 0,02$	$0,78 \pm 0,06$	0,94	$0,06 \pm 0,02$	$-0,9 \pm 0,06$	0,96
	WT5	$-0,025 \pm 0,008$	$1,04 \pm 0,03$	0,99	$0,42 \pm 0,03$	$-0,97 \pm 0,08$	0,97
	WT6	$-0,09 \pm 0,01$	$0,89 \pm 0,04$	0,98	$0,39 \pm 0,09$	$-0,9 \pm 0,3$	0,75
	21-	$-0,03 \pm 0,01$	$1,17 \pm 0,04$	0,99	$0,54 \pm 0,04$	$-1,8 \pm 0,1$	0,98
	22-	$-0,015 \pm 0,004$	$1,11 \pm 0,02$	0,99	$0,32 \pm 0,01$	$-1,33 \pm 0,05$	0,99
	25-	$0,023 \pm 0,008$	$0,9 \pm 0,02$	0,99	$0,48 \pm 0,03$	$-0,92 \pm 0,07$	0,96
	26-	$0 \pm 0,02$	$0,7 \pm 0,1$	0,88	$0,22 \pm 0,02$	$-1,6 \pm 0,1$	0,98
Moyenne		$-0,031 \pm 0,002$	$0,95 \pm 0,06$		$0,36 \pm 0,06$	$-1,2 \pm 0,1$	
K14-COL5A1	91+	$0 \pm 0,02$	$1,06 \pm 0,04$	0,99	$0,27 \pm 0,004$	$-0,90 \pm 0,01$	0,99
	94+	$0 \pm 0,01$	$1,1 \pm 0,2$	0,85	$0,32 \pm 0,03$	$-1,2 \pm 0,1$	0,97
	24+	$-0,018 \pm 0,006$	$0,85 \pm 0,02$	0,99	$0,28 \pm 0,03$	$-0,71 \pm 0,09$	0,94
	29+	$0,02 \pm 0,02$	$0,98 \pm 0,06$	0,97	$0,47 \pm 0,06$	$-1,5 \pm 0,2$	0,94
	30+	$0 \pm 0,01$	$1,11 \pm 0,04$	0,99	$0,40 \pm 0,04$	$-1,2 \pm 0,1$	0,96
	32+	$0,02 \pm 0,009$	$1,06 \pm 0,03$	0,99	$0,36 \pm 0,02$	$-0,89 \pm 0,05$	0,99
	37+	$0 \pm 0,01$	$1,29 \pm 0,06$	0,99	$0,3 \pm 0,01$	$-0,88 \pm 0,05$	0,99
	38+	$0,051 \pm 0,006$	$1,14 \pm 0,02$	0,99	$0,42 \pm 0,04$	$-1,1 \pm 0,1$	0,95
	39+	$-0,05 \pm 0,01$	$1,53 \pm 0,07$	0,99	$0,36 \pm 0,06$	$-0,9 \pm 0,2$	0,87
Moyenne		$0 \pm 0,01$	$1,12 \pm 0,06$		$0,35 \pm 0,02$	$-1,03 \pm 0,08$	

TABLE V.2 – Bilan des déformations pour l'ensemble des souris étudiées : Paramètres des ajustements linéaires de ε_{xx} et ε_{yy} en fonction de la déformation appliquée, pour l'ensemble des échantillons étudiés.

A l'opposé, l'évolution de ε_{yy} se fait avec un coefficient directeur $A_{yy} \approx -1$, ce qui dénote que la contraction dans l'axe orthogonal à la traction suit la déformation machine. Toutefois cette composante est moins reproductible et est plus complexe à interpréter. En effet, dans le cas de matériaux élastiques isotropes, en supposant que le volume est conservé lors de la traction, on s'attend à trouver, aux petites déformations¹³, une pente $A_{yy} = -0,5$. La valeur expérimentale obtenue, sensiblement plus élevée, s'explique probablement par une diminution de la section de l'échantillon, et notamment de son épaisseur, consécutive à une sortie d'eau lors de la traction. Enfin, la montée initiale est intrigante et semble difficile à expliquer sans un modèle avancé du tissu. On peut envisager que l'ajout de la goutte de gel induise un gonflement de la peau au début de l'expérience, ou que les premiers paliers de déformations lissent les éventuelles plis de la peau.

V.4.2 Réorganisation du collagène

Pour ce qui est de l'orientation des fibrilles et de la réorganisation du réseau, on acquiert une pile d'images à chaque palier de déformation à partir desquelles on peut calculer la carte des orientations, pixel par pixel, permettant d'obtenir un histogramme (normalisé) des orientations (figure V.21).

13. En pratique cette approximation est rapidement dépassée dans nos expériences. Toutefois, l'effet des grandes déformations tend plutôt à diminuer la contraction orthogonale et donc la pente de ε_{yy} .

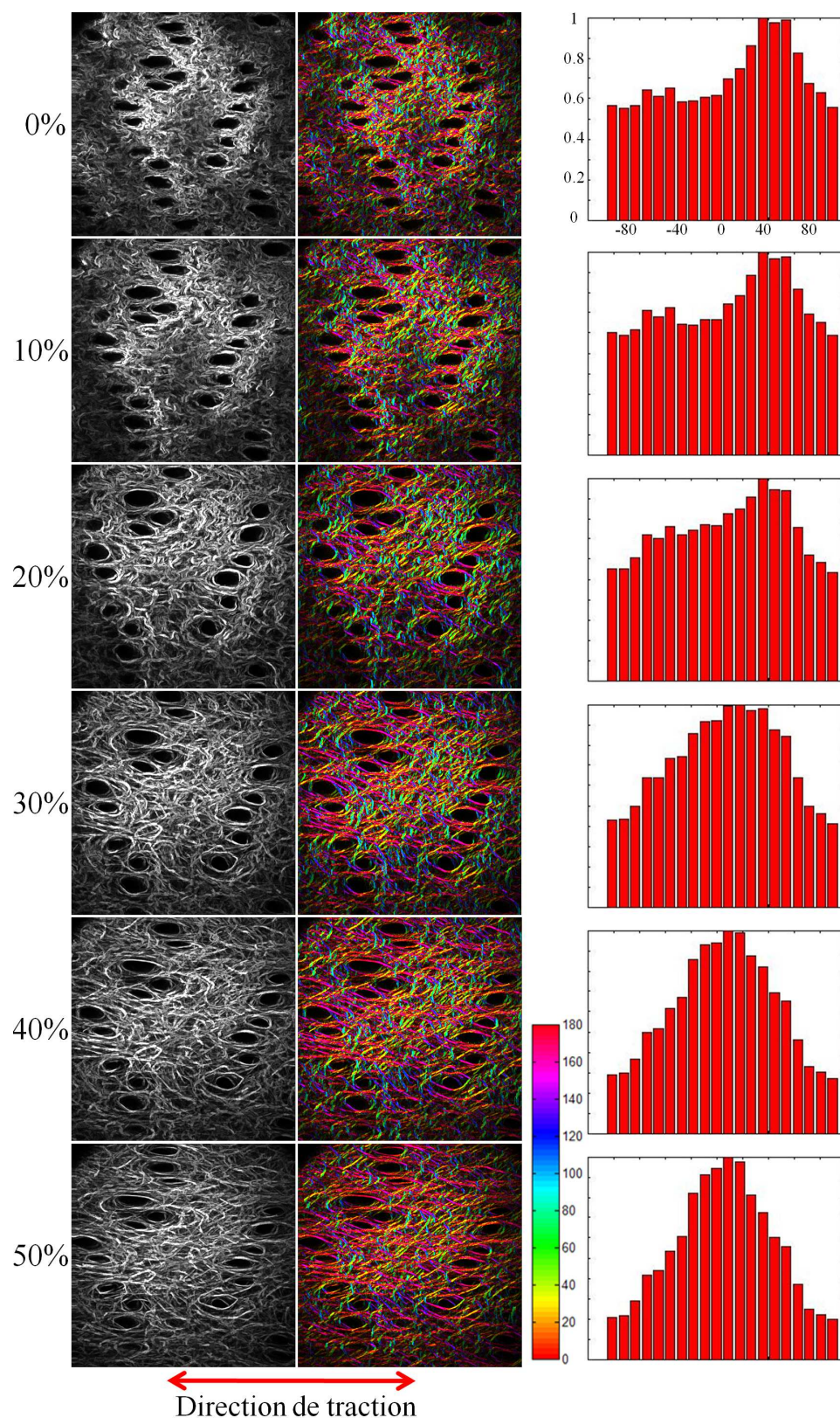


FIGURE V.21 – Réorganisation du réseau collagénique lors de la traction : Images, cartes et histogrammes des orientations à chaque pas de déformation (0% - 50%) pour un échantillon de peau de souris *K14-COL5A1*.

On voit qu'en partant d'une distribution relativement isotrope, avec un léger pic dominant (autour de 50° , en vert sur le code couleur, pour l'échantillon de la figure V.21), le réseau collagénique se réorganise au cours de la déformation pour donner un pic à 0° (dans la direction de traction) avec une distribution relativement peu dispersée. Ceci est encore plus visible sur la figure V.22 montrant les histogrammes des orientations à 0, 15, 30 et 45% d'allongement relatif.

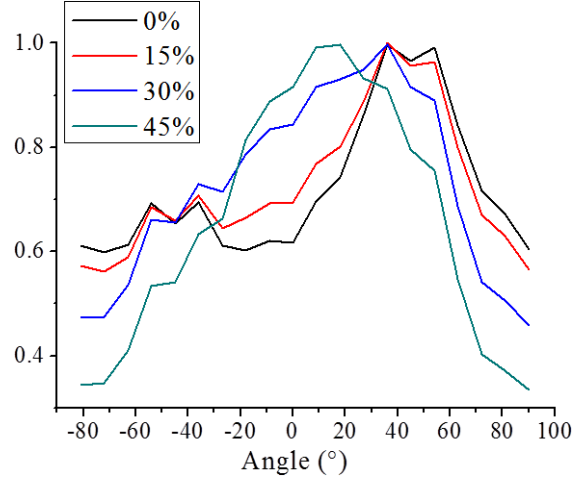


FIGURE V.22 – Distributions des orientations : *Histogrammes, normalisé, des orientations pour différents degrés de déformations (0%, 15%, 30% et 45%) jusqu'à la rupture de l'échantillon (vers 54%). Échantillon de peau de souris K14-COL5A1.*

En pratique pour chaque palier de déformation, on calcule la distribution d'orientation sur une "tranche" de $10\ \mu\text{m}$ d'épaisseur et on en déduit l'orientation moyenne des fibrilles de collagène dans cette ROI. Comme attendu, la figure V.23 montre que les fibrilles tendent à s'aligner dans la direction de traction au fur et à mesure de la déformation.

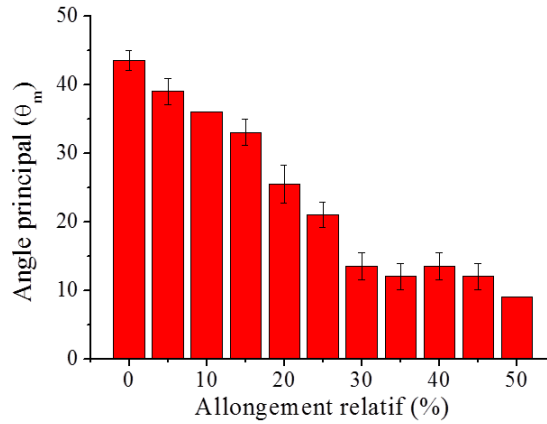


FIGURE V.23 – Angle principal de la distribution : *A chaque palier de déformation on calcule l'angle moyen de la distribution des fibrilles de collagène sur $10\ \mu\text{m}$ d'épaisseur.*

V.4. Résultats et discussion

A chaque palier on peut alors calculer l'index d'orientation dans la direction principale ($OI(\theta_m)$) et l'entropie moyenne sur la pile d'images et observer l'évolution de l'organisation du collagène en fonction de l'allongement relatif (figure V.24).

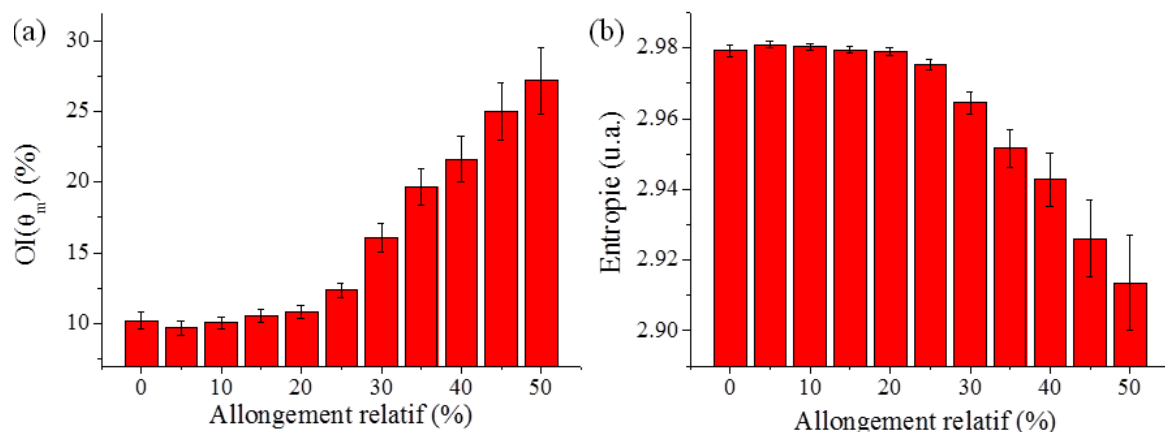


FIGURE V.24 – Index d'orientation et entropie : (a) *Index dans la direction principale ($OI(\theta_{max})$)* et (b) *Entropie moyenne en fonction de l'allongement relatif pour un échantillon de peau de souris K14-COL5A1.*

On voit alors que l'OI augmente lors de la traction indiquant que de plus en plus de fibrilles de collagène sont alignées dans la direction de traction. Dans le même temps, comme attendu, l'entropie diminue puisque le tissu est de plus en plus ordonné. La partie linéaire des courbes d'index d'orientation et d'entropie, fonction de la déformation appliquée (figure V.25), nous fournit alors une information sur la capacité du tissu à se réorganiser sous l'effet d'une déformation mécanique.

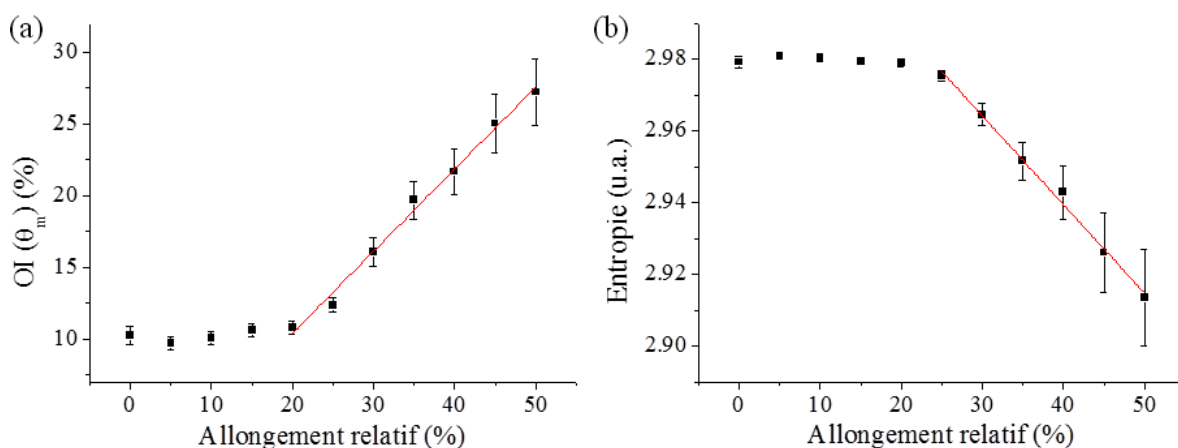


FIGURE V.25 – Pente de l'index d'orientation et de l'entropie : *Ajustement linéaire de (a) l'index d'orientation et (b) l'entropie, en fonction de l'allongement relatif.*

Chapitre V. Biomécanique sur peau de souris

En effectuant un ajustement linéaire, pour chacune de ces courbes, on obtient un paramètre quantitatif (le coefficient directeur) permettant de comparer objectivement différents échantillons (table V.3).

$$y(x) = a + b.x \quad (\text{V.13})$$

Type	Souris	OI			S		
		OI ₀	b _{OI}	R ²	S ₀	b _e	R ²
Sauvage	92-	-3 ± 2	85 ± 4	0,98	3,471 ± 0,009	-0,45 ± 0,03	0,98
	93-	8,2 ± 0,8	88 ± 3	0,94	3,424 ± 0,005	-0,51 ± 0,02	0,99
	WT5	-5 ± 2	62 ± 5	0,96	3,04 ± 0,01	-0,25 ± 0,03	0,93
	WT6	15,7 ± 0,9	47 ± 2	0,99	3,008 ± 0,008	-0,36 ± 0,02	0,99
	21-	-4,9 ± 0,9	90 ± 3	0,99	3,066 ± 0,008	-0,43 ± 0,02	0,98
	22-	4,8 ± 0,7	82 ± 3	0,99	3,015 ± 0,004	-0,37 ± 0,02	0,99
	25-	-3,1 ± 0,5	60 ± 1	0,99	3,051 ± 0,008	-0,28 ± 0,02	0,97
	26-	8,8 ± 0,8	75 ± 3	0,99	3,004 ± 0,005	-0,4 ± 0,02	0,98
Moyenne		3 ±3	74 ±6		3,13 ±0,07	-0,38 ±0,03	
K14- COL5A1	91+	13,5 ± 0,5	52 ± 1	0,99	3,384 ± 0,007	-0,277 ± 0,008	0,99
	94+	4 ± 1	82 ± 3	0,99	3,452 ± 0,007	-0,49 ± 0,02	0,99
	24+	7,2 ± 0,8	58 ± 2	0,98	3,04 ± 0,01	-0,38 ± 0,03	0,96
	29+	0 ± 3	64 ± 9	0,89	3,03 ± 0,01	-0,26 ± 0,05	0,84
	30+	-1,1 ± 0,8	57 ± 2	0,99	3,038 ± 0,004	-0,247 ± 0,009	0,99
	32+	-4,4 ± 0,03	64 ± 1	0,99	3,033 ± 0,004	-0,22 ± 0,01	0,99
	37+	0,8 ± 0,5	63 ± 2	0,99	3,025 ± 0,007	-0,26 ± 0,02	0,96
	38+	-7,3 ± 1	67 ± 1	0,98	0,42 ± 0,006	-0,31 ± 0,01	0,99
	39+	7,9 ± 0,9	30 ± 4	0,86	2,986 ± 0,003	-0,08 ± 0,02	0,77
Moyenne		2 ±2	60 ±5		3,12 ±0,06	-0,28 ±0,04	

TABLE V.3 – Bilan des réorientations pour l'ensemble des souris étudiées : *Ajustements linéaires de l'index d'orientation (OI) et l'entropie (S) en fonction de l'allongement relatif, pour l'ensemble des échantillons étudiés.*

V.4.3 Réponse mécanique

Dans le cas de tissus biologiques tels que la peau, le modèle classique de réponse est celui d'un milieu visco-élastique. Les courbes contrainte-déplacement ont alors le profil typique de la figure V.26.

