



HAL
open science

Imagerie Multimodale par Cartographie 3D en excitation pulsée : de la cellule au tissu

Elisabeth Werkmeister

► **To cite this version:**

Elisabeth Werkmeister. Imagerie Multimodale par Cartographie 3D en excitation pulsée : de la cellule au tissu. Biologie cellulaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2008. Français. NNT : 2008NAN10055 . tel-01748439

HAL Id: tel-01748439

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748439>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I
Ecole Doctorale Biologie – Santé – Environnement

Thèse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l' UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I
Spécialité Ingénierie Cellulaire et Tissulaire

Présentée

Par M^{elle} Elisabeth WERKMEISTER

Le 9 Octobre 2008

Imagerie Multimodale par Cartographie 3D en excitation pulsée : de la cellule au tissu

Directeur de thèse : Pr. J.F. STOLTZ
Co-Directeur de thèse : Dr. D. DUMAS

JURY :

Rapporteurs :

Pr. R. SANTUS
Dr. MC. SCHANNE-KLEIN

Laboratoire de Photobiologie
LOB - Ecole Polytechnique

PARIS
PALAISEAU

Examineurs :

Dr. M.L. VIRIOT
Pr. J.F. STOLTZ
Dr. L. HELIOT
Dr. D. DUMAS

ENSIC
Nancy-Université
IRI
Nancy-Université

NANCY
VANDOEUVRE-lès-NANCY
LILLE
VANDOEUVRE-lès-NANCY

Avant-propos et Remerciements

Ce travail a été mené au sein du Groupe de Mécanique et d'Ingénierie Cellulaire et Tissulaire - LEMTA-UMR CNRS-UHP-INPL 7563, dans les locaux de la Faculté de Médecine de Vandoeuvre-lès-Nancy.

Je tiens à remercier le Pr. Jean-François STOLTZ de m'avoir accueillie au sein de son équipe durant ces trois années, de la confiance qu'il m'a accordée, et des possibilités qui m'ont été données de participer à des Congrès très intéressants.

J'adresse ma profonde reconnaissance au Dr. Dominique DUMAS, qui a codirigé ce travail, de m'avoir initiée à l'imagerie microscopique. J'ai été particulièrement sensible à ses excellentes qualités d'encadrement, sa disponibilité et ses conseils réguliers et judicieux.

Je remercie vivement mes rapporteurs, le Pr. René SANTUS et le Dr Marie-Claire SCHANNE-KLEIN ainsi que les membres de mon jury, le Dr. Marie-Laure VIRIOT, le Dr Laurent HELIOT d'avoir accepté de juger mon travail.

Un grand merci également à M. Luc MARCHAL, pour son soutien, sa gentillesse, ses explications et toutes les discussions que nous avons pu avoir.

Mes remerciements s'adressent également au Dr. Halima KERDJOU DJ, à M. Nicolas BERTHELEMY ainsi qu'à toute l'équipe du Pr. Patrick MENU. J'ai beaucoup apprécié nos échanges, et trouvé beaucoup d'intérêt à travailler sur les échantillons vasculaires.

Je remercie le Dr. Natalia de ISLA, pour sa persévérance et nos études menées en commun sur le thème du cartilage.

Je tiens à remercier toute l'équipe du CAV, et en particulier, le Dr. Lina BOLOTINE, le Dr. Marie-Ange d'HALLEWIN et M^{elle} Yan VIRY-BABEL, avec qui nous avons eu une collaboration fructueuse.

J'adresse mes remerciements au Dr. Laurent HELIOT, au Dr. Corentin SPRIET, à M. Dave TRINEL et à toute l'équipe de l'IRI de Lille pour leur collaboration concernant l'étude du Cavity Dumper.

Je présente ma gratitude à mes tuteurs de monitorat, M^{me} Isabelle HENROT et M. Dominique COLLET, pour leur aide précieuse durant mes enseignements à l'EEIGM.

Et bien entendu, merci à tout le personnel du laboratoire, techniciens, étudiants, doctorants, chercheurs, qui ont su rendre ces trois années passées au sein de l'équipe bien agréables !

Enfin, je ne saurais oublier mes amis et ma famille pour leur soutien et leur présence au quotidien.

Je n'aurais certainement pas pu réaliser ces travaux dans les délais impartis si je n'avais pas bénéficié d'une allocation de recherche octroyée par le Ministère Français de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Imagerie Multimodale par Cartographie 3D en excitation pulsée : De la cellule au tissu

L'un des enjeux de la bioingénierie consiste à synthétiser des biomatériaux visant à régénérer, remplacer ou suppléer des organes déficients. Afin de visualiser des structures dans des conditions proches de la réalité physiologique, et de manière non invasive, de nouvelles techniques d'imagerie ne cessent de se développer.

En particulier, la microscopie associant une excitation multiphoton et la détection de signaux de fluorescence et de signaux de SHG (*Second Harmonic Generation*) permet l'observation en profondeur de composants de matrices extracellulaires sans marqueur fluorescent exogène.

Ce travail basé sur ces techniques a permis dans un premier temps d'apprécier les probabilités d'absorption multiphoton en fonction de la modulation de l'excitation avec deux systèmes différents (Cavity Dumper et EOM). Une seconde partie de ce projet a été consacrée à la mise en place et l'optimisation de la détection de signaux SHG provenant du collagène dans les tissus biologiques.

Nous avons utilisé ces méthodes d'imagerie pour mettre en évidence les modifications intervenant au niveau des réseaux de collagène de la MEC de cartilage suite à l'application d'une contrainte mécanique (compression) ou biochimique (enzymatique).

Puis, nous nous sommes intéressés au domaine vasculaire, en montrant la possibilité d'imager sans marquage fluorescent les réseaux d'élastine de la média (en mettant à profit son autofluorescence) et le réseau de collagène de l'adventice (générant un fort signal SHG). Nous avons ainsi pu apprécier l'état des structures en fonction de différentes conditions de préservation (congélation, fixation) et le remodelage de substituts artériels implantés chez le lapin.

Enfin, une dernière application biologique, basée sur l'étude de tumeurs, nous montre la complémentarité et l'intérêt d'une imagerie de type macroscopique avec les diverses modalités de détection en microscopie.

3D Multimodal imaging with pulsed excitation : From cell to tissue

To repair, supply or regenerate deficient organs, the bioengineering field consists of synthesising functionalised biomaterials. To visualise the synthesised structures in a non invasive way and in physiological conditions, new imaging techniques tend to be developed.

Among them, microscopy associating multiphoton excitation with fluorescence detection or Second Harmonic Generation enables a visualisation in depth of extracellular matrix structures, without any exogenous dye.

The first part of this work was to characterise multiphoton absorption probability in function of different excitation conditions, that means a modulation of the excitation beam through two different systems (Cavity Dumper and EOM). In a second part, we implemented and optimised the detection of the SHG signal coming from collagen in biological tissues.

Through SHG measurements, we showed modifications occurring on the collagen network of the extracellular matrix of cartilage, when sample were submitted to mechanical (compression) or biochemical (enzymatic) constraint.

We also were interested by the vascular research field and showed the ability of multiphoton microscopy to image without any fluorescent dye, the elastin network of the media and the collagen network of the adventice. We could appreciate qualitatively the effect of cryopreservation or fixation on the arterial wall, and the remodelling of a substitute implemented in a rabbit to supply its carotid.

A last biological application concerned study of tumors, and showed us the complementarities between a macroscopic study with information obtained by microscopy.

Sommaire

Avant-propos et Remerciements	2
Sommaire	6
Liste des Abréviations	8
Liste des Figures	9
Liste des Tableaux	19
I. INTRODUCTION	21
I.1. L'organisation de différents tissus biologiques – le cartilage et les vaisseaux sanguins	22
I.1.A. Le cartilage.....	22
I.1.B. Les vaisseaux.....	25
I.1.C. Les tumeurs	27
I.2. Les méthodes d'imagerie actuelles	27
I.2.A. Les méthodes ionisantes.....	28
I.2.B. Les méthodes non ionisantes.....	28
I.2.C. L'intérêt des méthodes microscopiques	29
I.3. La fluorescence	31
I.3.A. Principe	31
I.3.B. Excitation monophoton ou multiphoton.....	32
I.3.C. Différents modes de résolution	34
I.4. La mesure du signal SHG (Second Harmonic Generation) émanant des fibres de collagène.....	36
I.4.A. Principe	37
I.4.B. Le collagène dans les tissus et applications potentielles	38
I.4.C. Les biomatériaux collagéniques	40
I.5. Objectifs.....	40
II. MATERIEL ET METHODES	42
II.1. Matériel biologique et chimique.....	42
II.1.A. Marquage de structures cellulaires au moyen de sondes fluorescentes.....	42
II.1.B. Cartilage.....	44
II.1.C. Echantillons d'origine vasculaire.....	46
II.1.D. Echantillons d'origine tumorale humaine.....	47
II.2. Excitation Multiphoton.....	48
II.2.A. Microscopie Multiphoton	48
II.3. Microscopie confocale.....	52
II.4. FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy).....	54
II.5. SHG (Second Harmonic Generation)	58
II.6. Système de Macrofluorescence	60
II.7. Méthodes d'analyse d'images SHG	60
II.7.A. Méthode d'analyse d'images SHG – Analyse texturale	60
où μ_x et σ_x sont la moyenne et l'écart type de p_x	62
II.7.B. Méthode d'analyse d'images SHG – classification ACP	63
II.7.C. Logiciels utilisés pour le traitement d'images et les reconstructions 3D.....	63
III. RESULTATS et DISCUSSION	64
III.1. Conditions d'excitation Multiphoton – Cavity Dumper	64
III.1.A. Caractérisation de l'énergie impulsionnelle – Cavity Dumper et EOM.....	65
III.1.B. Photoblanchiment - Méthode d'analyse (Exemple pour une condition expérimentale).....	69