Dans le cas de la peau, les fibrilles de collagène sont assimilées à des tiges rigides qui baignent dans un milieu interstitiel. La courbe de contrainte présente 4 parties distinctes [228, 227, 41] : un plateau à 0 aux faibles déformations (dépliement), un pied de courbe, une partie linéaire et un plateau final, dénotant le début de la rupture. Le plateau correspondant aux faibles déformations en début de courbe (dépliement) est interprété comme le fait que les ondulations macroscopiques du tissu sont lissées sous l'effet de la déformation appliquée, sans augmentation significative de la force. Le pied de courbe

V.4. Résultats et discussion

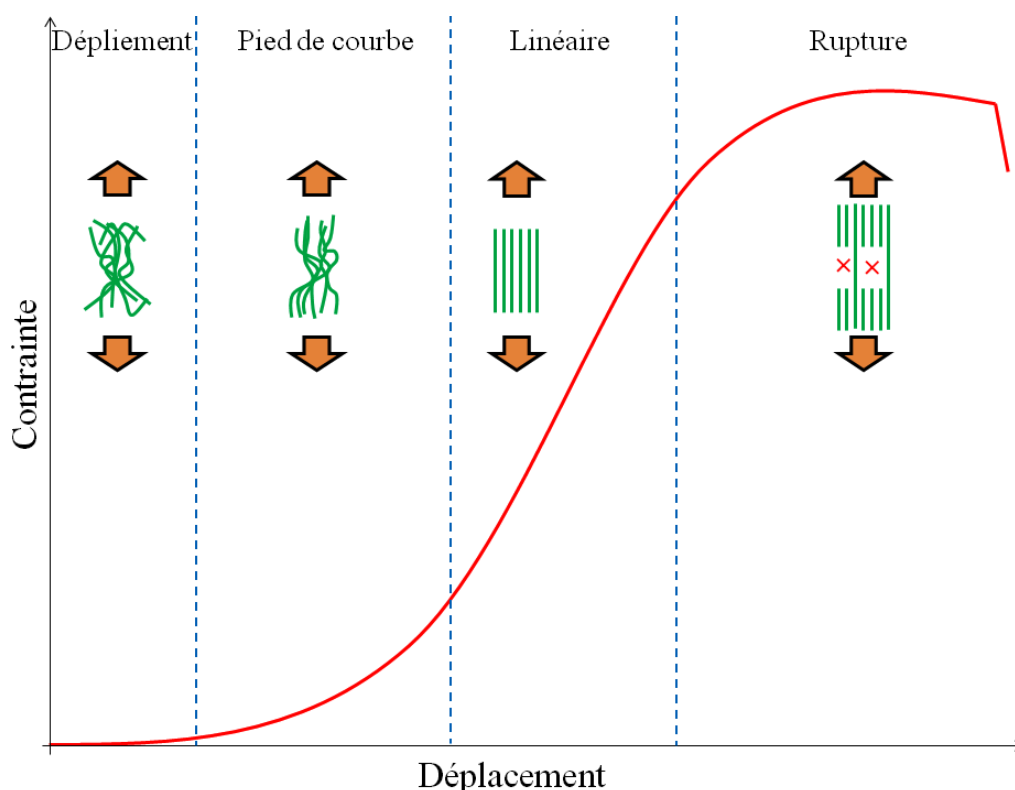


FIGURE V.26 – Modèle de courbe contrainte/déformation pour la peau : La première partie correspond au dépliement des ondulations macroscopiques, la seconde à l'alignement des fibrilles, la troisième à la réponse interne des fibrilles suite à la traction et la quatrième à la rupture du tissu. [adapté de Xu et coll. [227]].

correspond au moment où les fibrilles s'alignent en réponse à la force appliquée. Ce n'est que lorsque les fibrilles sont alignées dans la direction de traction, que l'on commence à tirer dessus. Comme elles sont rigides¹⁴, la réponse en force croît alors linéairement avec la déformation appliquée. Enfin la courbe de contrainte finit par saturer, dénotant un glissement des fibrilles les unes par rapport aux autres jusqu'à atteindre la rupture du tissu.

La figure V.27 montre que la courbe contrainte/déformation mesurée sur nos échantillons suit bien le modèle théorique. On voit de plus, ici dans le cas de peaux de souris génétiquement modifiées, que la courbe d'orientation des fibrilles de collagène est très bien corrélée à la montée en force. A noter que le résultat est le même dans le cas des souris contrôles.

Ceci confirme que le pied de courbe correspond bien à une réorganisation macroscopique du tissu, gommant les éventuels plis de la peau et où l'organisation locale des fibrilles ne varie pas sensiblement. Au contraire, dans la partie linéaire, les fibrilles s'alignent graduellement. Ceci semble indiquer que la partie linéaire correspond non pas à la réponse en force des fibrilles alignées mais à une réponse plus globale du tissu où de plus en plus

14. Principalement grâce à la structure hiérarchique et aux *cross-links*

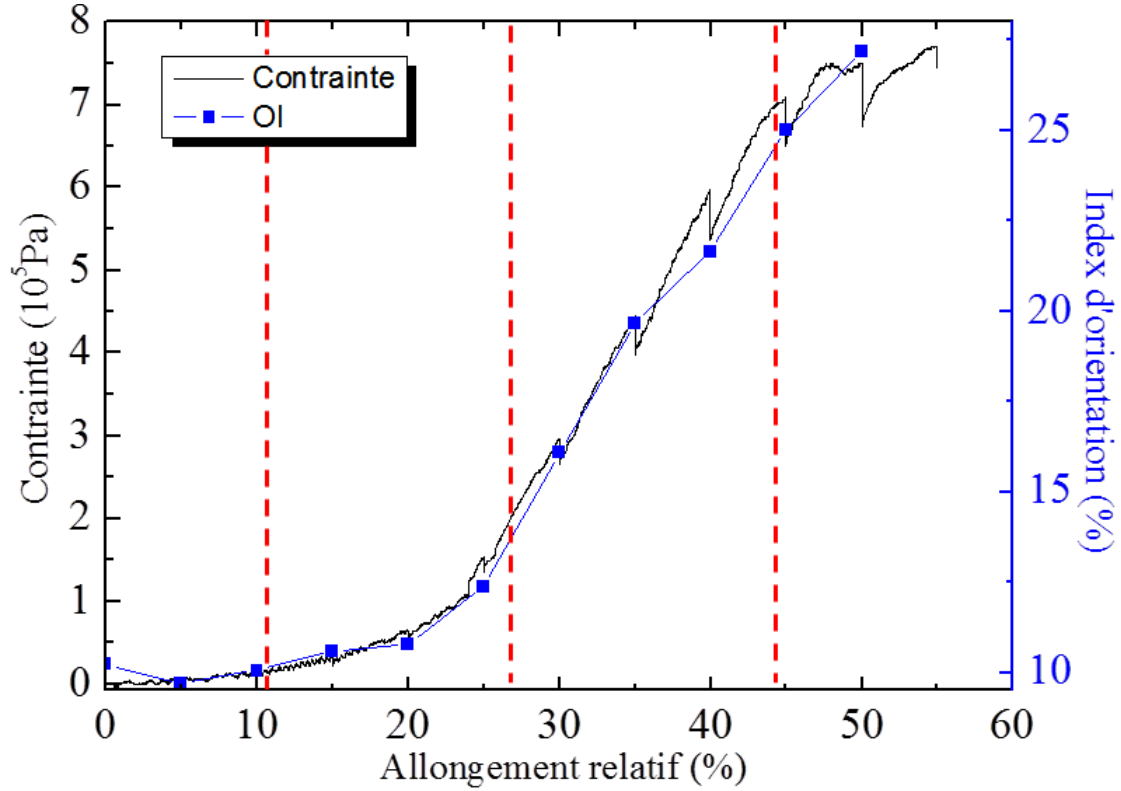


FIGURE V.27 – Correlation entre la contrainte et la réorganisation du collagène : On observe qu’au fur et à mesure que le tissu se déforme, le degré d’organisation local des fibrilles de collagène suit très précisément la contrainte locale. Échantillon de peau de souris K14-COL5A1.

de fibrilles de collagène sont alignées et ainsi contribuent à la réponse mécanique du tissu.

V.4.4 Différences entre souris mutantes et contrôles

Nous allons maintenant comparer les différences de comportement mécanique entre les souris K14-COL5A1 et les souris sauvages. Nous ne discuterons pas ici du modèle de souris pN par manque de statistique (seulement deux échantillons positifs).

Comme nous l’avons vu précédemment, l’étude des cartes de déformation montre que la traction se fait sans glissement et que les échantillons, tant mutants que contrôles, répondent de façon relativement homogène, indiquant que la force imposée est bien transmise uniformément à l’ensemble de l’échantillon. En calculant la pente de la courbe d’évolution de l’index d’orientation et de l’entropie, en fonction de la déformation appliquée, nous pouvons alors quantifier la réponse du réseau collagénique à la déformation imposée. Ce paramètre nous renseigne sur la capacité du tissu à se réorganiser pour répondre à des contraintes et sonde la propriété d’élasticité du tissu considéré. De manière similaire, la pente de la partie linéaire de la courbe contrainte/déplacement (module linéaire¹⁵) caractérise la raideur du tissu. En mesurant la réponse moyenne sur les deux

15. Le module linéaire ou module tangent correspond à une généralisation du module d’Young pour

V.4. Résultats et discussion

types d'échantillons considérés, il est alors possible de comparer les comportements des deux populations (figure V.28).

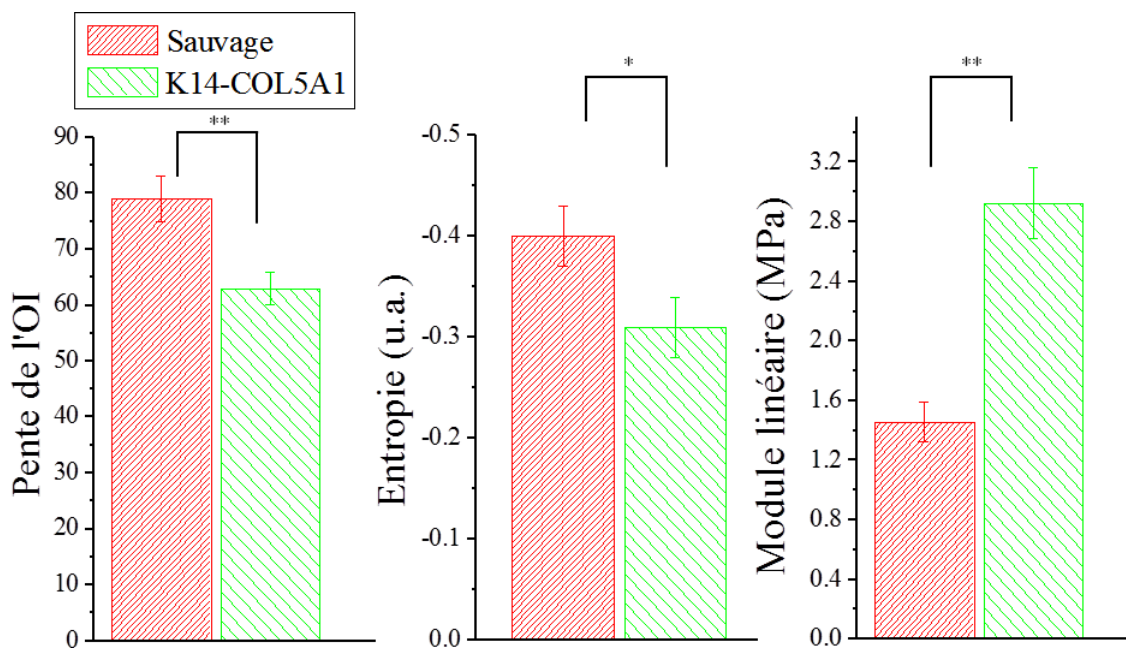


FIGURE V.28 – Index d'orientation, entropie et réponse mécanique des tissus : Statistique sur les paramètres d'organisation entre les tissus souris contrôles (rouge, 9 échantillons) et mutants (vert, 9 échantillons). On observe des différences significatives entre les deux populations tant pour l'OI que pour l'entropie. On voit de plus que la force augmente plus rapidement chez les souris mutantes que chez les souris contrôles. Les étoiles indiquent des différences significatives (* : $p\text{-value} \leq 1\%$ et ** : $p\text{-value} \leq 0.1\%$)

Il apparaît que les deux types d'échantillons, contrôles et génétiquement modifiés, présentent des réponses statistiquement différentes, tant pour l'OI et l'entropie, que pour le module linéaire. En moyenne, la réorganisation des fibrilles de collagène est plus importante dans les échantillons contrôles que dans les mutants (tant en terme d'index d'orientation qu'en terme d'entropie) alors que la contrainte croît plus rapidement sur les échantillons génétiquement modifiés que sur les contrôles. Ainsi les mesures de force et d'organisation sont bien concordantes, puisque la force monte d'autant plus rapidement que le tissu a des difficultés à se réorganiser, et montrent une rigidité plus élevée des peaux de souris génétiquement modifiées K14-COL5A1 due à une surexpression du collagène V dans ce type d'échantillons. A noter que les premières expériences de mécanique faites par nos collaborateurs lyonnais, indiquait plutôt une diminution de la rigidité du tissu, bien que non-significative [223]. Cela est probablement dû à la différence de vitesse de chargement utilisée, 20 fois plus faible dans notre cas. En effet, à très faible vitesse de chargement le comportement de l'échantillon est principalement guidé par les effets statiques, à savoir une faible relaxation du tissu.

des déformations non-négligeables.

En outre ceci semble indiquer, conformément aux considérations du paragraphe précédent, que la réponse mécanique de ces échantillons ne peut s'expliquer par un modèle considérant uniquement les fibrilles de collagène. En effet, dans ce modèle (figure V.26) si le réseau collagénique se réorganise moins, il y a moins de fibrilles alignées dans la direction de traction, ce qui devrait se traduire par une contrainte plus faible. Or nous observons l'évolution inverse, à savoir que la force croît d'autant plus vite que le réseau se réorganise difficilement. Il semble alors nécessaire de prendre en compte l'impact du milieu interstitiel sur la réponse de l'ECM. En effet un liquide interstitiel plus visqueux pourrait expliquer un faible réarrangement des fibrilles concomitant à une rapide montée de la force. Comme nous l'avons vu (cf. V.1.2), les souris K14-COL5A1 présentent une sur-représentation de l'homotrimère $[\alpha_1(V)]_3$ qui s'organise sous forme de petites fibrilles ($\emptyset \sim 10 \text{ nm}$) de collagène V au niveau de la jonction dermo-épidermique [223]. La diffusion de ces fibrilles dans l'épaisseur du derme pourrait expliquer une augmentation de viscosité de la matrice. Toutefois des investigations supplémentaires seront nécessaires pour démontrer cette hausse de viscosité et, le cas échéant, la relier à une éventuelle présence de fibrilles de collagène V dans le derme papillaire. Enfin, la comparaison de ces résultats avec les comportements observés sur les souris pN semble prometteuse dans la mesure où ces dernières présentent une ECM organisées différemment (plus de fibrilles et moins de protéoglycanes).

V.4.5 Conclusion et perspectives

Ces résultats valident notre technique comme moyen de corréler la déformation macroscopique et la réponse microscopique du tissu. En effet, le dispositif expérimental utilisé permet de bien corréler les déformations locale et globale. L'analyse des orientations des fibrilles de collagène dans le champ de vue nous a, de plus, permis de relier la réorganisation du réseau collagénique à l'allongement imposé au tissu. Ce protocole synergique (IGFL, LMS, LOB) a été validé sur l'étude de lignées de souris génétiquement modifiées, présentant une hyperréaction tissulaire, et a permis de mettre en exergue le rôle majeur joué par le collagène V, pourtant largement minoritaire, dans les propriétés mécaniques de la peau. Enfin cette relation multi-échelle devrait permettre une meilleure compréhension du lien entre la structure microscopique du tissu et sa fonction macroscopique.

Cependant de nombreuses autres études seront nécessaires pour complètement élucider le lien entre microstructure et réponse mécanique des échantillons. D'un point de vue optique, l'utilisation de SHG résolue en polarisation permettrait de sonder l'organisation du collagène dans l'échantillon y compris à l'échelle sub-fibrillaire. D'un point de vue mécanique, des études de relaxation permettraient d'observer la capacité d'un tissu à se réorganiser sous l'effet d'une déformation fixe et ainsi de quantifier l'élasticité ou la viscosité du tissu. Un autre type d'expériences fondées sur l'utilisation de cycles limites, consistant à préconditionner le tissu par une série de traction/relâchement, permettraient quant à elles d'étudier la fatigue du tissu et peut-être d'expliquer la fragilité des peaux dans le cas du syndrome d'Ehlers-Danlos. En parallèle, une variation de la vitesse de traction est maintenant requise pour aller plus loin dans la compréhension de la réponse du tissu en terme de visco-élasticité. En effet la réponse en force du tissu est drastiquement dépendante des conditions d'élongation de l'échantillon. Ainsi la variation de capacité de réorganisation entre tissus sains et pathologiques pourrait être reliée à une différence de

V.4. Résultats et discussion

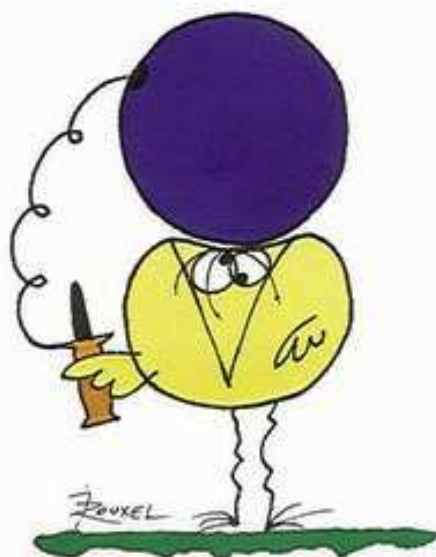
cinétique de réorientation des fibrilles.

Par ailleurs, si l'étude précédente se focalise sur le derme papillaire, il apparaît nécessaire de travailler maintenant sur le derme réticulaire, qui présente une structure sensiblement différente. Il serait intéressant de savoir à quel niveau est initiée la rupture du tissu, dans le derme papillaire ou le derme réticulaire, en complétant nos mesures optiques par de l'imagerie TEM. Dans le but d'avoir accès à l'ultrastructure de la zone de rupture il est nécessaire de la prélever, de la fixer¹⁶ et de préparer les échantillons pour le TEM afin d'observer l'ECM à l'échelle nanométrique. Cette partie du travail sera prise en charge par nos partenaire lyonnais. Enfin, il reste à valider notre étude pour l'étude des souris pN et l'observation de l'hyper-élasticité des peaux de souris modèles de l'EDS. Ces deux derniers points sont en cours de réalisation.

En conclusion, les résultats présentés dans ce chapitre démontrent le potentiel de la méthode développée pour l'étude de la relation entre fonction et structure dans des tissus pathologiques et contrôles, et ouvrent de nombreuses perspectives pour des projets sur le long terme. Ces projets sont maintenant en cours de développement grâce à l'obtention de financement PIX et ANR.

16. Paraformaldéhyde 4%, glutaraldéhyde 50% et Cacodylate de Na 0,4M.

Les devises Shadok



EN ESSAYANT CONTINUUELLEMENT
ON FINIT PAR RÉUSSIR. DONC:
PLUS ÇA RATE, PLUS ON A
DE CHANCES QUE ÇA MARCHE.

Conclusion

*We work in the dark
We do what we can
We give what we have.
Our doubts is our passion
And our passion is our task.
The rest is the madness of art.
- Henry James*

Le point de départ de cette thèse était le développement d'approches quantitatives en microscopie par génération de seconde harmonique appliquées à l'imagerie d'échantillons biologiques. Pour cela, ce travail s'est organisé autour de deux axes principaux : l'étude d'échantillons modèles de collagène, permettant de caractériser les signaux SHG détectés, et le développement d'approches phénoménologiques et de techniques d'analyse d'images adéquates pour extraire des informations quantitatives de nos données.

Nous avons tout d'abord étudié des échantillons modèles de gel de collagène, en collaboration avec le LCMCP. La caractérisation des cinétiques de fibrillogénèse en fonction de paramètres physico-chimiques, notamment du pH, nous a permis de maîtriser ce type de systèmes et de montrer l'intérêt de la microscopie multiphoton pour la caractérisation 3D de biomatériaux. Ainsi, nous avons vu qu'il est possible d'imager *in situ* l'auto-assemblage des triples hélices en solution, sans préparation ou marquage spécifique. Nous avons en outre pu imager la croissance de fibrilles de collagène isolées, de taille inférieure à la résolution optique, ce qui ouvre de nombreuses possibilités pour l'étude dynamique des stades précoces de formation de ces structures. En effet, l'étude des processus d'accrétion des triples hélices de collagène représente un enjeu essentiel tant d'un point de vue fondamental, pour la compréhension des processus biologiques impliqués dans la fibrillogénèse ou lors de remodelages de la matrice extra-cellulaire, que pour l'ingénierie de matériaux biomimétiques à partir de matrices collagéniques. A ce stade, une analyse de la réponse en polarisation permettra d'étudier la structuration d'une fibrille isolée lors de sa fibrillogénèse, voire sa structuration hélicoïdale *via* les composantes chirales du tenseur d'hyperpolarisabilité. Dans un second temps nous nous sommes attachés à caractériser un système hybride formé à partir d'une modification de la chimie de surface de nanoparticules de silice. Cette fonctionnalisation de l'interface particule/polymère favorise un confinement des triples hélices à la surface des nanoparticules, ce qui permet d'influer sur la structure du réseau fibrillaire. Nous avons montré qu'en tirant parti des informations structurales offertes par la microscopie SHG, combinées à une analyse d'images adéquate,

il est possible d'observer la structuration du réseau collagénique, dans un environnement 3D. L'intégration et le contrôle des propriétés d'auto-assemblage du collagène dans un système hybride ouvrent la porte au développement de biomatériaux possédant les propriétés spécifiques de chacun des composants, mécanique et structurale pour le collagène, magnétique ou optique, pour les nanoparticules.

Exploitant la maîtrise de ces échantillons ainsi acquise, nous avons ensuite réalisé de l'imagerie corrélative TEM/SHG sur des fibrilles de collagène isolées. La mesure combinée du diamètre des fibrilles (en TEM) et du nombre de photons SHG détectés a permis de déterminer la sensibilité de notre microscope et de calibrer la réponse du système en fonction du nombre de molécules dans le volume focal. En comparant ces mesures aux approches analytiques et numériques, nous avons pu observer qu'un calcul à partir d'ondes gaussiennes, voire d'ondes planes, rend relativement bien compte de la réponse SHG d'une fibrille isolée de diamètre inférieur à 250 nm. Enfin ces courbes de calibrations nous ont permis d'obtenir la valeur de l'hyperpolarisabilité d'une triple hélice selon une approche *top-down* basée sur un modèle additif de la réponse non-linéaire. La valeur obtenue étant en excellent accord avec des mesures effectuées précédemment, par diffusion hyper-Rayleigh, nos résultats valident ce modèle additif. Ainsi, dans le cas du collagène fibrillaire, la réponse d'une fibrille isolée est relativement bien décrite par la somme des contributions de ses différents acides aminés. D'ores et déjà cette calibration devrait permettre des études plus poussées sur la fibrillogénèse du collagène en exploitant l'évolution du diamètre, ou de la densité locale de molécules, mesuré *in situ* au cours de la formation de fibrilles, et ce alors même qu'elles ne sont pas résolues optiquement. Toutefois, cette étude reste une première étape en vue d'une calibration complète de la réponse SHG d'un tissu. Dans un premier temps, d'une part les simulations numériques doivent être généralisées à un ensemble de fibrilles, en tenant compte de leur organisation spatiale, d'autre part, expérimentalement, l'étude d'un autre degré de liberté requiert l'obtention d'informations complémentaires sur le signal telles que la polarisation, la phase ou la comparaison de l'émission avant/arrière. Dans un second temps, il sera nécessaire de prendre en compte les nombreux effets de propagation (absorption, diffusion, aberration) advenant dans les échantillons biologiques et qui modifient la puissance au foyer, ainsi que la taille et la forme du volume focal. Néanmoins, ces limitations représentent "l'état de l'art" en microscopie et font l'objet de nombreuses recherches (modélisation des tissus, optique adaptative...) permettant d'espérer s'affranchir de ces problèmes à moyen terme. Une telle calibration de la réponse SHG, dans des tissus collagéniques, autoriserait son utilisation pour le diagnostic de nombreuses pathologies des tissus conjonctifs, associées à des perturbations de leur processus de développement, de remodelage, de réparation, de vieillissement...

En parallèle, nous avons développé une approche phénoménologique, à partir d'expériences de traction sur des peaux de souris modèles du syndrome d'Ehlers-Danlos, permettant d'étudier la réponse mécanique d'un tissu riche en collagène fibrillaire (tendons, cornée, peau...), dans le but d'explorer la relation entre la déformation macroscopique appliquée à l'échantillon, caractéristique de sa fonction, et la réponse microscopique locale, propre à sa microstructure. Cette étude est basée sur un traitement d'images spécifique, permettant de calculer la déformation mécanique locale et de quantifier le degré d'organisation du réseau collagénique d'un tissu conjonctif, à l'échelle micrométrique. Cette méthode a permis d'analyser les différences de réponse entre des échantillons de peaux

Conclusion

de souris sauvages et génétiquement modifiées. En outre, en corrélant la réponse en force de l'échantillon avec la réorganisation du réseau collagénique, il est possible de tester le modèle de réponse mécanique d'un tissu visco-élastique. En particulier cette étude met en exergue le rôle majeur joué par le collagène V, pourtant largement minoritaire, dans les propriétés mécaniques de la peau. Finalement, les résultats obtenus démontrent le potentiel de cette méthode pour l'étude de la relation entre fonction et structure dans des tissus conjonctifs sains et pathologiques.

Pour conclure, remarquons qu'une même idée a guidé ces différentes approches d'obtention d'informations quantitatives sur nos échantillons, à partir des piles d'images SHG acquises, mais a conduit à des applications à des échelles d'organisation différentes : à l'échelle de la fibrille, pour la mesure de la densité moléculaire, et à l'échelle du réseau fibrillaire, pour l'analyse de la réorganisation du collagène. Ultimement, la microscopie SHG permettra de combiner ces différentes approches dans la perspective d'accéder à toutes les échelles d'organisation hiérarchique du collagène.

Les devises Shadok



POUR QU'IL Y AIT LE MOINS DE
MÉCONTENTS POSSIBLE IL FAUT TOUJOURS
TAPER SUR LES MÊMES.

Annexes

*On récompense parfois des scientifiques pour leur œuvre.
Pourquoi n'en punit-on jamais ?
- adapté de Jules Romain*

A Mesure de l'hyperpolarisabilité par diffusion hyper-Rayleigh

A.1 Généralités

La diffusion Hyper-Rayleigh (HRS) est une technique standard de mesure de la première hyperpolarisabilité β à l'échelle moléculaire, basée sur la diffusion non-linéaire incohérente de la lumière dans une solution isotrope. En tant que phénomène incohérent, l'intensité totale détectée en HRS est la superposition des intensités diffusées par chacune des sources non-linéaires présentes dans l'échantillon. En particulier, contrairement au cas de la SHG qui est un processus cohérent, le signal total en HRS ne dépend que linéairement du nombre d'harmonophores. L'intensité de diffusion hyper Rayleigh, résultant de la somme incohérente des champs de seconde harmonique émis par chaque molécule, s'exprime donc par la relation :

$$I_{HRS}(2\omega) = \frac{\varepsilon_0 c}{n_{2\omega}} N \langle \mathbf{E}_{2\omega} \mathbf{E}_{2\omega}^* \rangle_{\Omega} \quad (\text{A.1})$$

où $\langle \rangle_{\Omega}$ symbolise la moyenne faite sur les orientations (décrites par les angles d'Euler) équiprobables prises par une molécule. Pour N objets sans interaction, ce qui est le cas d'une suspension liquide très diluée, on peut appliquer le principe d'ergodicité, établissant une équivalence (pour un grand nombre de molécules) entre la moyenne sur toutes les orientations possibles, prises par une seule molécule au cours du temps, et la moyenne des orientations de l'ensemble des molécules à un instant t.

Le schéma de détection classique [115, 186] est donnée par la figure A.1. Dans les conditions expérimentales utilisées, l'intensité de diffusion hyper Rayleigh se met alors sous la forme :

$$I_{HRS} = \frac{4\pi^2 c n_{2\omega}^3}{\varepsilon_0 r^2 \lambda^4} N \langle \beta^2 \rangle I^2 = GN \langle \beta^2 \rangle I^2 \quad (\text{A.2})$$

Ici I^2 est l'intensité du champ fondamental, N le nombre de molécules, λ la longueur d'onde fondamentale, ε_0 la permittivité électrique du vide, $n_{2\omega}$ l'indice de réfraction à la

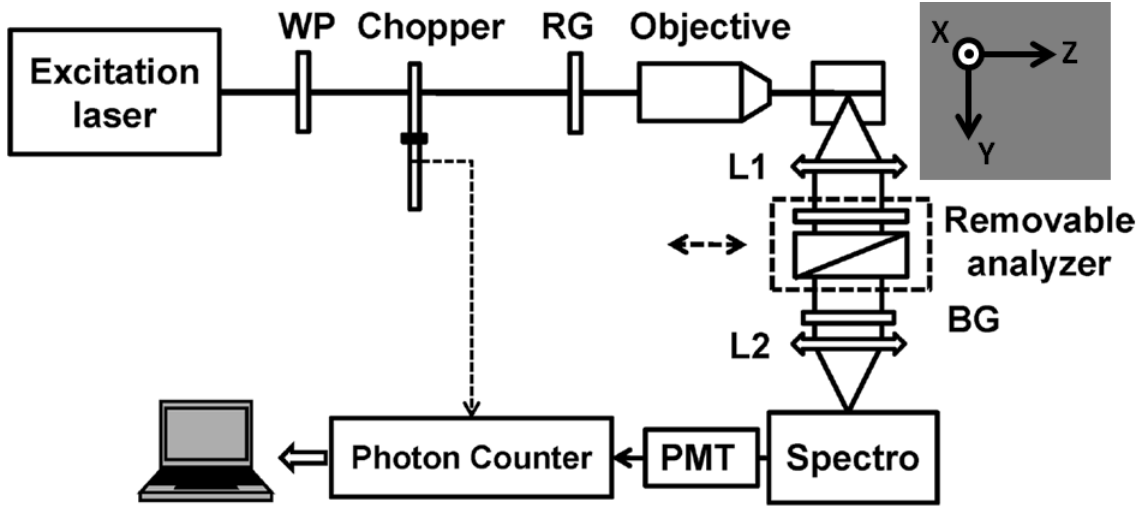


FIGURE A.1 – Schéma des expériences HRS : L'excitation est basée sur un laser Titane:Saphir (Mira 900, Coherent) à 784 nm fournissant des impulsions de 180 fs avec un taux de répétition de 76 MHz. La puissance moyenne en sortie de laser est ~ 700 mW. L'objectif utilisé est un 16x, 0,32 NA à air et la polarisation incidente est linéaire. Le diamètre du volume focal est d'environ 40 μm . Les signaux sont collectés par des tubes photomultiplicateurs et intégrés durant 100 s typiquement. [sources : Deniset-Besseau et coll. [115]].

fréquence harmonique, c la vitesse de la lumière dans le vide et :

$$\beta = \sqrt{\langle \beta_{XX}^2 + \beta_{YY}^2 \rangle} \quad (\text{A.3})$$

l'hyperpolarisabilité de la molécule, moyennée sur l'ensemble des orientations et pour une polarisation incidente linéaire selon (OX), dans le référentiel du laboratoire.

L'un des ingrédients importants de cette approche HRS est le rôle joué par le solvant. Celui-ci possède en effet sa propre réponse de seconde harmonique, caractérisée par l'hyperpolarisabilité β_S et est souvent utilisée comme référence interne dans les mesures quantitatives. Ainsi, pour mesurer quantitativement la valeur de l'hyperpolarisabilité d'une molécule en tenant compte de l'influence du solvant, l'intensité HRS s'écrit :

$$I_{HRS} = G (N_S \beta_S + N_{mol} \beta) I_{las}(\omega)^2 \quad (\text{A.4})$$

En pratique on mesure l'intensité HRS en fonction de la concentration en soluté et une régression linéaire permet d'obtenir la valeur de l'hyperpolarisabilité des harmonophores.

Pour des cas simples de symétrie moléculaire (1 ou 2 composantes d'hyperpolarisabilité), une interprétation microscopique directe des mesures d'intensité est possible. De manière générale l'étude de cette intensité HRS en fonction de la polarisation du champ fondamental permet d'étudier directement la symétrie des molécules. Si le tenseur d'hyperpolarisabilité microscopique du composé possède plusieurs éléments non-nuls, indépendants, il est possible de mesurer ces différentes composantes en utilisant plusieurs configurations expérimentales de polarisation et d'analyseur. En particulier, les différentes composantes du tenseur recèlent des propriétés microscopiques des sources non-linéaires, notamment leur organisation spatiale.

A. Mesure de l'hyperpolarisabilité par diffusion hyper-Rayleigh

A.2 Mesure de l'hyperpolarisabilité d'une liaison peptidique par une approche *Top-Down*

La mesure de l'hyperpolarisabilité du collagène a été faite en HRS par Ariane Deniset-Besseau, durant son post-doctorat au LOB, en collaboration avec l'équipe de Pierre-François Brevet (LASIM, CNRS - Université Lyon I) [115]. Pour cela ils utilisent la valeur de l'hyperpolarisabilité de l'eau, récemment re-mesurée [229, 230, 186] :

$$\beta_S = 0,087.10^{-30} \text{ esu} \quad (\text{A.5})$$

et déduisent de leurs mesures l'hyperpolarisabilité, dans le référentiel du laboratoire, d'une molécule de $[(PPG)_{10}]_3$, peptide modèle présentant la structure en triple hélice du collagène :

$$\beta_{[(PPG)_{10}]_3} = (14,9 \pm 0,9).10^{-30} \text{ esu} \quad (\text{A.6})$$

pour une excitation en polarisation linéaire. Soit¹⁷ :

$$\beta_{[(PPG)_{10}]_3} = 6,2.10^{-39} \text{ m}^4.\text{s}^{-1} \quad (\text{A.8})$$

Partant de là on peut déduire l'hyperpolarisabilité d'une liaison peptidique par une approche *Top-Down* [115]. Ici et dans toute la suite de cette annexe les lettres majuscules (X,Y,Z) désignent le repère du laboratoire et les lettres minuscules (x,y,z) le référentiel propre de la triple hélice¹⁸.

On introduit alors le facteur de dépolarisation :

$$D = \frac{\langle \beta_{XYX}^2 \rangle}{\langle \beta_{XXX}^2 \rangle} \left(= \frac{\text{horizontal}}{\text{vertical}} \right) \quad (\text{A.9})$$

L'équation A.3 se réécrit alors :

$$\beta^2 = \beta_{XXX}^2 (1 + D) \quad (\text{A.10})$$

D est mesuré en HRS résolue en polarisation :

$$D = 0,115 \quad (\text{A.11})$$

Dans le cas d'une solution moléculaire, on peut calculer β_{XXX} en considérant un moyennage isotrope [231] :

$$\langle \beta_{XXX}^2 \rangle = \frac{1}{7}\beta_{xxx}^2 + \frac{12}{35}\beta_{xxx}\beta_{xyy} + \frac{24}{35}\beta_{xyy}^2 \quad (\text{A.12})$$

Or dans le repère de la triple hélice, en notant β_{uuu} le tenseur d'une liaison peptidique et $\mathbf{u}$ la direction de la liaison, on peut écrire :

$$\begin{cases} \beta_{xxx} = N \langle (\mathbf{x} \cdot \mathbf{u})^3 \rangle \beta_{uuu} \\ \beta_{xyy} = N \langle (\mathbf{x} \cdot \mathbf{u}) (\mathbf{y} \cdot \mathbf{u})^2 \rangle \beta_{uuu} \end{cases} \quad (\text{A.13})$$

17. La conversion des unités de charge électrostatique (esu) au système international se fait selon :

$$\beta(MKS) = \frac{4\pi}{3.10^{10}} \beta(esu) \quad (\text{A.7})$$

18. A noter que les axes ont été changés par rapport aux papiers d'origine [115, 186] pour correspondre aux conventions adoptées dans le reste de ce manuscrit.

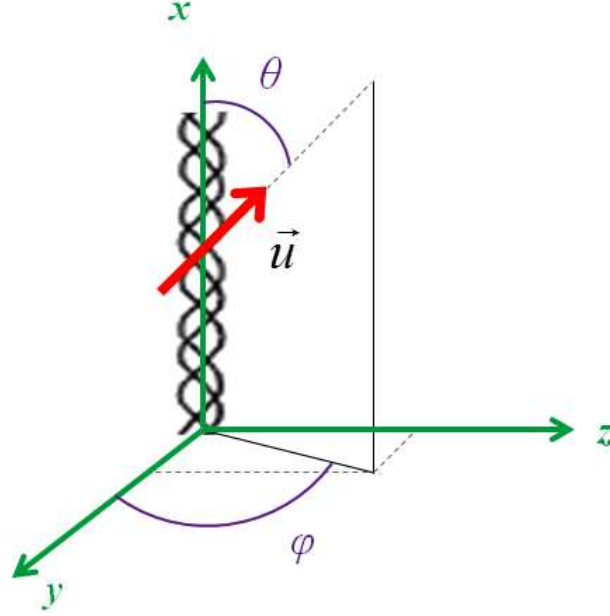


FIGURE A.2 – Triple hélice dans le repère du laboratoire : *Référentiel propre de la triple hélice et direction de β_{uuu} .*

Ainsi :

$$\beta_{xxx}^2 = N^2 \beta_{uuu}^2 \underbrace{\left[\frac{1}{7} \langle (\mathbf{x} \cdot \mathbf{u})^3 \rangle^2 + \frac{12}{35} \langle (\mathbf{x} \cdot \mathbf{u})^3 (\mathbf{x} \cdot \mathbf{u}) (\mathbf{y} \cdot \mathbf{u})^2 \rangle + \frac{24}{35} \langle (\mathbf{x} \cdot \mathbf{u}) (\mathbf{y} \cdot \mathbf{u})^2 \rangle^2 \right]}_F \quad (\text{A.14})$$

Ce qui permet, avec l'équation A.10, d'exprimer l'hyperpolarisabilité d'une liaison peptidique sous la forme :

$$\beta_{uuu}^2 = \frac{\beta_{HRS,eff}^2}{(1 + D)FN^2} \quad (\text{A.15})$$

En se plaçant dans le cas de la géométrie décrite par la figure A.2, l'équation A.15 se réécrit :

$$\begin{cases} \beta_{xxx} = N \cos^3 \theta \beta_{uuu} \\ \beta_{xyy} = N \langle \cos \theta \sin^2 \theta \sin^2 \varphi \rangle \beta_{uuu} = \frac{N}{2} \cos \theta \sin^2 \theta \beta_{uuu} \end{cases} \quad (\text{A.16})$$

où θ est l'angle d'inclinaison du dipôle non-linéaire, approximativement le long de la liaison peptidique, par rapport à l'axe de la triple hélice (*pitch angle*) et φ l'orientation azimutale, en pratique aléatoire. Ainsi le paramètre d'anisotropie de la réponse en polarisation ρ (cf. II.2.3.2) s'exprime sous la forme :

$$\rho = \frac{\beta_{xxx}}{\beta_{xyy}} = \frac{2}{\tan^2 \theta} \quad (\text{A.17})$$

En prenant $\rho = 1,4$ conformément aux mesures expérimentale sur le tendon [22, 135], on obtient $\theta = 50^\circ$, ce qui donne finalement :

$$\beta_{uuu} = (2,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-40} \text{ m}^4 \cdot \text{V}^{-1} \quad (\text{A.18})$$

B. Réduction du tenseur d'hyperpolarisabilité

B Réduction du tenseur d'hyperpolarisabilité

Dans cette partie nous allons présenter la réduction du tenseur d'hyperpolarisabilité (β) résultant de la symétrie du collagène. Il est important de souligner que les différentes étapes effectuées ici sont transposables au cas du tenseur de susceptibilité non-linéaire ($\chi^{(2)}$).