III.1.C. Cinétique de photoblanchiment et profondeur d'analyse sur des noyaux	77
III.1.D. Probabilité d'absorption multiphoton.....	79
III.1.E. Profondeur d'irradiation	83
III.1.F. Influence de la puissance d'excitation sur la mesure des durées de vie de fluorescence.....	86
III.1.G. Conclusion.....	89
III.2. Optimisation des Conditions de mesure du signal SHG	91
III.2.A. Mesures expérimentales	92
III.2.B. Théorie – Propagation du signal SHG en fonction des objectifs d'excitation et de collection du signal.....	99
III.2.C. Confrontation des mesures expérimentales avec la théorie.....	103
III.2.D. Collection du signal SHG dans le sens inverse au rayon incident	106
III.2.E. Mesure du signal SHG sur différents tissus.....	115
III.2.F. Conclusion	118
III.3. Validation du modèle d'analyse de texture	119
III.3.A. Influence de l'intensité d'une image	119
III.3.B. Comparaison de différents types d'échantillons avec le modèle d'analyse de texture + classification ACP.....	122
III.3.C. Conclusion	125
III.4. Etude du cartilage.....	126
III.4.A. Structure du cartilage articulaire	127
III.4.B. Modification de la structure de la matrice extracellulaire lors de l'application d'une contrainte mécanique.....	133
III.4.C. Comparaison des effets d'une contrainte enzymatique ou mécanique sur le réseau de collagène – Classification ACP	140
III.4.D. Etude du Collagène VI de la matrice péricellulaire.....	147
III.4.E. Conclusion	162
III.5. Etude du matériel vasculaire	164
III.5.A. L'utilisation de sondes fluorescentes pour imager des structures d'intérêt au niveau de la paroi artérielle	165
III.5.B. Le réseau de Collagène dans l'adventice.....	171
III.5.C. Comparaison de la média et de l'intima de différents types d'artères dites élastiques ou musculaires	179
III.5.D. Comparaison du réseau de collagène pour différents types d'artères élastiques ou musculaires.....	184
III.5.E. Etude du remodelage vasculaire après implantation.....	186
III.5.F. Conclusion	193
III.6. Imagerie de tumeurs et intérêt de la macrofluorescence	194
III.6.A. Vascularisation tumorale et diffusion d'un photosensibilisateur au sein de la tumeur visualisé en microscopie non linéaire	194
III.6.B. Le réseau de collagène des tumeurs	197
III.6.C. L'intérêt de l'imagerie en macrofluorescence	197
III.6.D. Conclusion.....	198
IV. CONCLUSION GENERALE	200
Bibliographie.....	202
Annexe A : Comparaison des techniques d'imagerie médicale – Partie I	214
Annexe B : Comparaison des techniques d'imagerie médicale – Partie II.....	215
Liste des Travaux et Publications	216

Liste des Abréviations

ACP : Analyse en Composantes Principales
APO : Objectif Apochromatique
ARM : Angiographie par resonance Magnétique
ASM : *Angular Second moment*
BP : *By-Pass*
CARS : *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering*
CCD : *Charge Coupled Device*
CFP : *Cyan Fluorescent Protein*
CML : Cellules Musculaires Lisses
DMEM-F12 : *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DR : *Division Ratio*
EOM : *Electro Optical Modulator*
¹⁸F-FDG : fluoro-2-déoxyglucose marqué au ¹⁸F
FLIM : *Fluorescence Lifetime Imaging*
FLUOTAR : objectif à la fluorine, semi-apochromatique
FRET : *Fluorescence Resonant Energy Transfer*
FWHM : *Full Width at Half Maximum*
GFP : *Green Fluorescent Protein*
IDM : *Inverse Difference Moment*
IR : Infrarouge
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
LUT : *Look Up Table*
MEC : Matrice Extra Cellulaire
MET : Microscopie Electronique en Transmission
MP : Multiphoton
MPC : Matrice Peri Cellulaire
NA : *Numerical Aperture*
NDD : *Non Descanned Detector*
PAF : Paraformaldéhyde
PBS : *Phosphate Buffer Saline*
PDT : *Photodynamic Therapy*
PET Scan : *Positron Emission Tomography Scanner*
PG : Proteoglycane
PM : Photomultiplicateur
PS : Photosensibilisant
QDot : Quantum Dot
RF : Radio Fréquence
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
ROI : *Region Of Interest*
SHG : *Second Harmonic Generation*
TCSPC : *Time-Correlated Single Photon Counting*
THG : *Third Harmonic Generation*
UV : Ultraviolet
YFP : *Yellow Fluorescent Protein*
ZCP : *Zero Cross point*

Liste des Figures

Figure 1 : Composition du cartilage humain (http://www.bartleby.com/107/illus293.html)...	23
Figure 2 : Constitution de la paroi artérielle (http://www.sci.sdsu.edu/class/bio590/pictures/lect5/artery-vein.jpeg).....	25
Figure 3 : Spectres d'absorption de différents constituants des tissus biologiques (http://www-lsp.ujf-grenoble.fr/recherche/a2t2/a2t2a2/Pascale_these/Chap1.pdf).....	30
Figure 4 : Principe du phénomène de fluorescence suivant une excitation monophotonique.	32
Figure 5 : Principe du phénomène de fluorescence suivant une excitation biphotonique.	33
Figure 6 : Principe de génération d'un signal de seconde harmonique suivant une excitation biphotonique.....	37
Figure 7 : Principe du marquage du cytosquelette au moyen de Phalloïdine biotinylée présentant une forte affinité avec le complexe QDot-Streptavidine.	42
Figure 8 : Schéma de principe de l'appareil de compression.....	44
Figure 9 : Préparation des explants de cartilage. (a) Les échantillons cylindriques prélevés au niveau de condyles fémoraux humains (\varnothing 5 mm) sont soumis à une contrainte mécanique (1 MPa, 1 Hz, intermittente). (b) Une tranche (~1mm) est sectionnée puis placée sur la platine d'un microscope confocal. (c) Trois régions distinctes sont repérées (s : surface, m : milieu, p : profondeur).	45
Figure 10 : Modes d'observation des vaisseaux. (a) Une section transversale permet l'observation des différentes couches concentriques composant la paroi artérielle. (b) Une coupe longitudinale permet l'observation des réseaux de collagène de l'adventice.	46
Figure 11 : Photos représentant : (a) deux souris Nude ayant subi une injection de cellules cancéreuses. Une tumeur s'est développée au niveau de chacune des cuisses des souris – 10 jours après l'implantation, (b) une tumeur placée sur une lamelle en vue d'une observation microscopique.....	47
Figure 12 : Le faisceau laser venant frapper le cristal acousto-optique du Cavity Dumper est défléchi. L'angle de Bragg (de déflexion) dépend des propriétés du cristal acousto-optique et de celles du faisceau optique.	50
Figure 13 : Protocole de traitement d'images permettant la caractérisation de la probabilité d'absorption en profondeur suivant une excitation multiphoton. Etapes du traitement d'images allant de l'acquisition aux fonctions de répartition. (a) Détection en mode 'xzt' de la fluorescence du Hoechst (noyaux) au sein d'une tumeur. (b) Projections sur l'axe z des profils d'intensité pour chaque temps d'acquisition. (c) Calcul d'une constante d'extinction de fluorescence pour chaque valeur de z, $K=f(z)$. Normalisation des constantes par le nombre d'impulsions ayant contribué à l'extinction de la fluorescence. (d) Tracé de la fonction de répartition obtenue en (c), puis normalisation des courbes pour que le palier soit égal à 100%.	52
Figure 14 : Schéma de principe de la détection en mode NDD. Le signal de fluorescence traverse dans un premier temps un filtre passe-bas 700 nm qui permet de rejeter le signal d'excitation (800nm). Puis un dichroïque à 515 nm permet de réfléchir les rayonnements présentant une longueur d'onde < 515 nm et laisse traverser les rayonnements de longueur d'onde > 515 nm. L'ajout de filtres avant les détecteurs NDD permet de sélectionner les bandes spectrales correspondant aux signaux d'intérêt.....	54
Figure 15 : Schéma de principe d'un système de comptage monophotonique.	55
Figure 16 : Principe du convertisseur Temps-Amplitude.	55
Figure 17 : Principe de construction de l'histogramme de distribution des instants d'arrivée de photons.	56

Figure 18 : L'interface du logiciel SPCImage permet d'attribuer à chaque pixel de l'image un déclin de fluorescence, puis après ajustement (mono, bi ou triexponentiel) des valeurs de durées de vie de fluorescence. L'image codée en couleur peut représenter les différents paramètres des ajustements (composantes du déclin, poids des composantes...).	
L'histogramme permet d'avoir la répartition des valeurs codées pour la région délimitée par les curseurs blancs.....	58
Figure 19 : Schéma de principe et optique de détection du signal SHG suite à une excitation multiphoton. Après une excitation multiphoton, un signal SHG est généré à exactement la moitié de la longueur d'onde d'excitation. Le diagramme de rayonnement SHG présente deux lobes principaux émis dans le sens du rayon incident. Le signal ainsi émis peut être collecté au moyen d'un objectif à grande ouverture numérique, au travers de filtres optiques adaptés.....	59
Figure 20 : Mesure de la fréquence de tir des impulsions laser en sortie de Cavity Dumper. (a) La période entre deux pulses est de 368 ns, correspondant à une fréquence de 2,7 MHz (DR20) soit (54,6 MHz/20). (b) La comparaison de la période mesurée à la valeur attendue nous a permis de valider les données du constructeur.....	66
Figure 21 : Représentation de la puissance Moyenne et de la puissance Crête du faisceau laser en fonction de la fréquence de tir (réduite au moyen du Cavity Dumper). Conformément aux données du constructeur, la diminution de la fréquence de tir des impulsions s'accompagne d'une diminution de la puissance moyenne du faisceau et d'une augmentation de la puissance Crête des impulsions.....	67
Figure 22 : Représentation de l'énergie d'une impulsion en fonction de la fréquence de tir des impulsions (réduite au moyen du Cavity Dumper). Plus la fréquence diminue, plus l'énergie impulsionnelle croît.....	67
Figure 23 : Représentation de la puissance Moyenne, de la puissance Crête et de l'énergie impulsionnelle du faisceau d'excitation modulé au moyen de l'EOM, en fonction des paramètres de Gain et d'Offset de l'EOM.....	68
Figure 24 : Représentation des énergies impulsionnelles obtenues avec l'EOM et le Cavity Dumper en fonction de la puissance Moyenne du faisceau d'excitation. A puissance moyenne équivalente, l'énergie atteinte lors d'une modulation avec le Cavity Dumper est environ 40 fois plus élevée qu'avec l'EOM.....	69
Figure 25 : Images de noyaux tumoraux marqués au Hoechst, en profondeur (mode 'xz') (a) à $t=0s$ et (b) $t=1$ min. Les profils d'intensité de fluorescence (c) sont tracés en projetant l'intensité du signal suivant l'axe z pour $t=0$ s, 26 s et 52 s.....	70
Figure 26 : Les courbes de déclin de fluorescence suite au photoblanchiment sont ajustées linéairement et le graphique représente ces courbes d'ajustement pour des déclinés mesurés à une profondeur $z= 34\mu m$ et $z= 54\mu m$	71
Figure 27 : Une constante de photoblanchiment est calculée pour chaque profondeur.....	72
Figure 28 : Représentation des fonctions de répartition de différentes gaussiennes et intérêt pour la comparaison des courbes. Le taux d'accroissement des fonctions de répartition reflète la largeur à mi-hauteur des gaussiennes. La valeur finale des fonctions de répartition reflète l'intégrale sous les courbes gaussiennes. Le pic gaussien se retrouve à la position pour laquelle la fonction de répartition n vaut 50%.....	74
Figure 29 : Fonctions de répartition des courbes représentant la cinétique de photoblanchiment (normalisée par impulsion) en fonction de la profondeur pour deux séries différentes. Série 1 : DR30, 1,8 MHz, Energie d'une impulsion : 39 nJ. Série 2 : DR80, 679 kHz, Energie d'une impulsion : 59 nJ. La valeur finale de la fonction de répartition est beaucoup plus importante lorsque l'énergie impulsionnelle est plus élevée, suggérant un photoblanchiment plus intense.....	75

Figure 30 : Fonctions de répartition normalisées à $F(\infty) = 1$ des courbes représentant la cinétique de photoblanchiment (normalisée par impulsion) en fonction de la profondeur pour deux séries différentes. Série 1 : DR30, 1,8MHz, Energie d'une impulsion : 39 nJ. Série 2 : DR80, 679 kHz, Energie d'une impulsion : 59 nJ.	76
Figure 31 : Cinétiques de photoblanchiment pour des puissances variables de 188pJ à 2,5nJ (EOM) puis de 35 à 75 nJ (Cavity Dumper) – (a) Courbes non normalisées (b) Courbes normalisées par impulsion.....	77
Figure 32 : Fonctions de répartition pour les différentes séries de mesures réalisées avec (a) l'EOM et (b) le Cavity Dumper. Dans les deux cas, plus l'énergie impulsionnelle augmente, plus la valeur finale de la fonction de répartition augmente, suggérant un photoblanchiment total plus intense. Les valeurs atteintes avec le Cavity Dumper (b) sont environ 40 fois plus importantes qu'avec l'EOM (a).	78
Figure 33 : Fonctions de répartition (normalisées telles que la valeur maximale soit égale à 1) des constantes de photoblanchiment en fonction de la profondeur. Le taux d'accroissement obtenu pour les mesures réalisées avec le Cavity Dumper est plus élevé, suggérant un fort photoblanchiment en surface de l'échantillon. Avec l'EOM, le photoblanchiment est plus homogène en profondeur au sein de l'échantillon.	79
Figure 34 : Probabilité d'absorption multiphoton en fonction de la puissance moyenne et de la fréquence de tir des impulsions. En modulant le faisceau d'excitation au moyen de l'EOM (a) la probabilité d'absorption théorique reste très inférieure à 1. La modulation au moyen du Cavity Dumper (Pmoy variable de 30 à 70 mW, fréquence de tir < 2 MHz) entraîne une probabilité théorique toujours supérieure à 1 pour nos conditions d'acquisition.	80
Figure 35 : Seuils de saturation (probabilité d'absorption=1) en fonction de la fréquence de tir des impulsions laser et de la puissance moyenne du faisceau. (a) La modulation avec l'EOM (fréquence de tir constante à 76MHz et Puissance moyenne < 200 mW) n'entraîne pas de conditions de saturation. (b) Avec nos conditions expérimentales lors de l'utilisation du Cavity Dumper (30 mW < Puissance moyenne < 70 mW), le phénomène de saturation est effectif. (c) Avec le Cavity Dumper (fréquence <2 MHz), il aurait fallu travailler avec une Puissance moyenne inférieure à 25 mW pour ne pas arriver à saturation.....	81
Figure 36 : Probabilité d'absorption multiphoton (théorie – expérience) en fonction de (a) (Puissance Moyenne) ² puis (b) (Puissance Crête) ² . Les mesures expérimentales restent proches des attentes théoriques à puissance crête faible, pour la modulation avec l'EOM. En revanche, lors de l'utilisation du Cavity Dumper, les mesures sont inférieures aux données attendues.....	82
Figure 37 : Profondeur d'analyse en fonction de (a-b) la Puissance moyenne d'excitation, puis (c) de l'énergie d'une impulsion. Les profondeurs atteintes sont équivalentes quel que soit le système de modulation utilisé (EOM ou Cavity Dumper).	84
Figure 38 : Evolution de la profondeur maximale d'irradiation (valeurs théoriques calculées) atteinte lorsque le faisceau d'excitation est modulé avec l'EOM ou le Cavity Dumper..	85
Figure 39 : Evolution de la profondeur maximale d'irradiation (valeurs théoriques calculées et valeurs expérimentales) atteinte lorsque le faisceau d'excitation est modulé avec l'EOM ou le Cavity Dumper.	85
Figure 40 : Courbes de déclin de fluorescence pour deux fluorophores (QDot et Hoechst) en fonction des paramètres d'excitation modulés au moyen du Cavity Dumper. Normalisation des courbes – max = 1. Puissances moyennes du faisceau laser : 102 mW (DR20) ; 69 mW (DR30) ; 45 mW (DR50) ; 36 mW (DR70) ; 30 mW (DR90).....	88
Figure 41 : Représentation des différentes zones de collection du signal SHG ('Forward' et 'Backward'). Le signal 'FORWARD' correspond au signal SHG diffusé dans le sens du	

rayon incident d'excitation. Le signal 'BACKWARD' correspond au signal émis dans le sens inverse.	92
Figure 42 : Schéma du système optique utilisé. Le faisceau d'excitation à 800 nm est focalisé au moyen d'un objectif sur un échantillon de peau, la distance d_2 entre l'objectif d'excitation et l'échantillon est maintenue constante. L'objectif de collection du signal SHG a été déplacé (variation de la distance H et donc de d_1).	93
Figure 43 : Profils des images SHG pour le plan $-3803 \mu\text{m}$ en fonction de la position de l'objectif de collection. Objectif d'excitation $\times 10$ ($\text{NA}=0,3$). Objectif de collection $\times 40$ ($\text{NA}=0,8$). Intensité totale du signal de l'image. Expérience a.	94
Figure 44 : Profils des images SHG pour le plan $-4243 \mu\text{m}$ en fonction de la position de l'objectif de collection. Objectif d'excitation $\times 10$ ($\text{NA}=0,3$). Objectif de collection $\times 40$ ($\text{NA}=0,8$). Intensité totale du signal de l'image. Expérience b.	95
Figure 45 : Profils des images SHG pour le plan $-4336 \mu\text{m}$ en fonction de la position de l'objectif de collection. Objectif d'excitation $\times 10$ ($\text{NA}=0,3$). Objectif de collection $\times 40$ ($\text{NA}=0,8$). Intensité totale du signal de l'image. Expérience c.	95
Figure 46 : Profils en profondeur pour des régions d'intérêt sélectionnées sur trois zones différentes de l'échantillon de peau en fonction de la position de l'objectif de collection. Bleu : $d_1=4,8 \text{ cm}$; Rouge : $d_1=4,9 \text{ cm}$; Jaune : $d_1=5,0 \text{ cm}$; Cyan : $d_1=5,1 \text{ cm}$. Objectif d'excitation $\times 10$ ($\text{NA}=0,3$). Objectif de collection $\times 40$ ($\text{NA}=0,8$).	96
Figure 47 : Profils des images SHG pour le plan $-4225 \mu\text{m}$ en fonction de la position de l'objectif de collection. Objectif d'excitation $\times 20$ ($\text{NA}=0,7$). Objectif de collection $\times 40$ ($\text{NA}=0,8$). Intensité totale du signal de l'image. Expérience a.	97
Figure 48 : Profils des images SHG pour le plan $-4120 \mu\text{m}$ en fonction de la position de l'objectif de collection. Objectif d'excitation $\times 20$ ($\text{NA}=0,7$). Objectif de collection $\times 40$ ($\text{NA}=0,8$). Intensité totale du signal de l'image. Expérience b.	97
Figure 49 : Profils des images SHG pour le plan $-4120 \mu\text{m}$ en fonction de la position de l'objectif de collection. Objectif d'excitation $\times 20$ ($\text{NA}=0,7$). Objectif de collection $\times 40$ ($\text{NA}=0,8$). Intensité totale du signal de l'image. Expérience c.	98
Figure 50 : Profils en profondeur pour des régions d'intérêt sélectionnées sur deux zones différentes de l'échantillon de peau en fonction de la position de l'objectif de collection. Objectif d'excitation $\times 20$ ($\text{NA}=0,7$). Objectif de collection $\times 40$ ($\text{NA}=0,8$).	98
Figure 51 : Représentation des directions de propagation du signal SHG en fonction de l'objectif d'excitation et représentation des zones de collection des différents objectifs utilisés ($\times 10$, $\text{NA}=0,3$; $\times 20$, $\text{NA}=0,7$; $\times 40$, $\text{NA}=0,8$).	100
Figure 52 : Représentation de la direction de propagation du signal SHG après une focalisation du faisceau d'excitation au moyen d'un objectif $\times 10$, $\text{NA}=0,3$. Représentation des zones de collection de l'objectif $\times 40$, $\text{NA}=0,8$ en fonction de sa position en z	100
Figure 53 : Représentation de la direction de propagation du signal SHG après une focalisation du faisceau d'excitation au moyen d'un objectif $\times 20$, $\text{NA}=0,7$. Représentation des zones de collection de l'objectif $\times 40$, $\text{NA}=0,8$ en fonction de sa position en z	101
Figure 54 : Représentation des lobes de diffusion du signal de SHG suivant l'axe de propagation. L'unité pour la matrice correspond à $100 \mu\text{m}$. Un nouveau système de coordonnées a été utilisé de manière à ce que la direction principale d'un lobe du rayonnement suive l'axe des x et varie en sinus cardinal suivant cet axe.	102
Figure 55 : Détermination de l'aire de focalisation du faisceau d'excitation en fonction de la longueur d'onde et de l'ouverture numérique de l'objectif d'excitation.	103
Figure 56 : Représentation des différentes zones de collection du signal SHG ('Forward' et 'Backward'). Le signal 'FORWARD' correspond au signal SHG diffusé dans le sens du	