Dans le cas général, le tenseur d'hyperpolarisabilité comporte 27 composantes. Comme nous l'avons vu (cf. II.2.1.6), l'usage d'un unique faisceau pour produire la SHG ($\omega_1 = \omega_2 = \omega$) réduit à 18 le nombre de composantes indépendantes. En outre, la symétrie de Kleinman (cf. II.2.3.1) implique que le tenseur est invariant par permutation des trois indices :

$$\beta_{ijk} = \beta_{ikj} = \beta_{jik} = \beta_{jki} = \beta_{kji} = \beta_{kij} \quad (\text{B.1})$$

ce qui réduit à 10 le nombre de composantes indépendantes du tenseur.

$$\left\{ \begin{array}{l} 1. \beta_{xxx} \\ 2. \beta_{xxy} = \beta_{xyx} = \beta_{yxx} \\ 3. \beta_{xxz} = \beta_{xzx} = \beta_{zxx} \\ 4. \beta_{xyy} = \beta_{yyx} = \beta_{yxy} \\ 5. \beta_{xyz} = \beta_{xzy} = \beta_{yxz} = \beta_{yzx} = \beta_{zxy} = \beta_{zyx} \\ 6. \beta_{xzz} = \beta_{zxx} = \beta_{zzx} \\ 7. \beta_{yyy} \\ 8. \beta_{yyz} = \beta_{yzy} = \beta_{zyy} \\ 9. \beta_{zzy} = \beta_{zyz} = \beta_{yzz} \\ 10. \beta_{zzz} \end{array} \right. \quad (\text{B.2})$$

Les propriétés de symétrie du système étudié réduisent encore ce nombre de composantes indépendantes. Dans le cas général le tenseur d'hyperpolarisabilité se transforme selon :

$$\beta_{ijk} = r_{ii'} r_{jj'} r_{kk'} \cdot \beta_{i'j'k'} \quad (\text{B.3})$$

lors d'un changement de repère caractérisé par la rotation r :

$$\begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} r_{xx} & r_{xy} & r_{xz} \\ r_{yx} & r_{yy} & r_{yz} \\ r_{zx} & r_{zy} & r_{zz} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} x' \\ y' \\ z' \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} r_{xx}x' + r_{xy}y' + r_{xz}z' \\ r_{yx}x' + r_{yy}y' + r_{yz}z' \\ r_{zx}x' + r_{zy}y' + r_{zz}z' \end{pmatrix} \quad (\text{B.4})$$

Tout d'abord la symétrie cylindrique C_∞ impose une invariance par inversion des axes :

$$\left\{ \begin{array}{l} x \rightarrow x \\ y \rightarrow -y \\ z \rightarrow -z \end{array} \right. \quad (\text{B.5})$$

Ainsi

$$\begin{pmatrix} xxx & xxy & xzz & xyz & xzy & xzx & xxz & xxy & xyx \\ yxx & yyy & yzz & yyz & yzy & yzx & yxz & yxy & yyx \\ zxx & zyy & zzz & zyz & zzy & zzx & zxz & zxy & zyx \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} xxx & xxy & xzz & xyz & xzy & -xxz & -xxz & -xxy & -xyx \\ -yxx & -yyy & -yzz & -yyz & -yzy & yzx & yxz & yxy & yyx \\ -zxx & -zyy & -zzz & -zyz & -zzy & zzx & zxz & zxy & zyx \end{pmatrix} \quad (\text{B.6})$$

Il reste alors 4 composantes indépendantes non-nulles

$$\left\{ \begin{array}{l} 1. \beta_{xxx} \\ 2. \beta_{xyy} = \beta_{yxy} = \beta_{yyx} \\ 3. \beta_{xyz} = \beta_{xzy} = \beta_{yxz} = \beta_{yzx} = \beta_{zxy} = \beta_{zyx} \\ 4. \beta_{xzz} = \beta_{zxx} = \beta_{zzx} \end{array} \right. \quad (\text{B.7})$$

De plus la symétrie cylindrique impose une invariance par rotation (d'un angle φ quelconque) autour de l'axe (Ox) selon la transformation

$$\left\{ \begin{array}{l} x \rightarrow x' \\ y \rightarrow y' \\ z \rightarrow z' \end{array} \right. \quad (\text{B.8})$$

avec

$$\left\{ \begin{array}{l} x = x' \\ y = y' \cos \varphi - z' \sin \varphi \\ z = y' \sin \varphi + z' \cos \varphi \end{array} \right. \quad (\text{B.9})$$

La matrice de rotation s'écrit alors :

$$\mathcal{R}_{(x',y',z')}^{(x,y,z)} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \cos \varphi & -\sin \varphi \\ 0 & \sin \varphi & \cos \varphi \end{pmatrix} \quad (\text{B.10})$$

Ainsi, en utilisant l'équation B.3 il vient :

$$\left\{ \begin{array}{l} \beta_{xxx} = \beta_{x'x'x'} \\ \beta_{xyy} = \sin^2 \varphi \beta_{xzz} \\ \beta_{xyz} = -\sin^2 \varphi \beta_{xzy} \end{array} \right. \quad (\text{B.11})$$

Pour une rotation d'angle $\varphi = 90^\circ$ ou 270° , entre y et z, on a : $\sin^2 \varphi = 1$. Ainsi, en injectant φ dans l'équation B.11, on réduit finalement le nombre de composantes indépendantes à 2

$$\left\{ \begin{array}{l} 1. \beta_{xxx} \\ 2. \beta_{xyy} = \beta_{yxy} = \beta_{yyx} = \beta_{xzz} = \beta_{zxx} = \beta_{zzx} \end{array} \right. \quad (\text{B.12})$$

C. Protocole d'extraction et de purification du collagène de type I

C Protocole d'extraction et de purification du collagène de type I

Le collagène est extrait de tendons de queues de rats (*Sprague-Dawley*) procurées par l'Institut Curie d'Orsay et stockées au congélateur. Les protocoles d'extraction et de purification nous ont été fournis par Gervaise Mosser (LCMCP), qui a de plus assuré l'encadrement de ces expériences.

Prélèvement des tendons

- L'extraction se fait sous hotte, à température ambiante constante ($\sim 20^{\circ}\text{C}$). 35 queues de rats donnent environ 800 *ml* de collagène à $\sim 3 \text{ mg/ml}$.
- À l'aide d'une pince coupante, serrer légèrement la queue à 1 *cm* de son extrémité fine (bout de la queue).
- Casser la vertèbre par rotation du poignet (comme pour dénuder un fil électrique) et tirer pour sortir le tendon de la queue.
- Couper le tendon dénudé au-dessus d'un bécher de 500 *mL* de PBS 1X.
- Recommencer l'opération de cm en cm (ne pas utiliser les 3 derniers cm de la base de la queue).
- Éliminer au maximum les résidus de tissus ou de vaisseaux présents dans le bécher.

Lavage des tendons

- Laver les tendons abondamment et plusieurs fois (3-4 fois) avec du PBS 1X. Centrifuger (4°C , 5500 *rpm*, 5 *min*) successivement en éliminant systématiquement le surnageant, jusqu'à ce qu'il soit limpide et incolore (pas de sang résiduel, donc pratiquement plus d'albumine).
- Rincer les tendons dans du NaCl 4M (dans de l'eau distillée), afin de retenir tout le collagène et faire éclater, par osmose, tout ce qui est cellulaire, notamment le sang (évacuation de l'albumine) ($\sim 15 \text{ min}$).
- Laver abondamment et plusieurs fois (au moins 4 fois) avec du PBS 1X, et centrifuger successivement (4°C , 4500 *rpm*, 5 *min*) (élimination du sel et de tous les débris cellulaires).

Mise en solution du collagène

- Mettre les tendons dans un bécher contenant de l'acide acétique (CH_3COOH) 0,5M stérile avec un pH de 2,5 équilibré avec de l'acide chloridrique (HCl) 1N (le pH n'est pas critique => vérifier au papier pH que l'on est entre 2 et 3). Environ 1,5 *L* pour 35 queues.
- Mettre à agiter (à 20°C), parafilmer et laisser le collagène se dissoudre durant 24h.
- Filtrer la solution sur une gaze stérile (élimine les structures fibrillaires qui ne tombent pas à la centrifugation, la partie non dissoute peut être remise à solubiliser).

Purification du collagène pour des expériences de physico-chimie

- Centrifugation du filtrat (21000 *rpm*, 2h) (élimine les gros agrégats non-dissous).
- Précipitation du surnageant par NaCl 300 *mM* (laisser agiter environ 1 heure, introduire le NaCl très précautionneusement pour éviter d’avoir une concentration locale ≤ 700 *mM* qui ferait précipiter le collagène).
- Centrifugation du filtrat (21000 *rpm*, 3h). Conserver le surnageant et éliminer les culots (élimine les éventuels contaminants qui auraient précipité grâce au sel jusqu’à 300 *mM*).
- Précipitation du collagène par NaCl 4M ajusté à 700 *mM* (Attention : cette quantité est souvent insuffisante car après la précipitation à 300 *mM* la majeure partie du sel reste dans le culot. On peut rajouter un peu de NaCl pour faire précipiter et laisser sous la hotte à agiter pendant la nuit).
- Centrifugation (5500 *rpm*, 10°C, 45min) (permet la récupération du collagène précipité et l’élimination des molécules encore présentes en solution). Centrifuger jusqu’à ce que le collagène soit limpide et que l’on n’obtienne plus de culot. Rassembler et peser les culots.
- Re-solubilisation des culots dans CH₃COOH 0,5M équilibré à pH 2,5 par HCl 1M (NB : 200 *g* de culots dans 1,8 *L* qsp donnent une solution à 2 – 3 *mg/ml*).
- 4-5 dialyses successives contre du CH₃COOH 0,5M (changer l’acide 2 fois par jour, pas de HCl ici : *pH* ~ 3). Dialyser 1 ou 2 boudins (pores de 25 Å) de 200 *mL* dans 2 *L* d’acide. Permet l’élimination du sel et du HCl résiduels (pour une précipitation à 500 *mM* on arrive à une concentration finale en sel de 50 μ M).
- Transférer le contenu des boudins dans une bouteille stérile après la dialyse.
- Centrifugation (21000 *rpm*, 15°C, 4h). Élimination des agrégats non dissous.

Contrôle de la qualité du collagène obtenu par électrophorèse

On contrôle ensuite la pureté de la solution de collagène obtenue par électrophorèse.

Préparation des gels

H ₂ O distillée	4,05 ml
Tris HCl 1,5M, pH = 8,8	2,5 ml
Acrylamide/Bis 30%	3,3 ml
SDS 10%	100 μ l
Persulfate d’ammonium 10%	50 μ l
Temed (à ajouter au moment de l’emploi du gel)	5 μ l

TABLE C.4 – Gel de migration : 10 %

C. Protocole d'extraction et de purification du collagène de type I

H ₂ O distillée	2,85 ml
Tris HCl 0,5M, pH = 6,8	1,25 ml
Acrylamide/Bis 30%	3,3 ml
SDS 10%	50 μ l
Persulfate d'ammonium 10%	25 μ l
Temed (à ajouter au moment de l'emploi du gel)	10 μ l

TABLE C.5 – Gel de concentration : 5 %

Dépôt des échantillons

- Installer les plaques sur le support de montage, vérifier l'étanchéité avec de l'eau distillée, et remplir de gel de migration jusqu'à 4–5 mm de la ligne verte inférieure.
- Ajouter doucement de l'acétone (évite que le gel sèche) jusqu'en haut des plaques et attendre la polymérisation du gel (environ 1h).
- Vider et ajouter le gel de concentration jusqu'à 2 – 3 mm du bord supérieur.
- Mettre un peigne de 10 puits et laisser polymériser (30 à 45 min).
- Remplir de Tampon de migration 1X jusqu'au ras des plaques.
- Diluer les échantillons à doser dans le tampon d'échantillon (généralement 10 μ l d'échantillon dans 5 μ l de tampon).
- Déposer les échantillons dans les puits (à la micropipette) en réservant un puits par plaque pour le marqueur de poids moléculaire (Rainbowmix, code RPN 756).

Migration et coloration

- Migration en deux temps :
 1. Régler l'appareil sur 80 V. Mettre en marche (l'apparition de petites bulles dans le Tampon de migration indique le fonctionnement). Laisser 10 à 20 min jusqu'à ce que les dépôts soient compactés en une seule ligne (les protéines ont alors atteint le front du gel de migration).
 2. Régler l'appareil sur 160 V pour la migration proprement dite et arrêter quand toutes les protéines ont complètement migré (20-30 min).
- Marquer le front de migration.
- Sur un transparent, à l'aide du négatoscope, décalquer le gel et reporter le front de migration et la distance de migration des différentes protéines du marqueur de poids moléculaire.
- Démouler le gel, ajouter 50 à 100 ml de Bleu de Coomassie (jusqu'à recouvrir entièrement le gel) et agiter pendant 1 heure environ.

Résultats

- Scanner le gel.
- Mesurer les distances de migration des protéines du marqueur de poids moléculaire => courbe d'étalonnage.
- Détermination du poids moléculaire des protéines contenues dans l'échantillon sur la courbe d'étalonnage.

Concentration en collagène : dosage hydroxyprolique

La fraction d'hydroxyproline dans la séquence du collagène étant bien caractérisée, on dose l'hydroxyproline pour déterminer la concentration en collagène de la solution obtenue.

Hydrolyse du collagène

- Placer dans des tubes eppendorf 50 μl d'échantillon de collagène et 50 μl de HCl 35% (pour séparer les 3 brins de tropocollagène). Vortexer puis centrifuger. Boucher hermétiquement (sur-capuchon).
- Mettre à l'étuve à 100°C une nuit.
- Reprise des échantillons secs avec 1 ml d'eau distillée. Vortexer.

Dosage de l'hydroxyproline

	Gamme d'hydroxyproline à partir d'une solution mère à 20 $\mu\text{g/ml}$					Échantillon de collagène		
Hydroxyproline ou échantillons (μl)	0 0 $\mu\text{g/ml}$	40 0,8 $\mu\text{g/ml}$	80 1,6 $\mu\text{g/ml}$	100 2 $\mu\text{g/ml}$	140 2,8 $\mu\text{g/ml}$	10	20	40
H ₂ O (μl)	400	360	320	300	260	390	380	360
Dilution de l'échantillon						1/40	1/20	1/10
Chloramine T	200 μl , température ambiante, 20 min. Vortexer							
Acide perchlorique 3,15 M	200 μl , température ambiante, 5 min. Vortexer							
DMBA	200 μl , 20 min à 60°C. Vortexer							

TABLE C.6 – Dosage hydroxyprolique : *L'acide perchlorique stoppe la réaction entre la chloramine T et l'hydroxyproline. Le DMBA est le colorant sensible à l'hydroxyproline.*

- Mesure de l'absorbance au spectromètre à 557 nm.
- Faire le 0 avec le zéro de la gamme d'hydroxyproline.
- Penser à refaire le 0 tous les 3 ou 4 échantillons pour compenser la dérive.

Calcul de la concentration en collagène

La concentration de collagène C en mg/ml s'obtient alors par :

$$C = 7,6 \times \mathcal{F} \times n \quad (\text{C.1})$$

avec n la quantité d'hydroxyproline par μg d'échantillon, le facteur 7,6 représentant le fait qu'il y a 13% d'hydroxyproline dans une molécule de collagène et $\mathcal{F}$, le facteur de dilution, tenant compte du volume de l'échantillon dilué dosé, de la reprise de l'extrait du collagène sec dans 1 ml d'eau distillée et de la quantité de collagène hydrolysée.

C. Protocole d'extraction et de purification du collagène de type I

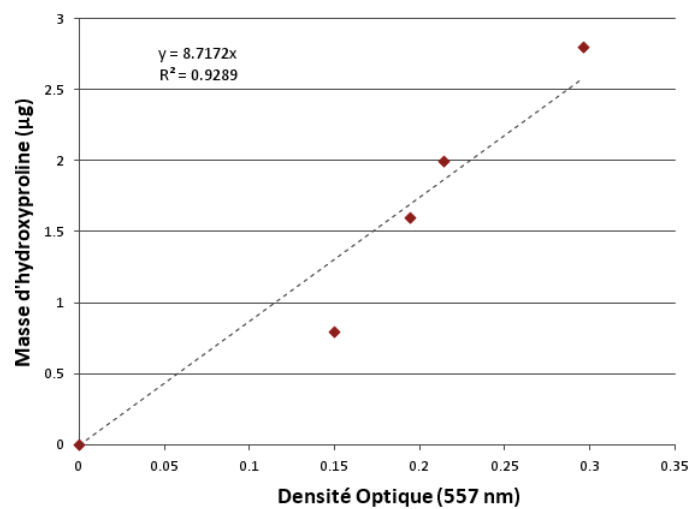


FIGURE C.1 – Dosage de l'hydroxyproline : *L'ajustement linéaire de la masse d'hydroxyproline en fonction de la densité optique mesurée permet de déterminer la concentration de la solution de collagène obtenue.*

D Morphologie mathématique

La morphologie mathématique est un ensemble de méthodes de traitement d'images permettant d'extraire des informations (forme, taille, orientation, connexité...) à partir des réponses fournies à différentes transformations. De nature fondamentalement géométrique, les opérateurs morphologiques caractérisent le voisinage local de chaque pixel en comparant les objets à analyser à un autre objet de forme connue, appelé élément structurant. L'élément structurant, pouvant être de taille et de forme variées, joue en quelque sorte le rôle de sonde. Il est promené partout sur l'image à traiter et à chaque position on interroge sa relation avec l'image. Ces relations peuvent être par exemple du type "est inclus dans l'ensemble", ou "jouxte l'ensemble"...

Nous allons nous placer ici dans l'ensemble $E = \mathbb{N}^2$, souvent utilisé comme modélisation du support des images binaires à deux dimensions. A noter que les outils exposés ici peuvent être transposés au cadre beaucoup plus général de la théorie des ensembles. Soit B un sous-ensemble de E , appelé élément structurant, et X un sous-ensemble de E , correspondant aux objets étudiés dans l'image. Les éléments structurants que nous utilisons dans ce manuscrit sont le disque et la droite.

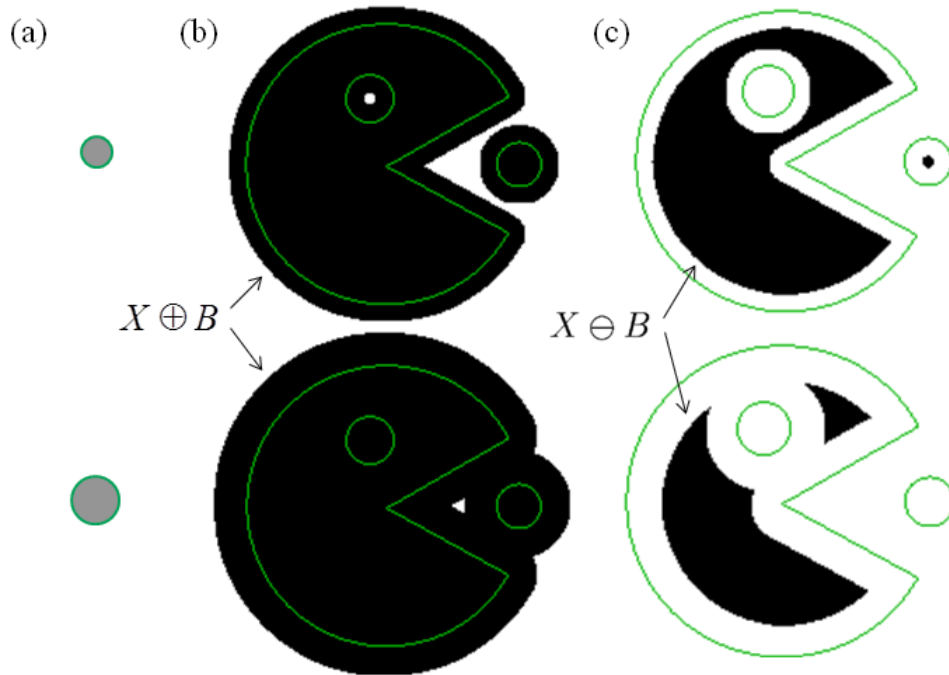


FIGURE D.1 – Dilatation et érosion : *Exemple de deux éléments structurant circulaires de taille variable. (a) Éléments structurant utilisés, (b) Images dilatées et (c) Images érodées. L'image d'origine est donnée par le tracé en vert [source : [http ://www.pfl-cepia.inra.fr/](http://www.pfl-cepia.inra.fr/)].*

D. Morphologie mathématique

D.1 Dilatation et érosion

La dilatation morphologique du sous-ensemble X par l'élément structurant B est définie comme la somme de Minkowski :

$$\delta_B(X) = X \oplus B = \{x + b \mid b \in B, x \in X\} \quad (\text{D.1})$$

Géométriquement, une dilatation morphologique consiste à déplacer l'élément structurant (B) sur chaque pixel de l'image (E) et à regarder si B intersecte la structure d'intérêt (X). Le résultat est une structure toujours plus grosse que la structure d'origine (figure D.1.b). En fonction de la taille de l'élément structurant, certaines particules peuvent se trouver connectées, et certaines aspérités disparaître. La dilatation morphologique n'est, en général, pas inversible. L'opération qui en quelque sorte tente de produire l'inverse de la dilatation est l'érosion morphologique :

$$\varepsilon_B(X) = X \ominus B = \{x \mid \forall b \in B, x + b \in X\} \quad (\text{D.2})$$

Géométriquement, une érosion consiste à chercher tous les pixels pour lesquels l'élément structurant (B) centré sur ce pixel touche l'extérieur de la structure $\overline{X}$. Le résultat est une structure rognée (figure D.1.c). On observe la disparition des particules plus petites que l'élément structurant utilisé, et la séparation éventuelle des grosses particules.