rayon incident d'excitation. Le signal 'BACKWARD' correspond au signal émis dans le sens inverse.	106
Figure 57 : Cristaux d'acide urique. Excitation MP 800 nm, objectif x40, NA=0,8. Détection du signal SHG émis (a) signal 'BACKWARD' dans le sens inverse au rayon incident (détection NDD) ; (b) signal 'FORWARD' dans le sens du rayon incident (détection en mode 'Lumière transmise'). (c) Superposition des signaux 'forward' et 'backward'. (d) Colocalisation des signaux.	108
Figure 58 : Imagerie des durées de vie de fluorescence pour un échantillon d'acide urique. Excitation MP 800 nm, objectif x40, NA=0,8. Codage couleur et histogrammes de répartition de q_1 (%) et de τ_1 (ps) Détection du signal FLIM au travers de différents filtres : (a) Passe-bas 700 nm ; (b) Passe-bas 700 nm + Passe-bande 400±25 nm ; (c) Passe-bas 700nm + Passe-bande 525±50 nm.....	109
Figure 59 : Histogramme de répartition des durées de vie de fluorescence pour différents filtres d'arrêt à l'émission.	110
Figure 60 : Faisceaux de Collagène d'une carotide de lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x40, NA=0,8. Détection du signal SHG émis (a) signal 'BACKWARD' dans le sens inverse au rayon incident (détection NDD) ; (b) signal 'FORWARD' dans le sens du rayon incident (détection en mode Lumière Transmise). (c) Superposition des signaux 'forward' et 'backward'. (d) Colocalisation des signaux.	111
Figure 61 : Imagerie des durées de vie de fluorescence pour les faisceaux de collagène d'une carotide de lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x40, NA=0,8. Codage couleur et histogrammes de répartition de q_1 (%) et de τ_1 (ps) Détection du signal FLIM au travers de différents filtres : (a) Passe-bas 700 nm ; (b) Passe-bas 700 nm + Passe-bande 400±25 nm	112
Figure 62 : Histogramme de répartition des durées de vie de fluorescence.....	113
Figure 63 : Courbes de déclin de fluorescence (mesures et ajustement) pour un échantillon d'acide urique et de collagène d'une adventice de carotide de lapin. Calcul de la FWHM.	114
Figure 64 : Collagène de l'adventice d'une carotide de lapin. Observation par Imagerie SHG (Excitation MP 800 nm) : (a-b) Faisceau de fibres et (c) fibres ; (d) Observation par microscopie électronique de fibrilles constituant une fibre.....	115
Figure 65 : Languette sternale de lapin. (a) Microscopie électronique. (b) Image en 'Lumière transmise' (488 nm). (c) Image SHG.	116
Figure 66 : Signal SHG provenant du réseau de Collagène. (a) Tendon de lapin. (b) Muscle de souris. (c) Eponge de collagène de type I.....	116
Figure 67 : Peau de souris ayant subi une injection intraveineuse de photosensibilisateur. Excitation MP 800 nm (obj x40, NA=0,8). (a) Projection sur 70 μ m. (b) Projection sur 30 μ m. (c) 1 plan avec (d) le spectre correspondant à l'image complète. Signal codé en niveau de gris : SHG ; Signal codé en rouge : bande spectrale 650-700 nm.	117
Figure 68 : (a) Mésentère intestin de souris, noyaux marqués au Hoechst. (b) Cartilage hyalin, Noyaux marqués à l'iodure de propidium.....	118
Figure 69 : Multiplication logicielle d'une image de référence Iref par différentes valeurs $k = \{4; 2; 1,25; 0,75; 0,5; 0,25\}$. Représentation des conditions de saturation.....	120
Figure 70 : Evolution des paramètres 'Moyenne' et 'Correlation' en fonction de l' 'ASM'. Paramètres de texture calculés pour des échantillons présentant des structures diverses : languette sternale (lapin) ; tendon (lapin) ; artères carotide et fémorale (lapin) ; cartilage (humain) ; éponge de collagène I. Images SHG de taille 100*100 pixels ²	123
Figure 71 : Diagramme ACP représentant les paramètres texturaux calculés à partir d'images SHG d'échantillons présentant des structures diverses : languette sternale (lapin) ; tendon (lapin) ; artères carotide et fémorale (lapin) ; cartilage (humain) ; éponge de collagène I.	

Le tableau indique la contribution de chaque paramètre pour la détermination des axes factoriels.	124
Figure 72 : Spectres d'autofluorescence mesurés sur un explant de cartilage. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA 0,7. Taille de l'image : 220*220µm ² . Régions d'intérêt sélectionnées dans la matrice péricellulaire et la matrice extracellulaire.....	127
Figure 73 : Chondron dans le cartilage articulaire. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Canal gris : Signal SHG - Fibres de collagène (Collection objectif x40, NA=0,8). Canal Vert : Autofluorescence – Protéoglycannes (500-600 nm).	128
Figure 74 : Echantillon de cartilage scanné en continu à 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Perte du signal d'autofluorescence (500-600 nm) au cours du temps (photoblanchiment). Conservation du niveau de signal SHG (Collection objectif x40, NA=0,8).	129
Figure 75 : Perte du signal SHG pour des échantillons traités avec de la Collagénase. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Objectif de collection du signal SHG x40, NA=0,8.	130
Figure 76 : Explants de cartilage (femme 68 ans). Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Images acquises (a) à la surface de l'échantillon, (b) 300 µm sous la surface, (c) 600 µm sous la surface. Canal Vert : Autofluorescence – Protéoglycannes (500-600 nm). Canal Gris : Signal SHG - Collagène (Collection objectif x40, NA=0,8).	132
Figure 77 : Images SHG (Collection objectif x40, NA=0,8) pour des échantillons de cartilage non soumis à compression ou ayant supporté une contrainte mécanique de 1 MPa sinusoïdale (1/2 h ON, 1/2 h OFF) pendant 7 h. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Images acquises pour différentes régions de l'échantillon. Chaque image représente une zone de 87*87 µm ²	134
Figure 78 : Représentation de la 'Correlation' en fonction de l' 'ASM' calculée à partir d'images d'échantillons de cartilage non soumis à compression ou ayant supporté une contrainte mécanique de 1MPa sinusoïdale (1/2 h ON, 1/2 h OFF) pendant 1 ou 7 h. Images acquises pour différentes régions de l'échantillon. Chaque image représente une zone de 87*87 µm ² . Données centrées réduites.	135
Figure 79 : Images MET d'explants de cartilage soumis ou non à contrainte mécanique.....	136
Figure 80 : Rapport Echantillon non comprimé/Echantillon comprimé de la moyenne d'intensité (a), et de l' 'ASM' (b). Compression 1 MPa sinusoïdale, 1/2 h ON, 1/2 h OFF pendant respectivement 1, 3, 5 et 7 h.	138
Figure 81 : Evolution des paramètres 'Correlation' (a) et 'Moyenne' (b) en fonction de l' 'ASM'. Paramètres de texture calculés pour des échantillons incubés avec de la Collagénase (1h, 2h et 3h), ou soumis à compression (1 MPa, 1 Hz, 1, 3, 5 ou 7 h). Chaque valeur correspond au ratio (Echantillon traité)/(Echantillon non traité).	142
Figure 82 : Diagramme ACP représentant les paramètres texturaux calculés à partir d'images SHG. Echantillons soumis à l'action de la Collagénase (1, 2 ou 3 h) ou à contrainte de compression dynamique (1 MPa, 1 Hz, pendant 1, 3, 5 ou 7 h). Le tableau à droite indique la contribution de chaque paramètre pour la détermination des axes factoriels.	144
Figure 83 : Interprétation des axes du diagramme ACP de la Figure 82. (a) Evolution des différents paramètres de texture sur l'espace 2D engendré par la méthode ACP. (b) Interprétation biologique des axes du diagramme ACP.	146
Figure 84 : Spectre de fluorescence mesuré pour une ROI1 (a,b) située au niveau de la matrice péricellulaire d'un chondrocyte et pour une ROI2 (a,c) sélectionnée dans la matrice extracellulaire pour les différentes étapes du marquage du Collagène VI par l'Alexa 488.	148
Figure 85 : Spectres de fluorescence mesurés pour différentes régions d'intérêt. ROI1 : Loge émettant un signal SHG ; ROI2 : Loge n'émettant pas de signal SHG ; ROI3 : MEC..	149

Figure 86 : Projections sur l'axe des abscisses des images correspondant au signal de fluorescence mesuré après les différentes étapes du marquage du Collagène VI par l'Alexa 488.....	151
Figure 87 : Projections sur l'axe des abscisses des images correspondant au signal SHG mesuré après les différentes étapes du marquage du Collagène VI par l'Alexa 488.	151
Figure 88 : Projections sur l'axe des abscisses des images correspondant aux signaux SHG et de fluorescence mesurés pour chaque étape du marquage du Collagène VI par l'Alexa 488.....	152
Figure 89 : Représentation de la corrélation pour des profils de projection d'images SHG mesurés après les différentes étapes du marquage avec l'Alexa 488 avec le profil tracé avant le marquage. L'ajustement avec la droite $f(x)=x$ montre que le signal SHG émanant de la loge des chondrocytes n'est pas affecté par l'action de la hyaluronidase et de la chondroitinase.....	154
Figure 90 : Colocalisation des signaux de fluorescence et SHG aux différentes étapes du marquage du Collagène VI par l'Alexa 488. Binarisation des images de SHG et de Fluorescence, puis application de l'opérateur 'AND'.....	155
Figure 91 : Courbes de déclin de fluorescence provenant de 3 ROIs différentes : Zone péricellulaire émettant simultanément un signal de fluorescence et un signal SHG ; Zone péricellulaire émettant un signal de fluorescence ; MEC. (a) Déclins non normalisés. (b) Déclins normalisés tels que le maximum soit égal à 1.....	157
Figure 92 : Explant de cartilage. Excitation MP 800 nm (objectif x20, NA=0,7). FLIM : Images codées selon les différentes variables de l'ajustement biexponentiel des courbes de déclin de fluorescence (τ_m (ps) ; τ_1 (ps) ; τ_2 (ps) ; a_1 (%)). Histogrammes représentant la distribution de ces paramètres sur l'image complète.	158
Figure 93 : Explant de cartilage. Excitation MP 800 nm (objectif x20, NA=0,7). FLIM : Images codées selon τ_m (ps). Histogrammes représentant la distribution de τ_m sur l'image complète.	160
Figure 94 : Signal SHG émanant de la loge de chondrocytes. Excitation MP 800 nm (objectif x20, NA=0,7). Collection du signal SHG dans le sens du rayon incident : objectif x40, NA=0,8, codage en niveaux de gris. Collection du signal SHG en mode NDD dans le sens inverse au rayon incident, codage vert.	161
Figure 95 : Carotide de Lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Niveaux de Gris : Signal SHG – Collagène (Collection objectif x40, NA=0,8). Canal Vert : Autofluorescence (550-600 nm) – Elastine. Canal Bleu : Fluorescence du Hoechst (400-430 nm) – noyaux de cellules vasculaires.....	164
Figure 96 : Spectres d'émission de Quantum Dots (525 – 565 – 585 – 655 – 685) suivant une excitation multiphoton à 810 nm.....	165
Figure 97 : Spectres d'émission pour différents Quantum Dots (525 – 565 – 585 – 655 – 685) suivant une excitation multiphoton à 810 nm et représentation des spectres obtenus par ajustement gaussien.....	166
Figure 98 : Courbes de déclin de fluorescence mesurées pour le QDot-565 seul et la RhodamineB seule. Constante de déclin calculée pour un ajustement monoexponentiel. Courbes de déclin de fluorescence mesurées pour une solution contenant QDot-565 + Rhodamine. Constante de déclin calculée pour un ajustement biexponentiel. Normalisation des courbes : max = 1.....	168
Figure 99 : Artères fémorale de lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x40 , NA =0.8 .Cytosquelette (Phalloïdine biotinylée liée à QDot-565-Streptavidine ; Canal Rouge : 500-650 nm). Noyaux cellulaires (Hoechst ; Canal Vert 350-480 nm). (b) Spectre d'émission de fluorescence sur l'image (a) complète. (d) Image des durées de Vie de fluorescence (Ajustement biexponentiel - Représentation de la durée de Vie moyenne) et	

histogramme de répartition pour la région délimitée par les curseurs blancs. L'image (d) représente la même image de l'échantillon que l'image codée en fluorescence (c).	169
Figure 100 : Artère fémorale de lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x40, NA=0.8. Cytosquelette (Phalloïdine biotinylée liée à QDot565-Streptavidine ; Canal Rouge : 500-650 nm). (b) Spectre d'émission de fluorescence sur l'image (a) complète. (d) Image des durées de Vie de fluorescence (Ajustement biexponentiel - Représentation de la durée de Vie moyenne) et histogramme de répartition pour la région délimitée par les curseurs blancs. L'image (d) représente la même image de l'échantillon que l'image codée en fluorescence (c).	170
Figure 101 : Action de la Collagénase de type I sur une carotide de Lapin en fonction du temps d'incubation. Excitation MP 800nm, objectif x20, NA=0,7. Niveaux de Gris : Signal SHG – Collagène (Collection objectif x40, NA=0,8). Canal Vert : Autofluorescence (400-500 nm) – Elastine. Projection sur 53 µm (26 plans avec un pas ~2 µm).	171
Figure 102 : Action de la Collagénase de type I sur une carotide de Lapin en fonction du temps d'incubation. Excitation MP 800nm, objectif x20, NA=0,7. Niveaux de Gris : Signal SHG – Collagène (Collection objectif x40, NA=0,8). Projection sur l'axe des ordonnées du signal SHG mesuré au niveau de la même région d'intérêt (t=0 s, t=45 min, t=95 min). Projection (en z) sur 53 µm (26 plans avec un pas ~2 µm).	172
Figure 103 : Action de la Collagénase de type I sur une carotide de Lapin en fonction du temps d'incubation. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Evolution de l'intensité moyenne du signal SHG (Collection objectif x40, NA=0,8) sur une région d'intérêt en fonction du temps d'incubation. Projection sur 53 µm (26 plans avec un pas ~2 µm).	172
Figure 104 : Action de la Collagénase de type I sur une carotide de Lapin en fonction du temps d'incubation. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Evolution de l'intensité moyenne du signal SHG (Collection objectif x40, NA=0,8) sur une région d'intérêt en fonction du temps d'incubation.	173
Figure 105 : Action de la Collagénase de type I sur une carotide de Lapin en fonction du temps d'incubation. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Profil de signal SHG (Collection objectif x40, NA=0,8) au niveau de l'adventice de la paroi artérielle pour différents temps d'incubation. Projection sur 53 µm (26 plans avec un pas ~2 µm). D=0 µm correspond à la partie externe de la paroi.	173
Figure 106 : Carotide de Lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Niveaux de Gris : Signal SHG – Collagène (Collection objectif x40, NA=0,8). Incubation avec de la Collagénase pendant 2 h. Projection sur ~30 µm (15 plans – pas de 2 µm).	174
Figure 107 : Fibres de Collagène de la paroi adventitielle d'une carotide de lapin. Mesure su signal SHG (Collection objectif x40, NA=0,8 ; Excitation MP 800 nm) après différents temps d'incubation avec de la Collagénase.	175
Figure 108 : Spectre d'autofluorescence de l'élastine composant la média d'une carotide de lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7.	176
Figure 109 : Effet du mode de conservation sur la réponse SHG du Collagène et la fluorescence intrinsèque de l'élastine pour la carotide et l'artère fémorale de lapin fraîche, fixée ou cryopréservée. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Niveaux de Gris : Signal SHG – Collagène (Collection objectif x40, NA=0,8). Canal Vert : Autofluorescence (400-500 nm) – Elastine.	178
Figure 110 : Comparaison de différents types de vaisseaux (lapin). Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. (a) Carotide ; (b) Artère fémorale ; (c) Aorte abdominale. Canal vert : Autofluorescence – Elastine (500-600 nm). Niveaux de gris : SHG – Collagène (Collection objectif x40, NA=0,8).	179

Figure 111 : Mesure de l'épaisseur de la média et de l'adventice au niveau d'une carotide de lapin. Profils sur la paroi artérielle représentant le signal de Collagène (gris) et le signal de fluorescence de l'élastine (vert). La média présente une épaisseur comprise entre 170 et 180 μm et l'adventice une épaisseur de l'ordre de 200 à 215 μm	181
Figure 112 : Mesure de l'épaisseur de la média et de l'adventice au niveau d'une artère fémorale de lapin. Profils sur la paroi artérielle représentant le signal de Collagène (gris) et le signal de fluorescence de l'élastine (vert). La média présente une épaisseur comprise entre 140 et 150 μm et l'adventice une épaisseur de l'ordre de 150 à 200 μm	182
Figure 113 : Mesure de l'épaisseur de la média et de l'adventice au niveau d'une aorte de lapin. Profils sur la paroi artérielle représentant le signal de Collagène (gris) et le signal de fluorescence de l'élastine (vert). La média présente une épaisseur comprise entre 200 et 300 μm et l'adventice une épaisseur de l'ordre de 150 μm	183
Figure 114 : Tracé des profils permettant de mesurer le diamètre des faisceaux de fibres de collagène pour différents types de vaisseaux. (a) Carotide de lapin, (b) Artère fémorale de lapin, (c-d) Aorte de lapin, (e-f) Artère ombilicale humaine.	185
Figure 115 : Faisceaux de fibres d'une carotide de lapin. Diamètre moyen d'une fibre ~670 nm. Diamètre moyen d'un faisceau ~7,5 μm	186
Figure 116 : Artère ombilicale humaine cryopréservée avant et après 6 mois d'implantation au niveau d'une carotide de lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Niveaux de Gris : Signal SHG – Collagène (Collection objectif x40, NA=0,8). Canal Vert : Autofluorescence (500-600 nm) – Elastine.....	187
Figure 117 : Artère ombilicale humaine cryopréservée après 6 mois d'implantation au niveau d'une carotide de lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Canal Vert (500-570 nm): Autofluorescence (500-600 nm) – Elastine. Canal Rouge (580-670 nm): Fluorescence de la Rhodamine B(marquage film de polyélectrolytes). Images représentant la superposition des canaux de détection.....	188
Figure 118 : Artère ombilicale humaine après 6 mois d'implantation au niveau d'une carotide de lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Niveaux de Gris : Signal SHG – Collagène (Collection objectif x40, NA=0,8). Canal Vert : Autofluorescence (500-570 nm) – Elastine. Canal Bleu : Fluorescence du Hoechst (390-480 nm) – noyaux de cellules.....	189
Figure 119 : Artère ombilicale humaine après 6 mois d'implantation au niveau d'une carotide de lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Niveaux de Gris : Signal SHG – Collagène (Collection objectif x40, NA=0,8). Canal Vert : Autofluorescence (500-570 nm) – Elastine. Canal Bleu : Fluorescence du Hoechst (390-480 nm) – noyaux de cellules. Spectres mesurés sur différentes régions d'intérêt : ROIs 1 et 2 : Noyaux ; ROI 3 : Limitante élastique interne ; ROI4 Fibre élastique interne.	189
Figure 120 : Artère ombilicale humaine après 6 mois d'implantation au niveau d'une carotide de lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Images codées en durée de vie de fluorescence – Ajustement monoexponentiel des courbes de déclin. Graphiques représentant la superposition de courbes de déclin de fluorescence correspondant à différentes zones des images.	190
Figure 121 : Artère ombilicale humaine après 6 mois d'implantation au niveau d'une carotide de lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. (a,c) Niveaux de Gris : Signal SHG – Collagène (Collection objectif x40, NA=0,8). Canal Vert : Autofluorescence (400-500 nm) – Elastine. Canal bleu : Hoechst (noyaux). (b,d) Images codées en durée de vie de fluorescence – Ajustement bi-exponentiel des courbes de déclin. Histogramme de répartition des durées de vie moyennes sur les images complètes. (e) Histogramme de répartition du poids de la composante courte (a1 %).	192

- Figure 122 : Spectres de fluorescence associés à différentes régions d'intérêt. Vascularisation de tumeur murine. Excitation MP 820 nm, obj x20 (NA=0.7). Projection (Profondeur 83 μm) ; Superposition : Canal Bleu 400-425 nm (SHG), Canal Vert 540-600 nm (Réseau vasculaire visualisé par fluorescence de microsphères de polystyrène), Canal Rouge 655-700 nm (photosensibilisateur)..... 195
- Figure 123 : Spectres de fluorescence associés à différentes régions d'intérêt. Vascularisation de tumeur murine suite à une injection de photosensibilisateur. Excitation MP 820 nm, obj x20 (NA=0,7). Canal Vert 540-600 nm (Réseau vasculaire visualisé par fluorescence de microsphères de polystyrène), Canal Rouge 655-700 nm (photosensibilisateur). ... 196
- Figure 124 : Vascularisation de tumeur murine suite à une injection de photosensibilisateur. Excitation MP 820 nm, obj x20 (NA=0,7). Réseau vasculaire visualisé par fluorescence de microsphères de polystyrène. Images en durées de vie de fluorescence. Histogramme de répartition des temps de vie sur l'image complète. Déclins de fluorescence (Billes ~3,6 ns ; PS ~2,3 ns)..... 196
- Figure 125 : Vascularisation de tumeur murine. Excitation MP 800 nm, obj x20 (NA=0,7). Projection (Profondeur 83 μm) ; Superposition : Niveaux de Gris (SHG provenant du réseau de collagène), Canal Vert 540-600 nm (Réseau vasculaire visualisé par fluorescence de microsphères de polystyrène), Canal Rouge 655-700 nm (photosensibilisant). 197
- Figure 126 : Fluorescence du Foslip® au sein d'une tumeur injectée de manière intratumorale. Evolution de la distribution en fonction de différents temps entre l'injection et le sacrifice (1/2, 1, 3, 6 et 24 h). Flèches indiquant le point d'injection. Excitation : Filtre Passe-Bande 560/40 nm. Emission : Filtre Passe-Bande 645/75 nm. 198