D.2 Ouverture et fermeture

L'érosion et la dilatation ont l'inconvénient de modifier fortement la taille des structures dans l'image. Afin de réduire cet effet, on les utilise souvent en association. Pour ce faire on définit l'ouverture morphologique comme une érosion suivie d'une dilatation, par le même élément structurant :

$$\gamma_B(X) = X \circ B = \delta_B(\varepsilon_B(X)) \quad (\text{D.3})$$

L'ouverture a pour effet de faire disparaître les petites particules (dont la taille est inférieure à celle de l'élément structurant) et de séparer les grosses particules aux endroits où elles sont plus fines (figure D.2.b).

De manière duale, on définit la fermeture morphologique comme une dilatation suivie d'une érosion, par le même élément structurant :

$$\phi_B(X) = X \bullet B = \varepsilon_B(\delta_B(X)) \quad (\text{D.4})$$

La fermeture, quant à elle, fait disparaître les trous de petite taille dans les structures et connecte les structures proches (figure D.2.c).

L'ouverture et la fermeture morphologiques sont idempotentes : le résultat ne change pas si on applique plusieurs fois l'opérateur. L'ouverture et la fermeture morphologique changent relativement peu la forme des grosses particules. Par contre, elle permettent de faire disparaître facilement les petites particules isolées, ou les petits trous à l'intérieur des structures. On les utilise donc souvent pour nettoyer le résultat d'une binarisation (segmentation).

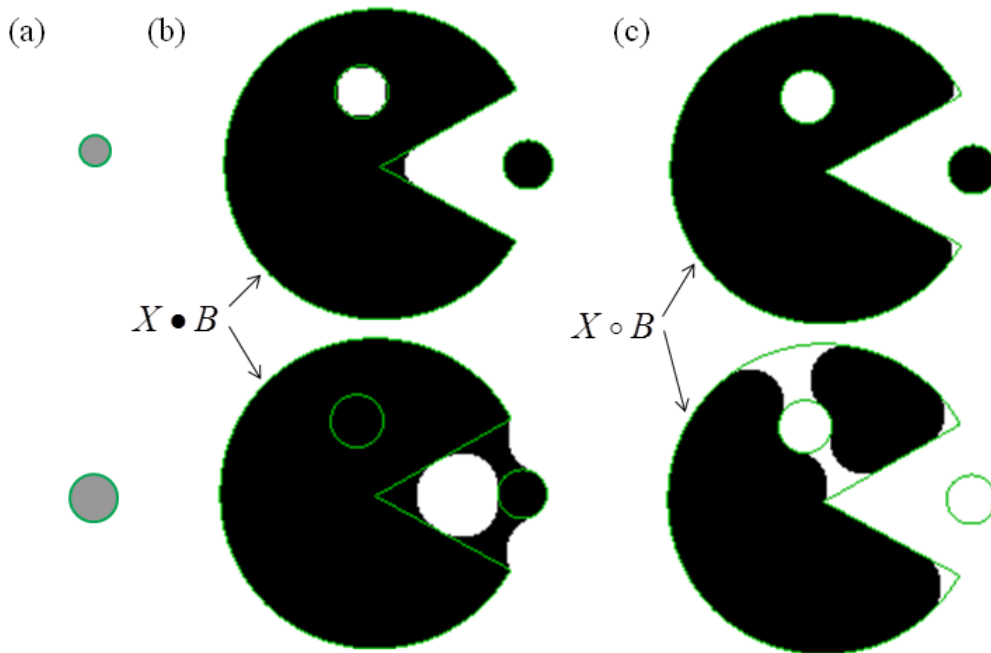


FIGURE D.2 – Ouverture et fermeture : *Exemple de deux éléments structurant circulaires de taille variable. (a) Éléments structurant utilisés, (b) Fermeture de l'image et (c) Ouverture de l'image. L'image d'origine est donnée par le tracé en vert [source : <http://www.pfl-cepia.inra.fr/>].*

Il est important de noter que l'élément structurant apparaît comme un révélateur des informations voulues. Le résultat des transformations morphologiques appliquées à l'image est donc drastiquement conditionné par le choix de cette structure comme l'illustre la figure D.3.

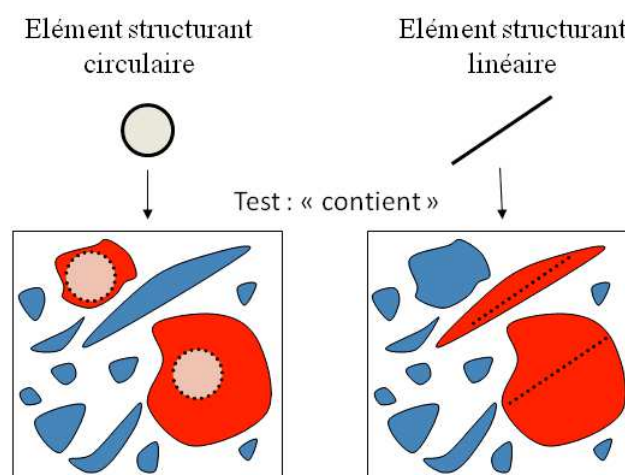


FIGURE D.3 – Éléments structurants : *Influence de l'élément structurant choisi (circulaire ou linéaire) sur le résultat d'une transformation morphologique simple (inclusion).*

E. Équation de propagation

E Équation de propagation

Nous allons ici démontrer l'équation de propagation pour le champ harmonique utilisée au chapitre IV, le modèle employé étant celui développé dans le livre de R. Boyd [88]. Pour cela on part des équations de Maxwell :

$$\begin{cases} \nabla \cdot \mathbf{D}(\mathbf{r}, t) = \rho(\mathbf{r}, t) \\ \nabla \cdot \mathbf{B}(\mathbf{r}, t) = 0 \\ \nabla \times \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = -\frac{\partial \mathbf{B}(\mathbf{r}, t)}{\partial t} \\ \nabla \times \mathbf{H}(\mathbf{r}, t) = -\frac{\partial \mathbf{D}(\mathbf{r}, t)}{\partial t} + \mathbf{j}(\mathbf{r}, t) \end{cases} \quad (\text{E.1})$$

avec :

$$\begin{cases} \mathbf{H}(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{\mu_0} \mathbf{B}(\mathbf{r}, t) - \mathbf{M}(\mathbf{r}, t) \\ \mathbf{D}(\mathbf{r}, t) = \varepsilon_0 \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) + \mathbf{P}(\mathbf{r}, t) \end{cases} \quad (\text{E.2})$$

où $\mathbf{P}(\mathbf{r}, t)$ et $\mathbf{M}(\mathbf{r}, t)$ représentent respectivement la polarisation et la magnétisation, dépendant toutes deux de $\mathbf{E}(\mathbf{r}, t)$ et de $\mathbf{H}(\mathbf{r}, t)$. On s'intéresse ici à la propagation d'un faisceau dans un milieu sans charge ou courant libre :

$$\begin{cases} \rho = 0 \\ \mathbf{j} = \mathbf{0} \end{cases} \quad (\text{E.3})$$

On suppose de plus que le milieu est non-magnétique :

$$\mathbf{B} = \mu_0 \mathbf{H} \quad (\text{E.4})$$

En appliquant l'opérateur nabla (∇) à l'équation de Maxwell-Faraday et en injectant l'équation de Maxwell-Ampère on obtient :

$$\nabla \times \nabla \times \mathbf{E} = \mu_0 \frac{\partial^2 \mathbf{D}}{\partial t^2} \quad (\text{E.5})$$

Par ailleurs le premier terme se réécrit :

$$\nabla \times \nabla \times \mathbf{E} = \nabla \cdot (\nabla \cdot \mathbf{E}) - \nabla^2 \mathbf{E} \quad (\text{E.6})$$

Or d'après l'équation de Maxwell-Gauss (dans un milieu sans charge libre), le premier terme s'annule. On peut donc réécrire l'équation de propagation :

$$\nabla^2 \mathbf{E} + \mu_0 \varepsilon_0 \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2} = -\mu_0 \frac{\partial^2 \mathbf{P}}{\partial t^2} \quad (\text{E.7})$$

Pour faire apparaître les polarisations non-linéaires comme termes sources, on sépare usuellement les composantes linéaires et les termes non-linéaires :

$$\mathbf{P} = \mathbf{P}^{(1)} + \mathbf{P}^{NL} \quad (\text{E.8})$$

On peut alors écrire l'induction électrique ($\mathbf{D}$) sous la forme :

$$\mathbf{D} = \mathbf{D}^{(1)} + \mathbf{P}^{NL} \quad (\text{E.9})$$

où la partie linéaire s'écrit :

$$\mathbf{D}^{(1)} = \varepsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P}^{(1)} \quad (\text{E.10})$$

Le milieu étant, dans le cas général, dispersif, il est nécessaire de considérer chaque fréquence indépendamment. C'est pourquoi on écrit les différents champs sous la forme :

$$\begin{cases} \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \sum_n \mathbf{E}_n(\mathbf{r}) e^{-i\omega_n t} + cc \\ \mathbf{D}^{(1)}(\mathbf{r}, t) = \sum_n \mathbf{D}_n^{(1)}(\mathbf{r}) e^{-i\omega_n t} + cc \\ \mathbf{P}^{NL}(\mathbf{r}, t) = \sum_{n>1} \mathbf{P}^{(n)}(\mathbf{r}) e^{-i\omega_n t} \end{cases} \quad (\text{E.11})$$

où la sommation s'effectue sur le domaine des fréquences positives uniquement. En négligeant la dissipation ($\chi^{(1)}$ est alors réel), on a :

$$\mathbf{P}^{(1)} = \varepsilon_0 \chi^{(1)} \mathbf{E} \quad (\text{E.12})$$

on peut alors écrire :

$$\mathbf{D}_n^{(1)}(\mathbf{r}, t) = \varepsilon_0 \varepsilon_R^{(1)}(\omega_n) \mathbf{E}_n(\mathbf{r}, t) = \varepsilon^{(1)}(\omega_n) \mathbf{E}_n(\mathbf{r}, t) \quad (\text{E.13})$$

où ε_R est la permittivité relative :

$$\varepsilon_R^{(1)} = 1 + \chi^{(1)} \quad (\text{E.14})$$

ce qui conduit à l'équation de propagation :

$$\nabla^2 \mathbf{E}_n - \frac{\varepsilon^{(1)}(\omega_n)}{c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{E}_n}{\partial t^2} = \frac{1}{\varepsilon_0 c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{P}^{(n)}}{\partial t^2} \quad (\text{E.15})$$

Sous cette forme on voit immédiatement que les termes non-linéaires apparaissent comme les termes sources des rayonnements harmoniques. En effet, en leur absence ($\mathbf{P}^{NL} = \mathbf{0}$), on retrouve l'équation de propagation classique d'une onde monochromatique dans le vide.

Dans le cas d'un matériau isotrope, la permittivité relative s'écrit simplement :

$$\varepsilon^{(1)} = n^2 \quad (\text{E.16})$$

où ω_n est la fréquence de la n^e harmonique : $\omega_n = n\omega$. Ce qui se réécrit finalement :

$$\nabla^2 \mathbf{E}_n(\mathbf{r}, \omega_n) - \frac{n(\omega_n)^2 \omega_n^2}{c^2} \mathbf{E}_n(\mathbf{r}, \omega_n) = \frac{\omega_n^2}{\varepsilon_0 c^2} \mathbf{P}_n^{NL}(\mathbf{r}, \omega_n) \quad (\text{E.17})$$

Table des figures

I.1	Principaux acides aminés du collagène	8
I.2	Structure protéique du collagène	9
I.3	Synthèse du collagène <i>in vivo</i>	11
I.4	Assemblage des triples hélices	13
I.5	Structure hiérarchique	14
I.6	Exemples de structures du collagène dans les tissus	14
I.7	Imagerie biomédicale	16
I.8	Microscope électronique	17
I.9	Coupe histologique	19
I.10	Microscopie en lumière réfléchie	21
II.1	Fluorescence excitée à 1 et 2 photons	27
II.2	Laser impulsionnel	28
II.3	Distribution spatiale de l'intensité	29
II.4	Fenêtre de transparence dans les tissus	32
II.5	Schéma de diffusion dans l'échantillon	33
II.6	Raster scan	35
II.7	Principe du photo-blanchiment	37
II.8	Modes de contraste	38
II.9	Diffusion élastique	39
II.10	Diffusion harmonique	41
II.11	Molécules push-pull	42
II.12	Conditions de non centrosymétrie	43
II.13	Angles d'Euler	45
II.14	Rayonnement en champ lointain	48
II.15	Diffusion Hyper-Rayleigh	49
II.16	Génération de seconde harmonique	50
II.17	SHG dans les tissus	51
II.18	Accord de phase	52
II.19	Liaison peptidique	56
II.20	Structure hiérarchique du collagène	57
II.21	Spécificité de la SHG pour le collagène fibrillaire	59
II.22	Schéma du microscope	61
II.23	Volume focal	62
III.1	Point isoélectrique du collagène	70
III.2	Fibrilles de collagène observées en TEM	71

Table des figures

III.3	Croissance du réseau collagénique	72
III.4	Évolution de la densité de collagène	73
III.5	Début de fibrillogenèse	74
III.6	Statistique de cinétique	75
III.7	Croissance d'une fibrille isolée	76
III.8	Cinétique de croissance d'une fibrille isolée	77
III.9	Fonctionnalisation des nanoparticules de silice	80
III.10	Confinement du collagène	81
III.11	Schéma de pontage entre les nanoparticules	81
III.12	Pontage entre les nanoparticules	82
III.13	Fibrillogenèse en présence de nanoparticules	83
III.14	Échantillon silice/collagène à différentes profondeurs	84
III.15	Analyse préliminaire	85
III.16	Histogramme préliminaire	86
III.17	Seuillage par hystérésis	88
III.18	Segmentation des nanoparticules de silice	89
III.19	Fonction distance 3D	90
III.20	Classe de distance en 3D	90
III.21	Densité de photons	91
III.22	Influence du traitement des images SHG	92
III.23	Impact de la fonctionnalisation sur la densité de collagène	93
III.24	Statistique de densité :	94
III.25	Portée d'influence des nanoparticules	95
III.26	Portée d'interaction moyenne	96
III.27	Structuration autour des nanoparticules	97
IV.1	Géométrie du système	103
IV.2	Faisceau gaussien	105
IV.3	Signal SHG émis par des fibrilles de collagène de diamètre variable	109
IV.4	Simulations numériques	111
IV.5	Schéma du montage	112
IV.6	Imagerie corrélative SHG/TEM	113
IV.7	Rupture des fibrilles durant l'imagerie	114
IV.8	Traitement des images corrélatives	117
IV.9	Courbes de corrélation entre le signal SHG et le diamètre des fibrilles mesuré en TEM	117
IV.10	Calibration du signal SHG pour des classes de diamètre	118
V.1	Structure de la peau	131
V.2	Préparation d'un échantillon	133
V.3	Dispositif expérimental	134
V.4	Mesures mécaniques	135
V.5	Images des dermes papillaire et réticulaire	136
V.6	Images SHG à différents pas de déformation	137
V.7	Segmentation des follicules pileux	139
V.8	Images segmentées des follicules pileux	140
V.9	Déformation des follicules	141

Table des figures

V.10	Déformation moyenne des follicules pileux	141
V.11	Termes diagonaux du tenseur des déformations	142
V.12	Termes anti-diagonaux du tenseur des déformations	143
V.13	Carte du tenseur de déformation	144
V.14	Déformation des follicules pileux	145
V.15	Ouverture linéaire	146
V.16	Ouverture linéaire pour deux orientations d'élément structurant	147
V.17	Détection de l'orientation locale sur une mire	148
V.18	Histogrammes des orientations	148
V.19	Orientation de fibrilles de collagène	149
V.20	Moyenne de la déformation locale	151
V.21	Réorganisation du réseau collagénique lors de la traction	153
V.22	Distributions des orientations	154
V.23	Angle principal de la distribution	154
V.24	Index d'orientation et entropie	155
V.25	Pente de l'index d'orientation et de l'entropie	155
V.26	Schéma d'une courbe contrainte/déformation pour la peau	157
V.27	Correlation entre la contrainte dans l'échantillon et la réorganisation du collagène	158
V.28	Index d'orientation, entropie et réponse mécanique des tissus	159
A.1	Schéma des expérience HRS	168
A.2	Triple hélice dans le repère du laboratoire	170
C.1	Dosage de l'hydroxyproline	177
D.1	Dilatation et érosion	178
D.2	Ouverture et fermeture	180
D.3	Éléments structurant	180

Liste des tableaux

I.1	Familles de collagène	6
I.2	types de collagène	7
II.1	Objectifs utilisés	62
III.1	Temps caractéristiques de fibrillogenèse	74
III.2	Temps caractéristiques moyens de fibrillogenèse	75
III.3	Densité au voisinage des nanoparticules	87
III.4	Portées d'interaction moyennes	96
IV.1	Sensibilité du microscope SHG	116
IV.2	Mesure de la première hyperpolarisabilité d'une triple hélice de collagène à partir des signaux SHG	120
V.1	Bilan des échantillons étudiés	133
V.2	Bilan des déformations pour l'ensemble des souris étudiées	152
V.3	Bilan des réorientations pour l'ensemble des souris étudiées	156
C.4	Gel de migration	174
C.5	Gel de concentration	175
C.6	Dosage hydroxyprolique	176

Bibliographie

- [1] W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb, “Two-photon laser scanning fluorescence microscopy,” *Science*, vol. 248, pp. 73–76, Apr. 1990.
- [2] R. Yuste and W. Denk, “Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration,” *Nature*, vol. 375, pp. 682–684, 1995.
- [3] S. Charpak, J. Mertz, E. Beaurepaire, L. Moreaux, and K. Delaney, “Odor-evoked calcium signals in dendrites of rat mitral cells,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, pp. 1230–1234, Jan. 2001.
- [4] Z. F. Mainen, R. Malinow, and K. Svoboda, “Synaptic calcium transients in single spines indicate that NMDA receptors are not saturated,” *Nature*, vol. 399, pp. 151–155, May 1999.
- [5] W. Wang, J. Wyckoff, and V. Frohlich, “Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling,” *Cancer Research*, vol. 62, pp. 6278–6288, 2002.
- [6] E. B. Brown, R. B. Campbell, Y. Tsuzuki, L. Xu, P. Carmeliet, D. Fukumura, and R. K. Jain, “In vivo measurement of gene expression, angiogenesis and physiological function in tumors using multiphoton laser scanning microscopy,” *Nature Medicine*, vol. 7, pp. 864–868, July 2001.
- [7] J. M. Squirrell, D. L. Wokosin, J. G. White, and B. D. Bavister, “Long-term two-photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability,” *Nature Biotechnology*, vol. 17, no. 8, pp. 763–767, 1999.
- [8] D. Débarre, W. Supatto, E. Farge, B. Moulia, M.-C. Schanne-Klein, and E. Beaurepaire, “Velocimetric third-harmonic generation microscopy : micrometer-scale quantification of morphogenetic movements in unstained embryos,” *Optics Letters*, vol. 29, pp. 2881–2883, Dec. 2004.
- [9] W. Supatto, D. Débarre, B. Moulia, E. Brouzés, J.-L. Martin, E. Farge, and E. Beaurepaire, “In vivo modulation of morphogenetic movements in Drosophila embryos with femtosecond laser pulses,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, pp. 1047–52, Jan. 2005.
- [10] N. D. Lawson and B. M. Weinstein, “In Vivo Imaging of Embryonic Vascular Development Using Transgenic Zebrafish,” *Developmental Biology*, vol. 248, pp. 307–318, Aug. 2002.
- [11] D. Débarre, E. Botcherby, T. Watanabe, S. Srinivas, M. J. Booth, and T. Wilson, “Image-based adaptive optics for two-photon microscopy,” *Optics Letters*, vol. 34, no. 16, pp. 2495–2497, 2009.