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Les différents types de collagène dans les tissus biologiques (http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/francais/bindegewebe/sfa/fasern/f-kollagen.php).....	39
Tableau 2 : Caractéristiques des différents objectifs utilisés pour la focalisation du faisceau d'excitation et pour la collection du signal SHG.	59
Tableau 3 : Méthode de calcul des paramètres texturaux de Haralick, basée sur l'analyse des matrices de cooccurrence.	62
Tableau 4 : Calcul des paramètres de normalisation des cinétiques de photoblanchiment.....	73
Tableau 5 : Caractérisation en Puissance et Energie du faisceau d'excitation en fonction de la fréquence de tir en sortie du Cavity Dumper. Puissance moyenne (mesurée), Puissance Crête (calculée), Energie impulsionnelle (calculée).	73
Tableau 6 : Caractéristiques des différents objectifs utilisés pour la focalisation du faisceau d'excitation et pour la collection du signal SHG.	93
Tableau 7 : Rapport de l'intensité du signal par rapport au signal maximal mesuré en fonction de la distance de l'objectif de collection. Excitation MP 800 nm, objectif x40, NA=0,8. Objectif de Collection x20, NA=0,7 ou x10, NA=0,3.	99
Tableau 8 : Détermination de l'aire de focalisation pour une longueur d'onde de 800 nm... 103	103
Tableau 9 : Quantité de signal SHG collecté en fonction de la position de l'objectif de collection en supposant une propagation du signal SHG similaire au rayonnement d'une antenne (lobe de diffraction suivant une loi sinus cardinal).....	104
Tableau 10 : Quantité de signal SHG collecté en fonction de la position de l'objectif de collection en supposant une propagation du signal SHG similaire au rayonnement d'une antenne (lobe de diffraction suivant une loi sinus cardinal). Confrontation des résultats théoriques et des mesures expérimentales pour une collection avec l'objectif x40.....	105
Tableau 11 : Quantité maximale de signal SHG pouvant être mesuré en combinant les différents objectifs, en supposant l'aire de focalisation optimale pour une excitation avec l'objectif x40.	105
Tableau 12 : Paramètres avant normalisation par la moyenne de l'image (Orange : variations de $\pm 15\%$; bleu : variations $< 2\%$).	121
Tableau 13 : Paramètres après normalisation par la moyenne de l'image (Orange : variations de $\pm 15\%$; bleu : variations $< 2\%$).	121
Tableau 14 : Ecarts mesurés pour les paramètres texturaux calculés à partir d'images SHG d'échantillons présentant des structures diverses : languette sternale (lapin) ; tendon (lapin) ; artères carotide et fémorale (lapin) ; cartilage (humain) ; éponge de collagène I.	125
Tableau 15 : Ecarts mesurés pour les paramètres texturaux calculés à partir d'images acquises pour un même échantillon soumis à l'action de la Collagénase. Mesures en surface pour un temps d'incubation de 0, 1, 2 puis 3 h.....	131
Tableau 16 : Ecarts mesurés pour les paramètres texturaux calculés à partir d'images acquises dans 5 différentes zones d'un même échantillon à raison de 5 images par zone.	133
Tableau 17 : Ecarts mesurés pour les paramètres texturaux calculés à partir d'images acquises pour des durées de compression variables (1, 3, 5 et 7 h) (a) 'Surface' (b) 'Milieu' (~300 μm sous la surface) et (c) 'Profondeur' (~600 μm sous la surface) à raison de 5 images par zone.	139

Tableau 18 : Evolution des paramètres texturaux (Haralick) lorsque les échantillons sont soumis à compression mécanique (1 MPa, sinusoïdale, intermittente ½ ON, ½ h OFF) ; en profondeur ; après incubation avec de la Collagénase. Les zones grisées représentent les paramètres qui varient très peu (Ecart type <7%).....	143
Tableau 19 : Coefficients de corrélation entre les profils obtenus à partir des projections sur l'axe des abscisses des images correspondant aux signaux SHG et de fluorescence mesurés pour chaque étape du marquage du Collagène VI par l'Alexa 488.	153
Tableau 20 : Paramètres d'ajustement des spectres d'émission de différents QDots (supposés gaussiens). I_{max} : intensité maximale de la gaussienne. W : largeur à mi-hauteur de la Gaussienne. P : position du centre de la Gaussienne.	166
Tableau 21 : Temps de Vie de Fluorescence calculé pour un ajustement monoexponentiel pour le QDot-565. Excitation MP à 800 nm. Statistiques réalisées pour une image 128*128 pixels ² . Energie par pulse d'excitation MP à 810 nm : 65 nJ.....	167
Tableau 22 : Temps de Vie de Fluorescence calculé pour un ajustement monoexponentiel pour la Rhodamine B. Excitation MP 800 nm. Statistiques réalisées pour une image 128*128 pixels ² . Energie par pulse d'excitation MP 810 nm : 65 nJ.....	167
Tableau 23 : Temps de Vie de Fluorescence calculé pour un ajustement biexponentiel pour une solution contenant un mélange de QDot-565 et de Rhodamine B. Excitation MP 800 nm. Statistiques réalisées pour une image 128*128 pixels ²	168
Tableau 24 : Evolution des paramètres texturaux (Haralick) lorsque les échantillons (carotide de lapin) ont été soumis à l'action de la Collagénase. Les zones grisées représentent les paramètres qui varient très peu (Ecart type <7%).	175
Tableau 25 : Mesure de l'épaisseur de la média et de l'adventice d'une carotide, d'une artère fémorale et d'une aorte de lapin.	184

I. INTRODUCTION

Pour avancer dans la problématique d'ingénierie tissulaire, le besoin des chercheurs évolue vers l'observation et l'analyse dans des systèmes de culture les plus proches de la réalité physiologique et mécanistique. Certains organes ou tissus ne peuvent se régénérer de manière autonome lorsqu'ils ont été partiellement ou totalement détruits. Le principal objectif de l'ingénierie tissulaire est d'aboutir à des constructions qui devraient permettre de suppléer ou de remplacer ces structures existantes au niveau du corps humain. En général, un tissu est composé de cellules intégrées dans une matrice extracellulaire. Les constructions obtenues en ingénierie tissulaire tentent de mimer cette organisation et sont de ce fait constituées d'un support (ou scaffold) sur lesquels sont cultivées des cellules. La différenciation et la fonctionnalité cellulaire souhaitée sont en général guidées par les contraintes environnementales (mécanique et/ou biochimique). Les principaux axes d'ingénierie tissulaire développés dans mon laboratoire d'accueil concernent le cartilage, les vaisseaux et le tendon [1]. L'un des principaux objectifs des équipes est de parvenir à une adhésion cellulaire sur différents types de support en vue d'une implantation, soit par modification de surface existante [2] soit par synthèse de scaffold [3], ou encore dans des billes d'alginate [4].

L'environnement cellulaire d'un tissu, en particulier la matrice extracellulaire, joue un rôle important, puisque cette dernière contribue fortement aux propriétés biomécaniques de celui-ci. Sa désorganisation ou dénaturation peut mener à des pathologies, comme l'arthrose dans le cas du cartilage ou l'athérosclérose dans le domaine vasculaire. En ingénierie tissulaire, l'un des enjeux consiste à aboutir à des structures présentant des organisations matricielles proches de celles rencontrées dans les tissus sains. Pour valider la fonctionnalité des biotissus, ou de nouvelles constructions tissulaires, il convient de déterminer des marqueurs ou descripteurs qui témoignent soit de la qualité d'un tissu, soit d'un phénomène de dégénérescence. Leur expression doit pouvoir être caractérisée au moyen d'une technique présentant à la fois une résolution adaptée à l'échelle cellulaire et tissulaire ainsi qu'un caractère non invasif.

De par ses nombreux avantages, la microscopie multiphoton permet de répondre en partie à ces besoins. L'utilisation d'un rayonnement d'excitation proche infrarouge permet de rester compatible avec la viabilité cellulaire des échantillons et de procéder à des observations

en profondeur des échantillons (250 μm), tout en présentant une forte résolution (200x400 nm). Le couplage d'une excitation en mode multiphoton à différentes modalités de détection (spatiale, spectrale, d'orientation, temporelle) permet d'obtenir des informations structurales complémentaires. Par exemple, la mesure du signal d'autofluorescence des tissus permet l'imagerie de l'élastine ou des protéoglycannes. La mesure des durées de vie de fluorescence permet de mettre en évidence des modifications de l'environnement physico-chimique des molécules. Enfin, la détection du signal de seconde harmonique généré est spécifique au collagène entrant dans la composition de la plupart des tissus biologiques.

Cette introduction portera dans un premier temps sur l'organisation anatomique du cartilage et des artères qui sont les principaux tissus faisant l'objet des travaux du laboratoire. Une seconde partie permettra de présenter les outils d'imagerie actuels et de replacer la microscopie multiphoton dans ce contexte. Puis nous détaillerons les différentes modalités d'imagerie utilisées dans ce travail, à savoir le phénomène de fluorescence et la génération de seconde harmonique. A l'issue de cette présentation, nos objectifs seront établis.

I.1. L'organisation de différents tissus biologiques – le cartilage et les vaisseaux sanguins

I.1.A. Le cartilage

I.1.A.1. La structure du cartilage

Le cartilage est un matériau avasculaire composé d'un type de cellules, les chondrocytes, incluses dans une matrice extracellulaire (MEC). Cette dernière est constituée essentiellement d'eau, de fibres de collagène interagissant avec un gel de protéoglycannes (Figure 1).

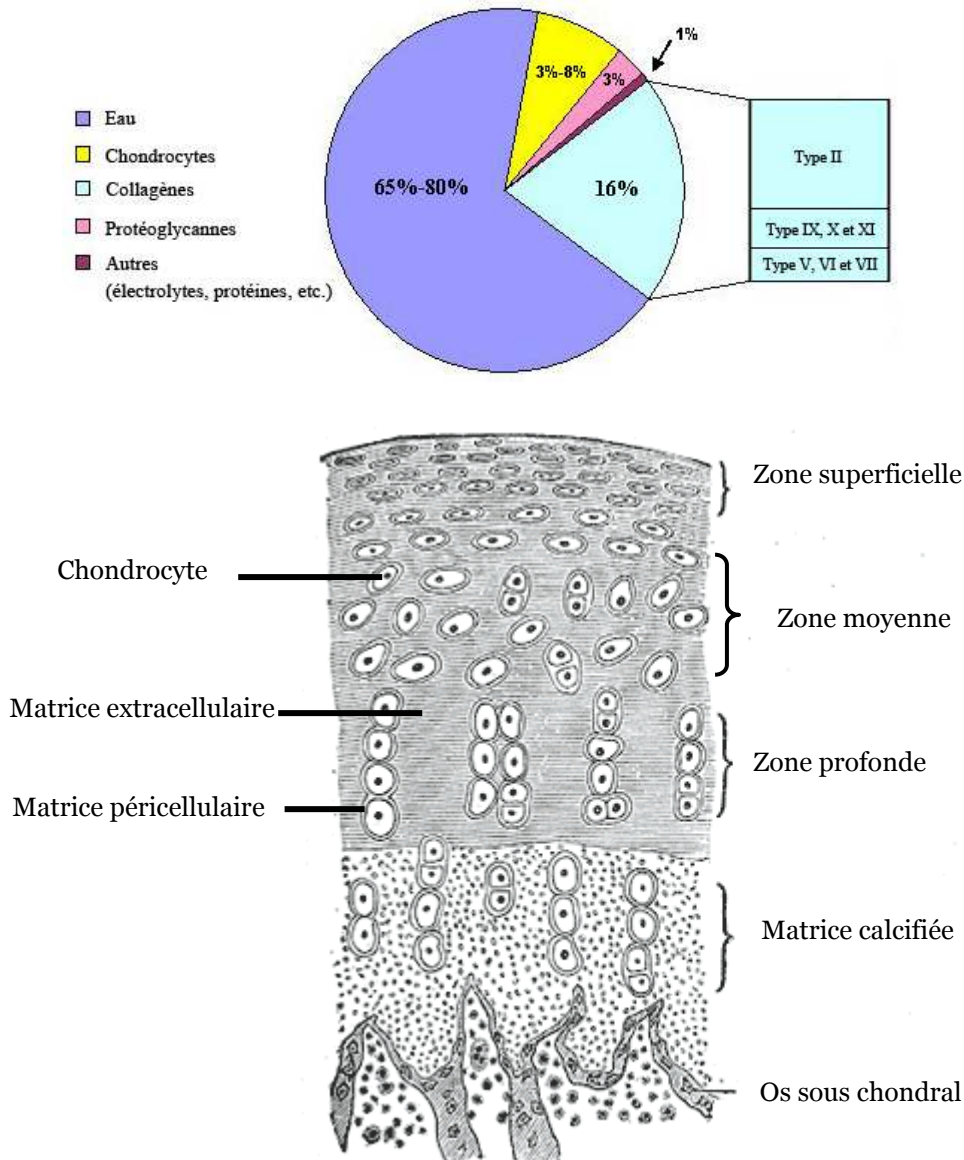


Figure 1 : Composition du cartilage humain (<http://www.bartleby.com/107/illus293.html>).

La MEC contient de nombreux types de collagène différents, mais le constituant principal est le Collagène de type II [5]. Le cartilage présente des propriétés élastiques (réseau de collagène) et de viscosité (protéoglycannes) qui lui permettent de répondre aux contraintes mécaniques auquel il est soumis quotidiennement (0,7 MPa pour une position debout, 5 à 10 MPa pour une activité de marche, supérieure à 18 MPa lors de pratique sportive intense). Les techniques d'imagerie utilisées majoritairement pour l'étude du cartilage sont l'IRM {Alhadlaq, 2004 #152; de Visser, 2008 #336; Rubenstein, 1996 #151} ou la microscopie électronique [6,7]. L'imagerie confocale ou multiphoton permet d'apporter des informations complémentaires à ces deux techniques [8,9].

I.1.A.2. L'importance de la matrice extracellulaire du cartilage

Dans les échantillons de cartilage sain, les fibres de collagène sont distribuées de manière pseudo-aléatoire et interagissent avec le gel de protéoglycannes [10,11]. L'arthrose est une pathologie dégénérative conduisant à une dégradation de la MEC et une perte de l'uniformité du réseau de collagène [12,13]. Il a été montré que pour des échantillons de cartilage de patients atteints d'arthrose, la déformation et l'inflammation sont liées à la dégradation du réseau de collagène [14]. De la même manière, l'application de contraintes mécaniques ou biochimiques [15-19] affecte la composition et l'organisation saine de la MEC ainsi que la distribution des fibres de collagène [20-23] avec un impact sur la morphologie cellulaire [24]. La MEC s'adapte aux contraintes mécaniques appliquées [25]. Le contenu global en collagène II diminue dans les échantillons arthrosiques et s'accompagne d'une augmentation de molécules de collagène II dénaturées [26,27].

La formation de 'clusters' de fibrilles (agrégats sur une distance de l'ordre de 0,5-5 μm) a déjà été montrée dans de précédentes études [28], et la modification structurale dépend de la manière dont les fibres sont interconnectées [29]. Par ailleurs, il apparaît que lorsque les échantillons sont soumis à compression, les effets d'agrégation sont plus marqués au niveau de la surface [28,30].

Outre les effets d'agrégation, la compression cyclique peut également engendrer des effets plus importants. Elle peut aboutir à une destruction du réseau de collagène, conduisant à un affaiblissement de la MEC [31]. Des études ont aussi montré l'impact des contraintes mécaniques sur l'interaction entre les chondrocytes et la MEC [32], et sur le 'turnover' et la structure de macromolécules produites par le collagène [33].

I.1.A.3. Le rôle de la matrice péricellulaire des chondrocytes

Comprendre le rôle de la matrice péricellulaire des chondrocytes pour la transduction de signaux biomécaniques ou biochimiques continue de susciter l'intérêt des chercheurs [34]. Cet espace péricellulaire contiendrait du collagène VI [35-38] et pourrait révéler un état de dégradation du cartilage. Ainsi, le contenu en collagène VI de la zone péricellulaire augmenterait dans le cas de pathologies dégénératives comme l'arthrose [39,40]. Des

hypothèses ont été émises sur le probable aspect ‘protecteur’ face aux contraintes de cette molécule [41].

Par ailleurs, la matrice péricellulaire jouerait un rôle important pour la transduction de signaux biomécaniques ou biochimiques [34] et la présence de collagène VI dans la zone péricellulaire attesterait de la bonne fonctionnalité du tissu (témoin de la mécanotransduction). En ingénierie tissulaire, la mise en évidence de la présence de collagène VI au niveau péricellulaire permettrait ainsi de valider les structures anatomiques susceptibles d’être synthétisées en terme de biofonctionnalité.

1.1.B. Les vaisseaux

1.1.B.1. La structure des vaisseaux

La paroi des vaisseaux sanguins est composée de différentes couches concentriques, chacune caractérisée par un type de cellules et une composition spécifique de la matrice extracellulaire (Figure 2). L’intima, la partie interne des vaisseaux (en contact avec le flux sanguin) est constituée d’une couche de cellules endothéliales. La média est constituée d’un réseau d’élastine (plus ou moins dense en fonction du type d’artère) et de collagène au sein duquel on retrouve essentiellement des cellules musculaires lisses. L’adventice, la partie la plus externe du vaisseau est constituée essentiellement de fibres de collagène. Ces trois couches concentriques sont séparées par des membranes élastiques (limitante élastique interne entre l’intima et la média, limitante élastique externe entre la média et l’adventice).

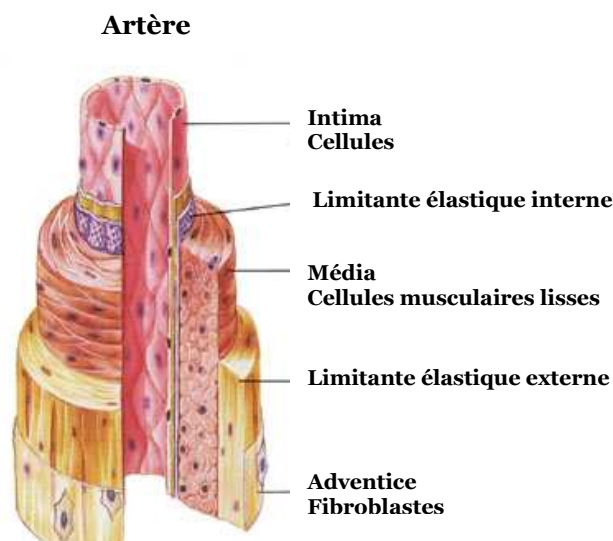


Figure 2 : Constitution de la paroi artérielle (<http://www.sci.sdsu.edu/class/bio590/pictures/lect5/artery-vein.jpeg>).

I.1.B.2. L'importance de la matrice extracellulaire des vaisseaux

L'élastine et le collagène représentent les constituants majeurs de la MEC des vaisseaux sanguins. L'importance du contenu en élastine et collagène influe fortement sur la rigidité et la viscoélasticité artérielle [42-44]. Par exemple, dans le cas de l'hypertension, les parois artérielles sont rigidifiées par un excès de collagène, conduisant à une pression sanguine plus élevée [45].

Les microscopies confocale et multiphoton ont déjà prouvé leur intérêt pour l'imagerie des parois artérielles [46], ou la visualisation de plaques d'athérosclérose [47,48].

La MEC joue un rôle crucial pour tous les aspects de la biologie vasculaire. Elle n'est pas seulement le support des cellules endothéliales, mais elle peut influencer l'organisation de leur cytosquelette, et leur prolifération. Il a été montré que la régulation et le remodelage de la MEC jouent un rôle dans la stabilité et la maturation de néo-vaisseaux [49].

Le remodelage tissulaire intervient aussi bien dans le cas de pathologies que lors de la synthèse de MEC. Il est relié au flux auquel sont soumises les parois artérielles [50-52] et peut influencer sur la fonctionnalité des tissus [53]. Comprendre ces phénomènes de remodelage du réseau de collagène permettrait d'optimiser les protocoles en ingénierie tissulaire (conditionnement, contraintes mécaniques...). Des modèles théoriques de remodelage en fonction de différents stimuli mécaniques ont récemment été publiés par rapport au tissu cardiovasculaire [54] ou au niveau de bifurcations carotidiennes [55,56].

L'émergence des techniques multiphoton et SHG permet d'avancer dans la compréhension de la biomécanique vasculaire. Le réseau d'élastine est fortement autofluorescent sous excitation MP [57], et le réseau de collagène émet un intense signal SHG. Ainsi la modification de structure a pu être mise en évidence au niveau d'artères coronaires lors de la distension des vaisseaux [58] ou sous l'action d'un médicament [59].

Une approche d'imagerie MP/SHG pourrait permettre de mieux analyser les phénomènes biomécaniques intervenant dans certaines pathologies comme l'hypertension, le diabète ou l'athérosclérose. Mais également d'étudier l'influence de certains composés chimiques sur l'altération de la structure des vaisseaux [60] ou encore valider une méthode de conservation d'échantillons [61,62].

1.1.C. Les tumeurs

L'imagerie multiphoton a déjà montré son intérêt pour l'imagerie de tumeurs et permis de différencier des états sains d'états cancéreux ou précancéreux [63]. En particulier, associée à la détection du signal SHG, une réorganisation du collagène a pu être mise en évidence [64]. Cette modification de la MEC a permis de comprendre certains mécanismes intervenant lors du cancer. L'altération en termes de densité de collagène et le réalignement des fibres facilitent l'invasion locale de cellules tumorales puisque celles-ci migrent préférentiellement le long de ces fibres [65,66]. Plusieurs types d'organisation ont ainsi pu être identifiés, et pourraient permettre la caractérisation d'états précancéreux. De plus, le contenu et la structure du réseau de collagène dépendent du type de tumeur [67] et influencent la diffusion de médicaments au sein des masses tumorales. Des études préliminaires ont déjà été menées sur des gels de collagène [68]. De plus, l'angiogenèse est un facteur facilitant l'invasion tumorale : la synthèse de nouveaux vaisseaux s'accompagne d'une adaptation du réseau collagénique existant [69]. L'observation d'échantillons, couplée à diverses techniques d'analyse d'image devrait permettre de modéliser la complexité du réseau vasculaire alimentant les tumeurs [70].