- [12] A. Facomprez, E. Beaurepaire, and D. Débarre, “Accuracy of correction in modal sensorless adaptive optics.,” *Optics Express*, vol. 20, pp. 2598–612, Jan. 2012.
 - [13] N. Olivier, D. DéBarre, P. Mahou, and E. Beaurepaire, “Third-harmonic generation microscopy with Bessel beams : a numerical study.,” *Optics Express*, vol. 20, pp. 24886–902, Oct. 2012.
 - [14] P. Mahou, M. Zimmerley, K. Loulier, K. S. Matho, G. Labroille, X. Morin, W. Supatto, J. Livet, D. Debarre, and E. Beaurepaire, “Multicolor two-photon tissue imaging by wavelength mixing,” *Nature Method*, vol. 9, pp. 815–818, Aug. 2012.
 - [15] I. Gusachenko, G. Latour, and M.-C. Schanne-Klein, “Polarization-resolved Second Harmonic microscopy in anisotropic thick tissues.,” *Optics Express*, vol. 18, pp. 19339–52, Aug. 2010.
 - [16] G. Latour, I. Gusachenko, L. Kowalczyk, I. Lamarre, and M.-C. Schanne-Klein, “In vivo structural imaging of the cornea by polarization-resolved second harmonic microscopy,” *Biomedical Optics Express*, vol. 3, no. 1, pp. 1–15, 2011.
 - [17] N. Olivier, F. Aptel, K. Plamann, M.-C. Schanne-Klein, and E. Beaurepaire, “Harmonic microscopy of isotropic and anisotropic microstructure of the human cornea.,” *Optics Express*, vol. 18, pp. 5028–40, Mar. 2010.
 - [18] M. Zimmerley, P. Mahou, D. Débarre, M.-C. Schanne-Klein, and E. Beaurepaire, “Probing Ordered Lipid Assemblies with Polarized Third-Harmonic-Generation Microscopy,” *Physical Review X*, vol. 3, p. 011002, Jan. 2013.
 - [19] G. Latour, G. Georges, L. S. Lamoine, C. Deumié, J. Conrath, and L. Hoffart, “Human graft cornea and laser incisions imaging with micrometer scale resolution full-field optical coherence tomography,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 15, no. 5, p. 56006, 2010.
 - [20] G. Latour, G. Georges, L. S. Lamoine, C. Deumié, J. Conrath, and L. Hoffart, “Light scattering from human corneal grafts : Bulk and surface contribution,” *Journal of Applied Physics*, vol. 108, no. 5, p. 53104, 2010.
 - [21] F. Aptel, N. Olivier, A. Deniset-Besseau, J.-M. Legeais, K. Plamann, M.-C. Schanne-Klein, and E. Beaurepaire, “Multimodal nonlinear imaging of the human cornea.,” *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 51, pp. 2459–65, May 2010.
 - [22] I. Gusachenko, V. Tran, Y. Goulam Houssen, J.-M. Allain, and M.-C. Schanne-Klein, “Polarization-Resolved Second-Harmonic Generation in Tendon upon Mechanical Stretching.,” *Biophysical Journal*, vol. 102, pp. 2220–9, May 2012.
 - [23] A. Deniset-Besseau, P. De Sa Peixoto, G. Mosser, and M.-C. Schanne-Klein, “Nonlinear optical imaging of lyotropic cholesteric liquid crystals.,” *Optics Express*, vol. 18, pp. 1113–21, Jan. 2010.
 - [24] H. Altendorf, E. Decenci re, D. Jeulin, P. D. S. Peixoto, A. Deniset-Besseau, E. Angelini, G. Mosser, and M.-C. Schanne-Klein, “Imaging and 3D morphological analysis of collagen fibrils.,” *Journal of Microscopy*, vol. 247, pp. 161–175, June 2012.
 - [25] A.-M. Pena, A. Fabre, and D. Debarre, “Three-Dimensional Investigation and Scoring of Extracellular Matrix Remodeling During Lung Fibrosis Using Multiphoton Microscopy,” *Microscopy Research and Technique*, vol. 70, pp. 162–170, 2007.
-

Bibliographie

- [26] M. Strupler, A.-M. Pena, M. Hernest, P.-L. Tharaux, J.-L. Martin, E. Beaupaire, and M.-C. Schanne-Klein, "Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues.," *Optics Express*, vol. 15, pp. 4054–65, Apr. 2007.
- [27] K. E. Kadler, C. Baldock, J. Bella, and R. P. Boot-Handford, "Collagens at a glance.," *Journal of Cell Science*, vol. 120, pp. 1955–8, June 2007.
- [28] S. Ricard-Blum and F. Ruggiero, "The collagen superfamily : from the extracellular matrix to the cell membrane.," *Pathologie-Biologie*, vol. 53, pp. 430–42, Sept. 2005.
- [29] M. van der Rest and R. Garrone, "Collagen family of proteins.," *The FASEB Journal*, vol. 5, no. 60, pp. 2814–2823, 1991.
- [30] D. J. Prockop and K. I. Kivirikko, "Collagens : molecular biology, diseases, and potentials for therapy.," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 64, pp. 403–34, Jan. 1995.
- [31] K. Beck and B. Brodsky, "Supercoiled protein motifs : the collagen triple-helix and the alpha-helical coiled coil.," *Journal of Structural Biology*, vol. 122, pp. 17–29, Jan. 1998.
- [32] R. Z. Kramer, L. Vitagliano, J. Bella, R. Berisio, L. Mazzarella, B. Brodsky, A. Zagari, and H. M. Berman, "X-ray crystallographic determination of a collagen-like peptide with the repeating sequence (Pro-Pro-Gly).," *Journal of Molecular Biology*, vol. 280, pp. 623–38, July 1998.
- [33] J. Engel and D. Prockop, "The zipper-like folding of collagen triple helices and the effects of mutations that disrupt the zipper," *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, vol. 20, pp. 137–152, 1991.
- [34] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, and K. Roberts, *Molecular Biology of the Cell*. National Center for Biotechnology Information Bookshelf, 4th ed., 2002.
- [35] R. Fleischmajer, J. Perlish, and B. Olsen, "The carboxylpropeptide of type I procollagen in skin fibrillogenesis," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 89, pp. 212–215, 1987.
- [36] J. Molnar, K. Fong, Q. He, K. Hayashi, Y. Kim, S. Fong, B. Fogelgren, K. Molnarne Szauter, M. Mink, and K. Csiszar, "Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, vol. 1647, pp. 220–224, Apr. 2003.
- [37] S. Ricard-Blum and G. Ville, "Collagen cross-linking.," *The International Journal of Biochemistry*, vol. 21, no. 11, p. 1185, 1989.
- [38] D. J. Hulmes, T. J. Wess, D. J. Prockop, and P. Fratzl, "Radial packing, order, and disorder in collagen fibrils.," *Biophysical Journal*, vol. 68, pp. 1661–70, May 1995.
- [39] D. J. S. Hulmes, "Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures.," *Journal of Structural Biology*, vol. 137, no. 1-2, pp. 2–10, 2002.
- [40] J. P. R. O. Orgel, A. Miller, T. C. Irving, R. F. Fischetti, A. P. Hammersley, T. J. Wess, and S. Fk, "Structure of Type I Collagen," *Structure*, vol. 9, no. 01, pp. 1061–1069, 2001.
- [41] P. Fratzl, K. Misof, I. Zizak, G. Rapp, H. Amenitsch, and S. Bernstorff, "Fibrillar structure and mechanical properties of collagen.," *Journal of Structural Biology*, vol. 122, pp. 119–22, Jan. 1998.

- [42] P. Fratzl and R. Weinkamer, "Nature's hierarchical materials," *Progress in Materials Science*, vol. 52, pp. 1263–1334, Nov. 2007.
 - [43] R. B. Svensson, T. Hassenkam, C. a. Grant, and S. P. Magnusson, "Tensile properties of human collagen fibrils and fascicles are insensitive to environmental salts.," *Biophysical Journal*, vol. 99, pp. 4020–7, Dec. 2010.
 - [44] A. Gautieri, S. Vesentini, A. Redaelli, and M. J. Buehler, "Hierarchical structure and nanomechanics of collagen microfibrils from the atomistic scale up.," *Nano Letters*, vol. 11, pp. 757–66, Feb. 2011.
 - [45] Y. Komai and T. Ushiki, "The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera.," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 32, pp. 2244–58, July 1991.
 - [46] T. Ushiki, "Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint.," *Archives of Histology and Cytology*, vol. 65, pp. 109–126, 2002.
 - [47] P. C. Trackman, "Diverse biological functions of extracellular collagen processing enzymes.," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 96, pp. 927–37, Dec. 2005.
 - [48] D. Debarre, "Microscopie par génération de troisième harmonique appliquée à la biologie.," *Phd report*, 2006.
 - [49] F. O. Schmitt, C. E. Hall, and M. A. Jakus, "Electron microscope investigations of the structure of collagen," *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, vol. 20, no. 1, pp. 11–33, 1942.
 - [50] C. E. Hall, M. A. Jakus, and F. O. Schmitt, "Electron microscope observations of collagen," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 64, no. 5, p. 1234, 1942.
 - [51] K. E. Kadler, D. F. Holmes, J. a. Trotter, and J. a. Chapman, "Collagen fibril formation.," *The Biochemical Journal*, vol. 316, pp. 1–11, May 1996.
 - [52] D. E. Birk, E. I. Zycband, D. a. Winkelmann, and R. L. Trelstad, "Collagen fibrillogenesis in situ : fibril segments are intermediates in matrix assembly.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 86, pp. 4549–53, June 1989.
 - [53] B. Drake, C. B. Prater, A. L. Weisenhorn, S. A. C. Gould, T. R. Albrecht, C. F. Quate, D. S. Cannell, H. G. Hansma, and P. K. Hansma, "Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope," *Science*, vol. 243, no. 4898, pp. 1586–1589, 1989.
 - [54] M. Gale, M. S. Pollanen, P. Markiewicz, and M. C. Goh, "Sequential assembly of collagen revealed by atomic force microscopy.," *Biophysical Journal*, vol. 68, pp. 2124–8, May 1995.
 - [55] D. R. Baselt, J. P. Revel, and J. D. Baldeschwieler, "Subfibrillar structure of type I collagen observed by atomic force microscopy.," *Biophysical Journal*, vol. 65, pp. 2644–55, Dec. 1993.
 - [56] L. Bozec and M. Horton, "Topography and mechanical properties of single molecules of type I collagen using atomic force microscopy.," *Biophysical Journal*, vol. 88, pp. 4223–31, June 2005.
-

Bibliographie

- [57] T. Gutschmann, G. E. Fantner, J. H. Kindt, M. Venturoni, S. Danielsen, and P. K. Hansma, "Force spectroscopy of collagen fibers to investigate their mechanical properties and structural organization.," *Biophysical Journal*, vol. 86, pp. 3186–93, May 2004.
- [58] S.-W. Chu, S.-P. Tai, M.-C. Chan, C.-K. Sun, I.-C. Hsiao, C.-H. Lin, Y.-C. Chen, and B.-L. Lin, "Thickness dependence of optical second harmonic generation in collagen fibrils.," *Optics Express*, vol. 15, pp. 12005–10, Sept. 2007.
- [59] F. Böhmer, "Zur pathologischen Anatomie der Meningitis cerebromedularis epidemica," *Aerztl Intelligenzb*, vol. 12, pp. 539–550, 1865.
- [60] P. Masson, "Some histological methods. Trichrome stainings and their preliminary technique," *Bull Int Assoc Med*, vol. 12, p. 75, 1929.
- [61] F. Sweat, H. Puchtler, and S. I. Rosenthal, "Sirius red F3BA as a stain for connective tissue," *Archives of Pathology*, vol. 78, pp. 69–72, 1964.
- [62] L. C. Junqueira, G. Bignolas, and R. R. Brentani, "Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections.," *The Histochemical Journal*, vol. 11, pp. 447–55, July 1979.
- [63] V. S. Constantine and R. W. Mowry, "Selective staining of human dermal collagen. II. The use of picrosirius red F3BA with polarization microscopy.," *The Journal of Investigative Dermatology*, vol. 50, pp. 419–423, May 1968.
- [64] G. Bourg-Heckly, J. Blais, J.-J. Padilla, O. Bourdon, J. Etienne, F. Guillemain, and L. Lafay, "Endoscopic ultraviolet-induced autofluorescence spectroscopy of the esophagus : tissue characterization and potential for early cancer diagnosis," *Endoscopy*, vol. 32, no. 10, pp. 756–765, 2000.
- [65] L. Thiberville, S. Moreno-Swirc, T. Vercauteren, E. Peltier, C. Cavé, and G. Bourg Heckly, "In vivo imaging of the bronchial wall microstructure using fibered confocal fluorescence microscopy.," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 175, pp. 22–31, Jan. 2007.
- [66] L. Thiberville, M. Salaün, S. Lachkar, S. Dominique, S. Moreno-Swirc, C. Vever-Bizet, and G. Bourg-Heckly, "Human in vivo fluorescence microimaging of the alveolar ducts and sacs during bronchoscopy.," *The European Respiratory Journal*, vol. 33, pp. 974–85, May 2009.
- [67] L. Thiberville, M. Salaün, S. Lachkar, S. Moreno-Swirc, and G. Bourg-Heckly, "In vivo confocal endomicroscopy of peripheral lung nodules using 488 nm/660 nm induced fluorescence and topical methylene blue," *European Respiratory Society Annual Congress*, 2008.
- [68] R. Richards-Kortum and E. Sevick-Muraca, "Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis.," *Annual Review of Physical Chemistry*, vol. 47, pp. 555–606, Jan. 1996.
- [69] P. F. Davison and E. J. Galbavy, "Fluorescent dyes demonstrate the uniform expansion of the growing rabbit cornea.," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 26, pp. 1202–9, Sept. 1985.
- [70] Y. Feng and T. Simpson, "Comparison of human central cornea and limbus in vivo using optical coherence tomography," *Optometry & Vision Science*, vol. 82, no. 5, pp. 416–419, 2005.

- [71] A. G. Podoleanu, J. A. Rogers, and D. A. Jackson, "OCT en-face images from the retina with adjustable depth resolution in real time," *IEEE Journal of Quantum Electronics*, vol. 5, no. 4, pp. 1176–1184, 1999.
 - [72] A. O. Brightman, B. P. Rajwa, J. E. Sturgis, M. E. McCallister, J. P. Robinson, and S. L. Voytik-Harbin, "Time-lapse confocal reflection microscopy of collagen fibrillogenesis and extracellular matrix assembly in vitro.," *Biopolymers*, vol. 54, pp. 222–34, Sept. 2000.
 - [73] G. Mosser, A. Anglo, C. Helary, Y. Bouligand, and M.-M. Giraud-Guille, "Dense tissue-like collagen matrices formed in cell-free conditions.," *Matrix biology*, vol. 25, pp. 3–13, Jan. 2006.
 - [74] F. Gobeaux, E. Belamie, G. Mosser, P. Davidson, P. Panine, and M.-M. Giraud-Guille, "Cooperative ordering of collagen triple helices in the dense state.," *Langmuir*, vol. 23, pp. 6411–7, May 2007.
 - [75] B. de Campos Vidal, "Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy.," *Micron*, vol. 34, pp. 423–32, Jan. 2003.
 - [76] B. Laude-Boulesteix, A. De Martino, B. Drévilion, and L. Schwartz, "Mueller polarimetric imaging system with liquid crystals.," *Applied Optics*, vol. 43, pp. 2824–32, May 2004.
 - [77] W. R. Zipfel, R. M. Williams, and W. W. Webb, "Nonlinear magic : multiphoton microscopy in the biosciences.," *Nature Biotechnology*, vol. 21, pp. 1369–77, Nov. 2002.
 - [78] K. König, "Multiphoton microscopy in life sciences," *Journal of Microscopy*, vol. 200, no. June, pp. 83–104, 2000.
 - [79] P. Franken, A. Hill, C. Peters, and G. Weinreich, "Generation of optical harmonics," *Physical Review Letters*, vol. 7, no. 1, pp. 118–120, 1961.
 - [80] S. Roth and I. Freund, "Second harmonic generation in collagen," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 70, no. 4, p. 1637, 1979.
 - [81] I. Freund and M. Deutsch, "Second-harmonic microscopy of biological tissue.," *Optics Letters*, vol. 11, p. 94, Feb. 1986.
 - [82] Y. Barad, H. Eisenberg, M. Horowitz, and Y. Silberberg, "Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation," *Applied Physics Letters*, vol. 70, no. 8, pp. 922–924, 1997.
 - [83] M. D. Duncan, J. Reintjes, and T. J. Manuccia, "Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope.," *Optics Letters*, vol. 7, pp. 350–2, Aug. 1982.
 - [84] J. Mertz, "Nonlinear microscopy : new techniques and applications.," *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 14, pp. 610–6, Oct. 2004.
 - [85] A. McMahon, W. Supatto, S. Fraser, and A. Stathopoulos, "Dynamic analyses of *Drosophila* gastrulation provide insights into collective cell migration," *Science*, vol. 322, no. December, pp. 1546–1550, 2008.
 - [86] N. Olivier, M. A. Luengo-Oroz, L. Duloquin, E. Faure, T. Savy, I. Veilleux, X. Solinas, D. Débarre, P. Bourguine, A. Santos, N. Peyri  ras, and E. Beaurepaire, "Cell lineage reconstruction of early zebrafish embryos using label-free nonlinear microscopy.," *Science*, vol. 329, pp. 967–71, Aug. 2010.
-

Bibliographie

- [87] M. Göppert-Mayer, “Elementary processes with two quantum transitions,” *Annalen der Physik*, vol. 18, pp. 466–479, Aug. 2009.
- [88] R. W. Boyd, *Nonlinear optics*. New York : San Diego, CA (United States); Academic Press Inc., 1992.
- [89] Y.-R. Shen, “The principles of nonlinear optics,” *New York, Wiley-Interscience, 1984, 575 p.*, vol. 1, 1984.
- [90] J. Mertz, “Nonlinear microscopy,” *Comptes Rendus de l’Académie des Sciences - Series IV - Physics*, vol. 2, pp. 1153–1160, Oct. 2001.
- [91] D. Ganic, X. Gan, and M. Gu, “Reduced effects of spherical aberration on penetration depth under two-photon excitation,” *Applied Optics*, vol. 39, pp. 3945–7, Aug. 2000.
- [92] P. Theer and W. Denk, “On the fundamental imaging-depth limit in two-photon microscopy,” *Journal of the Optical Society of America A*, vol. 23, pp. 3139–49, Dec. 2006.
- [93] M. J. Booth and T. Wilson, “Refractive-index-mismatch induced aberrations in single-photon and two-photon microscopy and the use of aberration correction,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 6, pp. 266–272, July 2001.
- [94] J. Zeng, P. Mahou, M.-C. Schanne-Klein, E. Beaurepaire, and D. Débarre, “3D resolved mapping of optical aberrations in thick tissues,” *Biomedical Optics Express*, vol. 3, pp. 1898–913, Aug. 2012.
- [95] J. Bewersdorf, R. Pick, and S. W. Hell, “Multifocal multiphoton microscopy,” *Optics Letters*, vol. 23, pp. 655–7, Jan. 1998.
- [96] A. Buist, M. Müller, J. Squier, and G. Brakenhoff, “Real time two-photon absorption microscopy using multi point excitation,” *Journal of Microscopy*, vol. 192, no. July, pp. 217–226, 1998.
- [97] V. Andresen, A. Egner, and S. W. Hell, “Time-multiplexed multifocal multiphoton microscope,” *Optics Letters*, vol. 26, pp. 75–7, Jan. 2001.
- [98] P. Keller, A. Schmidt, J. Wittbrodt, and E. Stelzer, “Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy,” *Science*, vol. 322, no. November, pp. 1065–1069, 2008.
- [99] F. Fahrbach and A. Rohrbach, “A line scanned light-sheet microscope with phase shaped self-reconstructing beams,” *Optics Express*, vol. 18, no. 23, pp. 2608–2610, 2010.
- [100] W. Supatto, T. V. Truong, D. Débarre, and E. Beaurepaire, “Advances in multiphoton microscopy for imaging embryos,” *Current Opinion in Genetics & Development*, vol. 21, pp. 538–48, Oct. 2011.
- [101] D. Débarre, A. Pena, W. Supatto, T. Boulesteix, M. Strupler, M. Sauviat, J. Martin, M. Schanne-Klein, E. Beaurepaire, and Others, “Microscopies multi-harmoniques pour l’imagerie structurale de tissus intacts,” *M/S : Médecine Sciences*, vol. 22, no. 10, pp. 845–850, 2006.
- [102] A. Volkmer, “Vibrational imaging and microspectroscopies based on coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy,” *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 38, pp. R59–R81, Mar. 2005.

- [103] D. Débarre, W. Supatto, and E. Beaurepaire, "Structure sensitivity in third-harmonic generation microscopy," *Optics Letters*, vol. 30, pp. 2134–6, Aug. 2005.
- [104] D. Debarre, W. Supatto, A.-M. Pena, A. Fabre, T. Tordjmann, L. Combettes, M.-C. Schanne-Klein, and E. Beaurepaire, "Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy," *Nature Method*, vol. 3, pp. 47–53, Jan. 2006.
- [105] D. Débarre, N. Olivier, and E. Beaurepaire, "Signal epidetection in third-harmonic generation microscopy of turbid media.," *Optics Express*, vol. 15, pp. 8913–24, July 2007.
- [106] P. Mahou, N. Olivier, G. Labroille, L. Duloquin, J.-M. Sintès, N. Peyri  ras, R. Legouis, D. D  barre, and E. Beaurepaire, "Combined third-harmonic generation and four-wave mixing microscopy of tissues and embryos.," *Biomedical Optics Express*, vol. 2, pp. 2837–49, Oct. 2011.
- [107] D. S. Chemla and J. Zyss, *Nonlinear optical properties of organic molecules and crystals*, vol. 1. Academic Press, 1987.
- [108] J. L. Oudar and D. S. Chemla, "Hyperpolarizabilities of the nitroanilines and their relations to the excited state dipole moment," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 66, no. 6, p. 2664, 1977.
- [109] K. D. Singer, M. G. Kuzyk, and J. E. Sohn, "Second-order nonlinear-optical processes in orientationally ordered materials : relationship between molecular and macroscopic properties," *Journal of the Optical Society of America B*, vol. 4, p. 968, June 1987.
- [110] R. Terhune, P. Maker, and C. Savage, "Measurements of nonlinear light scattering," *Physical Review Letters*, vol. 14, no. April, 1965.
- [111] P. Maker, "Spectral Broadening of Elastic Second-Harmonic Light Scattering in Liquids," *Physical Review A*, vol. 1, pp. 923–951, Mar. 1970.
- [112] K. Clays and A. Persoons, "Hyper-Rayleigh scattering in solution.," *Physical Review Letters*, vol. 66, pp. 2980–2983, June 1991.
- [113] K. Clays, E. Hendrickx, M. Triest, T. Verbiest, A. Persoons, C. Dehu, and J. L. Br  das, "Nonlinear optical properties of proteins measured by hyper-rayleigh scattering in solution.," *Science*, vol. 262, pp. 1419–22, Nov. 1993.
- [114] E. Hendrickx, K. Clays, and A. Persoons, "Hyper-Rayleigh scattering in isotropic solution," *Accounts of Chemical Research*, vol. 31, no. 10, pp. 675–683, 1998.
- [115] A. Deniset-Besseau, J. Duboisset, E. Benichou, F. Hache, P.-F. Brevet, and M.-C. Schanne-Klein, "Measurement of the second-order hyperpolarizability of the collagen triple helix and determination of its physical origin.," *The Journal of Physical Chemistry. B*, vol. 113, pp. 13437–45, Oct. 2009.
- [116] K. N. Anisha Thayil, E. J. Gualda, S. Psilodimitrakopoulos, I. G. Cormack, I. Amat-Rold  n, M. Mathew, D. Artigas, and P. Loza-Alvarez, "Starch-based backwards SHG for in situ MEFISTO pulse characterization in multiphoton microscopy," *Journal of Microscopy*, vol. 230, pp. 70–5, Apr. 2008.
- [117] V. Nucciotti, C. Stringari, L. Sacconi, F. Vanzi, L. Fusi, M. Linari, G. Piazzesi, V. Lombardi, and F. S. Pavone, "Probing myosin structural conformation in vivo

Bibliographie

- by second-harmonic generation microscopy,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, pp. 7763–8, Apr. 2010.
- [118] P. J. Campagnola, A. C. Millard, M. Terasaki, P. E. Hoppe, C. J. Malone, and W. A. Mohler, “Three-Dimensional High-Resolution Second-Harmonic Generation Imaging of Endogenous Structural Proteins in Biological Tissues,” *Biophysical Journal*, vol. 81, no. May 2001, pp. 493–508, 2002.
- [119] D. A. Dombeck, K. A. Kasischke, H. D. Vishwasrao, M. Ingelsson, B. T. Hyman, and W. W. Webb, “Uniform polarity microtubule assemblies imaged in native brain tissue by second-harmonic generation microscopy,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, pp. 7081–6, June 2003.
- [120] G. Cox, N. Moreno, and J. Feijo, “Second-harmonic imaging of plant polysaccharides,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 10, p. 24013, Mar. 2005.
- [121] G. Latour, J.-P. Echard, M. Didier, and M.-C. Schanne-Klein, “In situ 3D characterization of historical coatings and wood using multimodal nonlinear optical microscopy,” *Optics Express*, vol. 4815, no. 2010, pp. 1369–1377, 2012.
- [122] L. Sacconi, M. D’Amico, F. Vanzi, T. Biagiotti, R. Antolini, M. Olivotto, and F. S. Pavone, “Second-harmonic generation sensitivity to transmembrane potential in normal and tumor cells,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 10, p. 24014, Mar. 2005.
- [123] D. Dombeck, M. Blanchard-Desce, and W. Webb, “Optical recording of action potentials with second-harmonic generation microscopy,” *The Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 4, pp. 999–1003, 2004.
- [124] A. C. Millard, L. Jin, M.-D. Wei, J. P. Wuskell, A. Lewis, and L. M. Loew, “Sensitivity of second harmonic generation from styryl dyes to transmembrane potential,” *Biophysical Journal*, vol. 86, pp. 1169–76, Feb. 2004.
- [125] S. Roth and I. Freund, “Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon,” *Biopolymers*, vol. 20, pp. 1271–1290, June 1981.
- [126] S. Roth and I. Freund, “Second harmonic generation and orientational order in connective tissue : a mosaic model for fibril orientational ordering in rat-tail tendon,” *Journal of Applied Crystallography*, vol. 15, pp. 72–78, Feb. 1982.
- [127] I. Freund, M. Deutsch, and A. Sprecher, “Connective tissue polarity. Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon,” *Biophysical Journal*, vol. 50, pp. 693–712, Oct. 1986.
- [128] I. Freund and M. Deutsch, “Macroscopic polarity of connective tissue is due to discrete polar structures,” *Biopolymers*, vol. 25, pp. 601–606, Apr. 1986.
- [129] P. Stoller, B.-M. Kim, A. M. Rubenchik, K. M. Reiser, and L. B. Da Silva, “Polarization-dependent optical second-harmonic imaging of a rat-tail tendon,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 7, pp. 205–14, Apr. 2002.
- [130] A. Lembares, X. H. Hu, and G. W. Kalmus, “Absorption spectra of corneas in the far ultraviolet region,” *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 38, pp. 1283–7, May 1997.
- [131] C. Loison and D. Simon, “Additive model for the second harmonic generation hyperpolarizability applied to a collagen-mimicking peptide (Pro-Pro-Gly)₁₀,” *The Journal of Physical Chemistry. A*, vol. 114, pp. 7769–79, July 2010.

- [132] C. A. Dailey, B. J. Burke, and G. J. Simpson, "The general failure of Kleinman symmetry in practical nonlinear optical applications," *Chemical Physics Letters*, vol. 390, pp. 8–13, May 2004.
 - [133] N. Bloembergen, *Nonlinear optics*. World Scientific, 1996.
 - [134] A.-M. Pena, T. Boulesteix, T. Dartigalongue, and M.-C. Schanne-Klein, "Chiroptical effects in the second harmonic signal of collagens I and IV.," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 127, pp. 10314–22, July 2005.
 - [135] A. E. Tuer, S. Krouglov, N. Prent, R. Cisek, D. Sandkuijl, K. Yasufuku, B. C. Wilson, and V. Barzda, "Nonlinear optical properties of type I collagen fibers studied by polarization dependent second harmonic generation microscopy.," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 115, pp. 12759–69, Nov. 2011.
 - [136] S. V. Plotnikov, A. C. Millard, P. J. Campagnola, and W. A. Mohler, "Characterization of the myosin-based source for second-harmonic generation from muscle sarcomeres.," *Biophysical Journal*, vol. 90, pp. 693–703, Jan. 2006.
 - [137] A. Tuer, S. Krouglov, and R. Cisek, "Three dimensional visualization of the first hyperpolarizability tensor," *Journal of Computational Chemistry*, 2011.
 - [138] R. M. Williams, W. R. Zipfel, and W. W. Webb, "Interpreting second-harmonic generation images of collagen I fibrils.," *Biophysical Journal*, vol. 88, pp. 1377–86, Feb. 2005.
 - [139] C. Odin, Y. L. Grand, A. Renault, L. Gailhouste, and G. Baffet, "Orientation fields of nonlinear biological fibrils by second harmonic generation microscopy," *Journal of microscopy*, vol. 229, no. May 2007, pp. 32–38, 2008.
 - [140] S. Psilodimitrakopoulos, S. I. C. O. Santos, I. Amat-Roldan, A. K. N. Thayil, D. Artigas, and P. Loza-Alvarez, "In vivo, pixel-resolution mapping of thick filaments' orientation in nonfibrillar muscle using polarization-sensitive second harmonic generation microscopy," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 14, no. 1, p. 014001, 2013.
 - [141] F. Tiaho, G. Recher, and D. Rouède, "Estimation of helical angles of myosin and collagen by second harmonic generation imaging microscopy," *Optics Express*, vol. 15, no. 19, pp. 12286–12295, 2007.
 - [142] M.-M. Giraud-Guille, L. Besseau, and R. Martin, "Liquid crystalline assemblies of collagen in bone and in vitro systems," *Journal of Biomechanics*, vol. 36, pp. 1571–1579, Oct. 2003.
 - [143] S. Köster, H. M. Evans, J. Y. Wong, and T. Pfohl, "An in situ study of collagen self-assembly processes.," *Biomacromolecules*, vol. 9, pp. 199–207, Jan. 2008.
 - [144] C. B. Raub, J. Unruh, V. Suresh, T. Krasieva, T. Lindmo, E. Gratton, B. J. Tromberg, and S. C. George, "Image correlation spectroscopy of multiphoton images correlates with collagen mechanical properties.," *Biophysical Journal*, vol. 94, pp. 2361–73, Mar. 2008.
 - [145] J. R. Harris and A. Reiber, "Influence of saline and pH on collagen type I fibrillogenesis in vitro : fibril polymorphism and colloidal gold labelling.," *Micron*, vol. 38, pp. 513–21, Jan. 2007.
 - [146] F. Gobeaux, G. Mosser, A. Anglo, P. Panine, P. Davidson, M.-M. Giraud-Guille, and E. Belamie, "Fibrillogenesis in dense collagen solutions : a physicochemical study.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 376, pp. 1509–22, Mar. 2008.
-

Bibliographie

- [147] F. Jiang, H. Hörber, J. Howard, and D. J. Müller, “Assembly of collagen into microribbons : effects of pH and electrolytes,” *Journal of Structural Biology*, vol. 148, pp. 268–78, Dec. 2004.
- [148] R. Langer and D. a. Tirrell, “Designing materials for biology and medicine.,” *Nature*, vol. 428, pp. 487–92, May 2004.
- [149] P. R. LeDuc and D. N. Robinson, “Using Lessons from Cellular and Molecular Structures for Future Materials,” *Advanced Materials*, vol. 19, pp. 3761–3770, Nov. 2007.
- [150] C. Wong Po Foo, S. V. Patwardhan, D. J. Belton, B. Kitchel, D. Anastasiades, J. Huang, R. R. Naik, C. C. Perry, and D. L. Kaplan, “Novel nanocomposites from spider silk-silica fusion (chimeric) proteins.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, pp. 9428–33, July 2006.
- [151] M. F. Desimone, C. Hélary, I. B. Rietveld, I. Bataille, G. Mosser, M.-M. Giraud-Guille, J. Livage, and T. Coradin, “Silica-collagen bionanocomposites as three-dimensional scaffolds for fibroblast immobilization,” *Acta Biomaterialia*, vol. 6, pp. 3998–4004, Oct. 2010.
- [152] Z. Luo, K. Cai, Y. Hu, L. Zhao, P. Liu, L. Duan, and W. Yang, “Mesoporous silica nanoparticles end-capped with collagen : redox-responsive nanoreservoirs for targeted drug delivery.,” *Angewandte Chemie*, vol. 50, pp. 640–3, Jan. 2011.
- [153] O. Mahony, O. Tsigkou, C. Ionescu, C. Minelli, L. Ling, R. Hanly, M. E. Smith, M. M. Stevens, and J. R. Jones, “Silica-Gelatin Hybrids with Tailorable Degradation and Mechanical Properties for Tissue Regeneration,” *Advanced Functional Materials*, vol. 20, pp. 3835–3845, Nov. 2010.
- [154] B. Alonso and E. Belamie, “Chitin-silica nanocomposites by self-assembly,” *Angewandte Chemie*, vol. 49, pp. 8201–4, Oct. 2010.
- [155] S. Y. Park, A. K. R. Lytton-Jean, B. Lee, S. Weigand, G. C. Schatz, and C. a. Mirkin, “DNA-programmable nanoparticle crystallization,” *Nature*, vol. 451, pp. 553–6, Jan. 2008.
- [156] J. Wu, J. Silvent, T. Coradin, and C. Aimé, “Biochemical investigation of the formation of three-dimensional networks from DNA-grafted large silica particles,” *Langmuir*, pp. 2156–2165, 2011.
- [157] C. Aimé, G. Mosser, G. Pembouong, L. Bouteiller, and T. Coradin, “Controlling the nano-bio interface to build collagen-silica self-assembled networks,” *Nanoscale*, vol. 4, pp. 7127–34, Oct. 2012.
- [158] T. Starborg, Y. Lu, K. E. Kadler, and D. F. Holmes, “Chapter 17 Electron Microscopy of Collagen Fibril Structure In Vitro and In Vivo Including Three-Dimensional Reconstruction,” in *Introduction to Electron Microscopy for Biologists* (M. i. C. Biology, Terence, D. Allen, B T, ed.), vol. Volume 88, pp. 319–345, Academic Press, 2008.
- [159] V. K. Yadavalli, D. V. Svintradze, and R. M. Pidaparti, “Nanoscale measurements of the assembly of collagen to fibrils,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 46, pp. 458–64, May 2010.

- [160] D. A. Cisneros, C. Hung, C. M. Franz, and D. J. Muller, "Observing growth steps of collagen self-assembly by time-lapse high-resolution atomic force microscopy," *Journal of Structural Biology*, vol. 154, pp. 232–45, June 2006.
 - [161] Y.-L. Yang and L. J. Kaufman, "Rheology and confocal reflectance microscopy as probes of mechanical properties and structure during collagen and collagen/hyaluronan self-assembly," *Biophysical Journal*, vol. 96, pp. 1566–85, Feb. 2009.
 - [162] K. Wolf, S. Alexander, V. Schacht, L. M. Coussens, U. H. von Andrian, J. van Rheenen, E. Deryugina, and P. Friedl, "Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo," *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 20, pp. 931–41, Oct. 2009.
 - [163] A. Zoumi, A. Yeh, and B. J. Tromberg, "Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, pp. 11014–9, Aug. 2002.
 - [164] W. R. Zipfel, R. M. Williams, R. Christie, A. Y. Nikitin, B. T. Hyman, and W. W. Webb, "Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, pp. 7075–80, June 2003.
 - [165] C. Bayan, J. M. Levitt, E. Miller, D. Kaplan, and I. Georgakoudi, "Fully automated, quantitative, noninvasive assessment of collagen fiber content and organization in thick collagen gels," *Journal of Applied Physics*, vol. 105, no. 10, p. 102042, 2009.
 - [166] A.-M. Pena, D. Fagot, C. Olive, J.-F. Michelet, J.-B. Galey, F. Leroy, E. Beaurepaire, J.-L. Martin, A. Colonna, and M.-C. Schanne-Klein, "Multiphoton microscopy of engineered dermal substitutes : assessment of 3-D collagen matrix remodeling induced by fibroblast contraction," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 15, no. 5, p. 056018, 2010.
 - [167] U. Freudenberg, S. H. Behrens, P. B. Welzel, M. Müller, M. Grimmer, K. Salchert, T. Taeger, K. Schmidt, W. Pompe, and C. Werner, "Electrostatic interactions modulate the conformation of collagen I," *Biophysical Journal*, vol. 92, pp. 2108–19, Mar. 2007.
 - [168] M.-M. Giraud-Guille, L. Besseau, D. Herbage, and P. Gounon, "Optimization of Collagen Liquid Crystalline Assemblies : Influence of Sonic Fragmentation," *Journal of Structural Biology*, vol. 113, no. 2, pp. 99–106, 1994.
 - [169] C. Aimé and T. Coradin, "Nanocomposites from biopolymer hydrogels : Blueprints for white biotechnology and green materials chemistry," *Journal of Polymer Science Part B : Polymer Physics*, vol. 50, pp. 669–680, May 2012.
 - [170] A. Boal, F. Ilhan, J. DeRouchey, T. Thurn-Albrecht, T. Russell, and V. Rotello, "Self-assembly of nanoparticles into structured spherical and network aggregates," *Nature*, vol. 404, pp. 746–8, May 2000.
 - [171] A. E. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaesig, V. Castranova, and M. Thompson, "Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface," *Nature Materials*, vol. 8, pp. 543–57, July 2009.
-

Bibliographie

- [172] T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindman, T. Berggard, E. Thulin, H. Nilsson, K. A. Dawson, and S. Linse, "Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 7, pp. 2050–2055, 2007.
- [173] S. Goy-López, J. Juárez, M. Alatorre-Meda, E. Casals, V. F. Puentes, P. Taboada, and V. Mosquera, "Physicochemical characteristics of protein-NP bioconjugates : the role of particle curvature and solution conditions on human serum albumin conformation and fibrillogenesis inhibition.," *Langmuir*, vol. 28, pp. 9113–26, July 2012.
- [174] W. Stöber, A. Fink, and E. Bohn, "Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 26, pp. 62–69, Jan. 1968.
- [175] E. Maria Claesson and A. P. Philipse, "Thiol-functionalized silica colloids, grains, and membranes for irreversible adsorption of metal(oxide) nanoparticles," *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 297, pp. 46–54, Apr. 2007.
- [176] R. Marschall, I. Bannat, J. Caro, and M. Wark, "Proton conductivity of sulfonic acid functionalised mesoporous materials," *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 99, pp. 190–196, Feb. 2007.
- [177] T. Saito, N. Iso, H. Mizuno, N. Onda, H. Yamato, and H. Odashima, "Semiflexibility of collagens in solution," *Biopolymers*, vol. 21, pp. 715–728, Apr. 1982.
- [178] D. Birk and P. Bruckner, "Collagen Suprastructures," in *Collagen SE - 7* (J. Brinckmann, H. Notbohm, and P. K. Müller, eds.), vol. 247 of *Topics in Current Chemistry*, pp. 185–205, Springer Berlin Heidelberg, 2005.
- [179] S. Linse, C. Cabaleiro-Lago, W.-F. Xue, I. Lynch, S. Lindman, E. Thulin, S. E. Radford, and K. a. Dawson, "Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, pp. 8691–6, May 2007.
- [180] M. M. Giraud Guille, C. Helary, S. Vigier, and N. Nassif, "Dense fibrillar collagen matrices for tissue repair," *Soft Matter*, vol. 6, no. 20, pp. 4963–4967, 2010.
- [181] A. V. Agronskaia, J. a. Valentijn, L. F. van Driel, C. T. W. M. Schneijdenberg, B. M. Humbel, P. M. P. van Bergen en Henegouwen, A. J. Verkleij, A. J. Koster, and H. C. Gerritsen, "Integrated fluorescence and transmission electron microscopy.," *Journal of Structural Biology*, vol. 164, pp. 183–9, Nov. 2008.
- [182] I. Gusachenko and M.-C. Schanne-Klein, "Numerical simulation of polarization-resolved second harmonic microscopy in birefringent media," *Physical Review A (in revision)*.
- [183] L. Novotny and B. Hecht, *Principles of nano-optics*. Cambridge university press, 2012.
- [184] I. Bergman and R. Loxley, "Two Improved and Simplified Methods for the Spectrophotometric Determination of Hydroxyproline.," *Analytical Chemistry*, vol. 35, pp. 1961–1965, Nov. 1963.

- [185] I. G. Mogilner, G. Ruderman, and J. R. Grigera, "Collagen stability, hydration and native state.," *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, vol. 21, pp. 209–13, Dec. 2002.
 - [186] J. Duboisset, A. Deniset-Besseau, E. Benichou, I. Russier-Antoine, N. Lascoux, C. Jonin, F. Hache, M.-C. Schanne-Klein, and P.-F. Brevet, "A Bottom-Up Approach to Build the Hyperpolarizability of Peptides and Proteins from their Amino Acids.," *The journal of physical chemistry. B*, vol. 117, pp. 9877–81, Aug. 2013.
 - [187] I. Freund, M. Deutsch, and A. Sprecher, "Connective tissue polarity. Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon.," *Biophysical Journal*, vol. 50, pp. 693–712, Oct. 1986.
 - [188] F. L  gar  , C. Pfeffer, and B. R. Olsen, "The role of backscattering in SHG tissue imaging.," *Biophysical Journal*, vol. 93, pp. 1312–20, Aug. 2007.
 - [189] X. Chen, O. Nadiarynk, S. Plotnikov, and P. J. Campagnola, "Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure.," *Nature Protocols*, vol. 7, pp. 654–69, Apr. 2012.
 - [190] M. Rivard, K. Popov, C.-A. Couture, M. Lalibert  , A. Bertrand-Grenier, F. Martin, H. P  pin, C. P. Pfeffer, C. Brown, and L. Ramunno, "Imaging the noncentrosymmetric structural organization of tendon with Interferometric Second Harmonic Generation microscopy," *Journal of Biophotonics*, 2013.
 - [191] D. Rou  de, J.-J. Bellanger, G. Recher, and F. Tiaho, "Study of the effect of myofibrillar misalignment on the sarcomeric SHG intensity pattern," *Optics Express*, vol. 21, no. 9, pp. 494–503, 2013.
 - [192] O. Nadiarynk and P. J. Campagnola, "Retention of polarization signatures in SHG microscopy of scattering tissues through optical clearing.," *Optics Express*, vol. 17, pp. 5794–806, Mar. 2009.
 - [193] E. S. Tasheva, A. Koester, A. Q. Paulsen, A. S. Garrett, D. L. Boyle, H. J. Davidson, M. Song, N. Fox, and G. W. Conrad, "Mimecan/osteoglycin-deficient mice have collagen fibril abnormalities.," *Molecular Vision*, vol. 8, pp. 407–15, Oct. 2002.
 - [194] P. Beighton, A. De Paepe, B. Steinmann, P. Tsipouras, and R. J. Wenstrup, "Ehlers-Danlos syndromes : revised nosology, Villefranche, 1997," *American Journal of Medical Genetics*, vol. 77, no. 1, pp. 31–37, 1998.
 - [195] S. Symoens, D. Syx, F. Malfait, B. Callewaert, J. De Backer, O. Vanakker, P. Coucke, and A. De Paepe, "Comprehensive molecular analysis demonstrates type V collagen mutations in over 90% of patients with classic EDS and allows to refine diagnostic criteria.," *Human Mutation*, vol. 33, pp. 1485–93, Oct. 2012.
 - [196] F. Malfait, S. Symoens, N. Goemans, Y. Gyftodimou, E. Holmberg, V. L  pez-Gonz  lez, G. Mortier, S. Nampoothiri, M. B. Petersen, and A. De Paepe, "Helical mutations in type I collagen that affect the processing of the amino-propeptide result in an Osteogenesis Imperfecta/Ehlers-Danlos Syndrome overlap syndrome.," *Orphanet Journal of Rare Diseases*, vol. 8, p. 78, Jan. 2013.
 - [197] J.-R. Mao and J. Bristow, "The Ehlers-Danlos syndrome : on beyond collagens," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 107, no. 9, pp. 1063–1069, 2001.
-

Bibliographie

- [198] L. Nuytinck, M. Freund, L. Lagae, G. E. Pierard, T. Hermanns-Le, and A. De Paepe, "Classical Ehlers-Danlos syndrome caused by a mutation in type I collagen," *The American Journal of Human Genetics*, vol. 66, no. 4, pp. 1398–1402, 2000.
- [199] G. H. Burch, Y. Gong, W. Liu, R. W. Dettman, C. J. Curry, L. Smith, W. L. Miller, and J. Bristow, "Tenascin-X deficiency is associated with Ehlers-Danlos syndrome," *Nature Genetics*, vol. 17, no. 1, pp. 104–108, 1997.
- [200] B. Steinmann, *Connective Tissue and Its Heritable Disorders : Molecular Genetic, and Medical Aspects*. Wiley-Liss, 1993.
- [201] S. Symoens, M. Renard, C. Bonod-Bidaud, D. Syx, E. Vaganay, F. Malfait, S. Ricard-Blum, E. Kessler, L. Van Laer, P. Coucke, F. Ruggiero, and A. De Paepe, "Identification of binding partners interacting with the α 1-N-propeptide of type V collagen.," *The Biochemical Journal*, vol. 433, pp. 371–81, Jan. 2011.
- [202] A. C. Nicholls, S. M. McCarron, P. Narcisi, and F. M. Pope, "Molecular abnormalities of type V collagen in Ehlers-Danlos syndrome," *The American Journal of Human Genetics*, vol. 62, pp. 523–528, 1994.
- [203] H. V. Toriello, T. W. Glover, K. Takahara, P. H. Byers, D. E. Miller, J. V. Higgins, and D. S. Greenspan, "A translocation interrupts the COL5A1 gene in a patient with Ehlers-Danlos syndrome and hypomelanosis of Ito," *Nature Genetics*, vol. 13, no. 3, pp. 361–365, 1996.
- [204] R. J. Wenstrup, G. T. Langland, M. C. Willing, V. N. D'Souza, and W. G. Cole, "A splice-junction mutation in the region of COL5A1 that codes for the carboxyl propeptide of pro α 1 (V) chains results in the gravis form of the Ehlers-Danlos syndrome (type I)," *Human Molecular Genetics*, vol. 5, no. 11, pp. 1733–1736, 1996.
- [205] N. P. Burrows, A. C. Nicholls, A. J. Richards, C. Luccarini, J. B. Harrison, J. R. W. Yates, and F. M. Pope, "A point mutation in an intronic branch site results in aberrant splicing of COL5A1 and in Ehlers-Danlos syndrome type II in two British families," *The American Journal of Human Genetics*, vol. 63, no. 2, pp. 390–398, 1998.
- [206] U. Schwarze, M. Atkinson, G. G. Hoffman, D. S. Greenspan, and P. H. Byers, "Null Alleles of the COL5A1 Gene of Type V Collagen Are a Cause of the Classical Forms of Ehlers-Danlos Syndrome (Types I and II)," *The American Journal of Human Genetics*, vol. 66, no. 6, pp. 1757–1765, 2000.
- [207] P. Bouma, W. A. Cabral, W. G. Cole, and J. C. Marini, "COL5A1 exon 14 splice acceptor mutation causes a functional null allele, haploinsufficiency of α 1 (V) and abnormal heterotypic interstitial fibrils in Ehlers-Danlos syndrome II," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 16, pp. 13356–13364, 2001.
- [208] H. Chanut-Delalande and A. Fichard, "Control of heterotypic fibril formation by collagen V is determined by chain stoichiometry," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 26, pp. 24352–24359, 2001.
- [209] A. Fichard, E. Tillet, F. Delacoux, R. Garrone, and F. Ruggiero, "Human Recombinant α 1(V) Collagen Chain," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 48, pp. 30083–30087, 1997.

- [210] M. Roulet, M. Välikkilä, H. Chanut-Delalande, E.-R. Hämäläinen, E. Kessler, L. Ala-Kokko, M. Männikkö, C. Bonod-Bidaud, and F. Ruggiero, "The collagen V homotrimer $[\alpha 1(V)](3)$ production is unexpectedly favored over the heterotrimer $[\alpha 1(V)](2)\alpha 2(V)$ in recombinant expression systems," *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, vol. 2010, p. 376927, Jan. 2010.
 - [211] K. Michalickova, M. Susic, M. C. Willing, R. J. Wenstrup, and W. G. Cole, "Mutations of the $\alpha 2(V)$ chain of type V collagen impair matrix assembly and produce Ehlers-Danlos syndrome type I," *Human Molecular Genetics*, vol. 7, no. 2, pp. 249–255, 1998.
 - [212] A. J. Richards, S. Martin, A. C. Nicholls, J. B. Harrison, F. M. Pope, and N. P. Burrows, "A single base mutation in COL5A2 causes Ehlers-Danlos syndrome type II," *Journal of Medical Genetics*, vol. 35, no. 10, pp. 846–848, 1998.
 - [213] Y. Imamura, I. Scott, and D. Greenspan, "The Pro- $\alpha 3(V)$ Collagen Chain. Complete primary structure, expression domains in adult and developing tissues, and comparison to the structures and expression domains of the other types V and XI procollagen chains," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, pp. 8749–8759, Mar. 2000.
 - [214] M. A. Chernousov, K. Rothblum, W. A. Tyler, R. C. Stahl, and D. J. Carey, "Schwann cells synthesize type V collagen that contains a novel $\alpha 4$ chain. Molecular cloning, biochemical characterization, and high affinity heparin binding of $\alpha 4(V)$ collagen," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, pp. 28208–15, Sept. 2000.
 - [215] A. Fichard, H. Chanut-Delalande, and F. Ruggiero, "Le syndrome d'Ehlers-Danlos : l'architecture matricielle en question," *M/S : Médecine Sciences*, vol. 19, pp. 443–452, 2003.
 - [216] D. Maurice, "The structure and transparency of the cornea," *The Journal of Physiology*, vol. 136, pp. 263–286, 1957.
 - [217] R. W. Hart and R. A. Farrell, "Light scattering in the cornea," *Journal of the Optical Society of America*, vol. 59, pp. 766–74, June 1969.
 - [218] T. Feuk, "On the Transparency of the Stroma in the Mammalian Cornea," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. BME-17, no. 3, pp. 186–190, 1970.
 - [219] G. B. Benedek, "Theory of transparency of the eye," *Applied Optics*, vol. 10, pp. 459–73, Mar. 1971.
 - [220] D. E. Birk, "Type V collagen : heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly," *Micron*, vol. 32, pp. 223–37, Apr. 2001.
 - [221] H. Chanut-Delalande, "Development of a functional skin matrix requires deposition of collagen V heterotrimers," *Molecular and Cellular Biology*, 2004.
 - [222] K. Andrikopoulos, X. Liu, D. R. Keene, R. Jaenisch, and F. Ramirez, "Targeted mutation in the col5a2 gene reveals a regulatory role for type V collagen during matrix assembly," *Nature Genetics*, vol. 9, pp. 31–36, Jan. 1995.
 - [223] C. Bonod-Bidaud, M. Roulet, U. Hansen, A. Elsheikh, M. Malbouyres, S. Ricard-Blum, C. Faye, E. Vaganay, P. Rousselle, and F. Ruggiero, "In Vivo Evidence for a Bridging Role of a Collagen V Subtype at the Epidermis-Dermis Interface," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 132, pp. 1841–1849, July 2012.
-

Bibliographie

- [224] C. Bonod-Bidaud, M. Beraud, E. Vaganay, F. Delacoux, B. Font, D. J. S. Hulmes, and F. Ruggiero, “Enzymatic cleavage specificity of the pro α 1(V) chain processing analysed by site-directed mutagenesis.,” *The Biochemical Journal*, vol. 405, pp. 299–306, July 2007.
- [225] Y. Goulam Houssen, I. Gusachenko, M.-C. Schanne-Klein, and J.-M. Allain, “Monitoring micrometer-scale collagen organization in rat-tail tendon upon mechanical strain using second harmonic microscopy.,” *Journal of Biomechanics*, vol. 44, pp. 2047–52, July 2011.
- [226] P. Le Tallec, *Mécanique des milieux continus*. École polytechnique, 2008.
- [227] F. Xu, T. J. Lu, and K. A. Seffen, “Biothermomechanical behavior of skin tissue,” *Acta Mechanica Sinica*, vol. 24, pp. 1–23, Jan. 2008.
- [228] J. W. Y. Jor, M. P. Nash, P. M. F. Nielsen, and P. J. Hunter, “Estimating material parameters of a structurally based constitutive relation for skin mechanics.,” *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, vol. 10, pp. 767–78, Oct. 2011.
- [229] J. Duboisset, G. Matar, I. Russier-Antoine, E. Benichou, G. Bachelier, C. Jonin, D. Ficheux, F. Besson, and P. F. Brevet, “First hyperpolarizability of the natural aromatic amino acids tryptophan, tyrosine, and phenylalanine and the tripeptide lysine-tryptophan-lysine determined by hyper-Rayleigh scattering.,” *The Journal of Physical Chemistry. B*, vol. 114, pp. 13861–5, Nov. 2010.
- [230] J. Campo, F. Desmet, W. Wenseleers, and E. Goovaerts, “Highly sensitive setup for tunable wavelength hyper-Rayleigh scattering with parallel detection and calibration data for various solvents.,” *Optics Express*, vol. 17, pp. 4587–604, Mar. 2009.
- [231] S. Brasselet and J. Zyss, “Multipolar molecules and multipolar fields : probing and controlling the tensorial nature of nonlinear molecular media,” *Journal of the Optical Society of America B*, vol. 15, p. 257, Jan. 1998.

RÉSUMÉ

Le collagène est une protéine ubiquitaire qui constitue la principale composante de la matrice extracellulaire (ECM) et joue un rôle central dans l'architecture et la tenue mécanique des tissus conjonctifs (peau, tendon, cornée...). Synthétisé sous forme de triples hélices, le collagène s'auto-assemble en fibrilles *in vivo* et *in vitro* pour former des réseaux tridimensionnels. Il est essentiel de pouvoir sonder *in situ* cette organisation fibrillaire afin de caractériser les remodelages de l'ECM impliqués dans de nombreuses pathologies ou guider l'ingénierie tissulaire. La microscopie multiphoton basée sur la génération de seconde harmonique (SHG) est une technique peu invasive, et très spécifique, permettant de visualiser, sans marquage, le collagène en profondeur dans des tissus, avec une résolution sub-micrométrique. Ce travail de thèse vise à développer des approches quantitatives en imagerie SHG du collagène, tant à l'échelle fibrillaire que tissulaire.

Nous avons d'abord montré que la microscopie SHG est un outil pertinent pour mesurer la dynamique de formation du réseau collagénique, y compris à l'échelle d'une fibrille unique. De plus, nous avons caractérisé la structuration de gels collagéniques contrôlée par ajout de nanoparticules de silice fonctionnalisées. Nous avons ensuite réalisé de l'imagerie corrélative électronique/SHG sur ces gels fibrillaires. Ceci nous a permis de mesurer la sensibilité de notre microscope et de calibrer la réponse d'une fibrille isolée en fonction de son diamètre. En outre, nous avons pu évaluer l'hyperpolarisabilité d'une triple hélice et valider le modèle additif utilisé pour calculer la susceptibilité non-linéaire d'une fibrille. Enfin, nous avons développé une approche phénoménologique d'analyse d'images permettant de quantifier le degré d'organisation du réseau collagénique d'un tissu à l'échelle micrométrique. Ceci permet, notamment, de corréler la réorganisation de l'ECM et la déformation locale dans le but d'explorer la relation entre la structure et la fonction d'un tissu, ce qui a été validé en étudiant la modification des propriétés biomécaniques de souris génétiquement modifiées modèle du syndrome d'Ehlers-Danlos.

Mots clés : Microscopie non-linéaire ; Génération de Seconde Harmonique ; Fluorescence ; Imagerie ; Tissus Biologiques ; Collagène ; Fibrillogénèse ; Syndrome d'Ehlers-Danlos ; Biomécanique ; Nanoparticules

ABSTRACT

Collagen is an ubiquitous protein that represents the main component of the extracellular matrix (ECM) and plays a central role in the architecture and the mechanical integrity of connective tissues (skin, bones, cornea...). Synthesized as triple helices, collagen self-assembles into fibrils both *in vivo* and *in vitro* to form three-dimensional networks. It is essential to probe *in situ* this fibrillar organization to characterize ECM remodeling involved in many diseases and guide tissue engineering. Multiphoton microscopy based on second harmonic generation (SHG) is a minimally invasive and very specific technique to visualize unstained collagen deep into tissues, with sub-micron resolution. This thesis aims to develop quantitative approaches in SHG imaging of collagen, at both the fibrillar and tissular scales.

We first showed that SHG microscopy is a relevant tool to measure the dynamics of formation of collagen networks, even at the single fibril scale. Additionally, we characterized the structure of collagen gels controlled by adding functionalized silica nanoparticles. We then performed correlative electron/SHG imaging on these fibrillar gels. This allowed us to measure the sensitivity of our set-up and to calibrate the response of an isolated fibril as a function of its diameter. In addition, we derived the hyperpolarizability of a triple helix, which validated the additive model used to calculate the nonlinear susceptibility of a fibril. Concurrently, we developed specific image analysis to phenomenologically quantify the degree of organization of the fibrillar network at the micrometer scale. It enabled to correlate the reorganization of the ECM and the local deformation, in order to investigate the relationship between structure and function in biological tissues. This was validated by characterizing the changes of biomechanical properties in genetically modified mice model of Ehlers-Danlos syndrome.

Keywords : Non-linear Microscopy ; Second Harmonic Generation ; Fluorescence ; Imaging techniques ; Biological tissues ; Collagen ; Fibrillogenesis ; Ehlers-Danlos syndrome ; Biomechanics ; Nanoparticles