Puis les applications se sont développées sur le tissu tumoral. Par exemple, l'injection de relaxine utilisée cliniquement entraîne un raccourcissement des fibres de collagène et de ce fait un accroissement du coefficient de diffusion. Bien que la synthèse de collagène reste effective lors du traitement, la nouvelle matrice apparaît plus poreuse. D'où l'intérêt pour les chercheurs d'étudier les modifications entraînées par une intervention pharmacologique [67].

1.2. Les méthodes d'imagerie actuelles

Les techniques de diagnostic actuelles s'appuient sur divers types de rayonnements, ionisants ou non. Elles donnent accès à des informations morphologiques anatomiques, ou fonctionnelles avec une résolution souvent limitée. Les tableaux donnés en annexe résument pour la plupart des techniques qui utilisent couramment ces propriétés de résolution.

Annexe A - http://www.voxelera.co.uk/downloads/tablepart2_may2006.pdf

Annexe B - http://www.voxelera.co.uk/downloads/tablepart1_jan2006.pdf

1.2.A. Les méthodes ionisantes

Parmi les méthodes ionisantes, l'imagerie fonctionnelle des radiotraceurs (PET Scan, Scintigraphie) permet une résolution de l'ordre de 5 à 10 mm. Elle ne reflète pas directement l'anatomie d'un organe, mais son métabolisme.

L'utilisation de rayons X (radiographie ou Scanner X) permet de distinguer des structures anatomiques ayant des dimensions de l'ordre du millimètre et présente typiquement une résolution de 0,1 mm. L'acquisition de coupes successives (Scanner hélicoïdal) permet la reconstruction tridimensionnelle des structures étudiées.

Ces outils d'imagerie peuvent être appliqués à l'observation de la vascularisation, du cartilage ou de tumeurs cancéreuses. Ainsi, l'angiographie utilise les rayons X et permet après l'injection d'un produit de contraste (Gadolinium) d'analyser l'état de la lumière vasculaire. De même, l'artériographie, basée sur l'injection d'un produit de contraste iodé permet d'apprécier l'état de la vascularisation. L'arthroscanner permet de visualiser les lésions cartilagineuses après injection d'un produit iodé hydrosoluble. La fixation de ^{18}F -FDG par les tissus cancéreux, présentant un métabolisme plus élevé que les tissus sains, permet d'obtenir rapidement un bilan d'extension du cancer au niveau du corps humain ou la réponse à un traitement thérapeutique (PET Scan).

Ces techniques ionisantes et donc invasives (injection de produits, rayonnements d'électrons) requièrent une vigilance par rapport aux doses radiatives nécessaires à la formation des images ou aux doses d'isotopes radioactifs injectées et dont l'utilisation est soumise à des réglementations spécifiques.

1.2.B. Les méthodes non ionisantes

Les méthodes dites non ionisantes sont basées soit sur l'utilisation d'un rayonnement en lumière visible, d'ultrasons ou de champs magnétiques.

L'échographie se base sur l'utilisation des ultrasons qui sont réfléchis avec plus ou moins de puissance selon la nature des tissus. Elle permet une résolution de l'ordre de

0,5 mm. Cette technique est fortement dépendante du savoir-faire de l'opérateur. L'échodoppler se base sur la réflexion d'ultrasons sur le sang en mouvement et permet de mesurer sa vitesse qui dépend en partie du diamètre des artères. Cette méthode permet ainsi de mettre en évidence des rétrécissements comme dans le cas de plaques d'athérome.

La RMN caractérise des variations de champ magnétique dues à des densités en protons différentes selon les structures anatomiques. La génération du signal RMN nécessite l'utilisation de puissants champs magnétiques. Au niveau anatomique, l'IRM permet de réaliser des coupes dans toutes les directions de l'espace et donc une visualisation 3D des structures.

Des informations sur l'état du système vasculaire peuvent être obtenues par l'Angiographie par résonance Magnétique (ARM) et repose sur la différence de magnétisation entre les protons mobiles et ceux circulant (flux sanguin). Elle apporte des informations hémodynamiques (sens du flux, vélocimétrie).

De nouvelles séquences d'acquisition IRM ont relancé l'intérêt pour l'IRM dans la détermination des lésions cartilagineuses. Cette technique est parfois associée à l'injection de Gadolinium (arthro IRM) mais reste peu utilisée, car l'utilisation du produit de contraste lui fait alors perdre son caractère non invasif.

Les techniques citées ci-dessus permettent l'imagerie de tissus à l'échelle d'organes entiers de manière plus ou moins invasive en fonction du rayonnement utilisé, mais ne sont pas adaptées à l'échelle cellulaire. Pour obtenir une échelle d'observation plus petite, les techniques microscopiques se sont beaucoup développées.

1.2.C. L'intérêt des méthodes microscopiques

La microscopie électronique représente sans doute un des moyens d'imagerie les plus résolutifs (typiquement de l'ordre de 20 nm), mais demande une préparation dénaturante conséquente des échantillons observés (déshydratation, inclusion dans une résine dure, coupe puis coloration). L'observation se fait en condition de vide extrême sur du matériel fixé, excluant la possibilité d'une visualisation sur le vivant.

Parmi les techniques microscopiques, la microscopie photonique exploitant la fluorescence présente un fort potentiel de par sa sensibilité de détection. De plus cette technique, couplée à l'immunologie comme moyen de détection de molécules d'intérêt, présente une grande spécificité lors de l'utilisation de marqueurs de structures cellulaires (récepteurs membranaires, par exemple). Il existe différents types de fluorophores organiques ou non, d'origine naturelle (GFP) ou synthétique.

Associée au phénomène de fluorescence, la microscopie confocale est considérée comme une technique de référence dans le domaine de l'imagerie tissulaire (résolution d'environ $0,5 \mu\text{m}$), mais peut présenter des inconvénients de phototoxicité lorsqu'il s'agit d'observer des échantillons vivants. Ces phénomènes limitants sont dus aux effets du balayage laser et à la génération de radicaux libres sous l'effet du rayonnement. Une autre limite rencontrée avec cette technique concerne la pénétration pour l'observation en profondeur des tissus épais et diffusants. En effet, l'une des principales difficultés à imager des constructions tissulaires fonctionnalisées (matrices, biomatériaux, vaisseaux...) provient de leur épaisseur, densité et opacité. Or, les rayons UV et visibles sont fortement absorbés par les composants tissulaires (Figure 3).

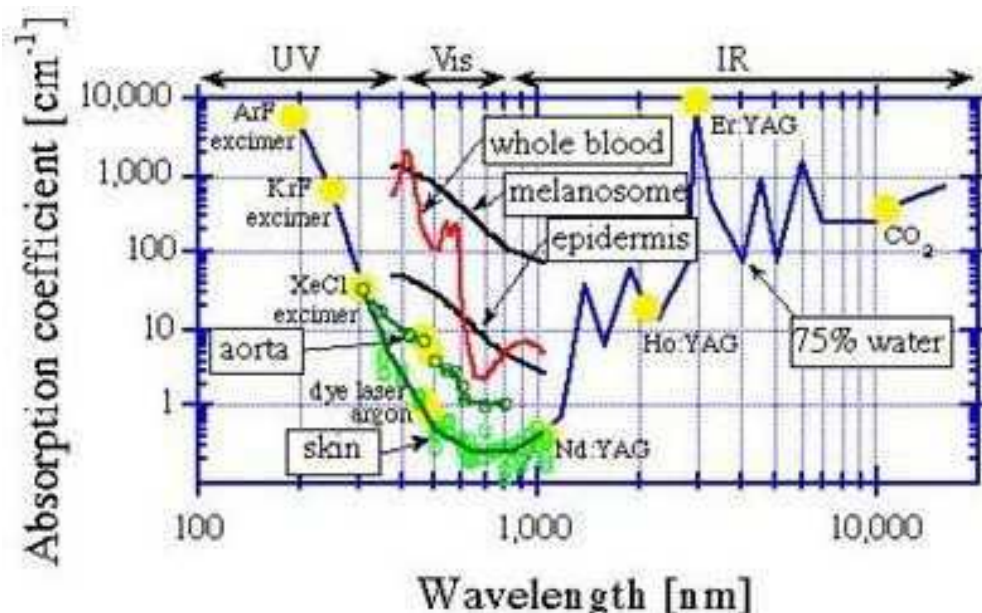


Figure 3 : Spectres d'absorption de différents constituants des tissus biologiques (http://www-lsp.ujf-grenoble.fr/recherche/a2t2/a2t2a2/Pascale_these/Chap1.pdf).

L'utilisation d'un rayonnement présentant une longueur d'onde rouge ou proche infrarouge (entre 600 et 1 100 nm) permet de diminuer ce phénomène d'absorption, et rend ainsi possible une pénétration plus profonde du rayon d'excitation [71,72]. De plus, une excitation à ces longueurs d'onde permet de réduire les effets de phototoxicité et reste compatible avec la viabilité cellulaire.

La microscopie de fluorescence, en particulier associée à un mode d'excitation multiphoton mettant en œuvre une grande longueur d'onde d'excitation, représente un outil d'imagerie tissulaire compatible avec notre cahier des charges. La technique présente une résolution adaptée à l'échelle cellulaire et un caractère non invasif. Elle devrait permettre d'obtenir des informations structurales sur les matrices extracellulaires de cartilage ou d'échantillons vasculaires. Le paragraphe suivant précise les différentes modalités de détection de signal utilisées afin d'obtenir ces informations.

I.3. La fluorescence

I.3.A. Principe

Une molécule peut être caractérisée par différents niveaux d'énergie qui peuvent être représentés par un diagramme de Jablonski-Perrin (1935). On y distingue l'état de repos de la molécule (ou état fondamental), puis différents états excités. En effet, les états énergétiques sont quantifiables et l'ensemble des différentes transitions d'énergie possibles entre le niveau fondamental et les niveaux excités détermine le spectre d'excitation de la molécule ($E = h\nu$).

Dans son état excité (on se limite ici à la transition $S_0 \rightarrow S_1$) la molécule va subir des changements conformationnels qui vont être très dépendants de son environnement biophysique. Il y a très rapidement (10^{-15} s) relaxation vers le niveau S_{10} avec pertes d'énergie (principalement par diffusion thermique) (10^{-12} à 10^{-10} s). Puis depuis S_{10} les électrons vont retomber rapidement (10^{-10} à 10^{-6} s) vers un des niveaux de base S_0 en émettant des photons. C'est la fluorescence.

Là aussi, les différentes énergies de transition vont déterminer la longueur d'onde des photons et donc le spectre d'émission de la molécule. Du fait des pertes d'énergie lors des relaxations internes dans l'état excité, les énergies d'émission sont toujours plus faibles que

celles d'excitation et donc, comme $E = hc / \lambda$, il en résulte que la longueur d'onde d'émission sera toujours plus longue que celle d'excitation. Ce décalage vers le rouge entre le pic du spectre d'excitation et le pic du spectre d'émission est appelé déplacement de Stokes ou Stokes shift.

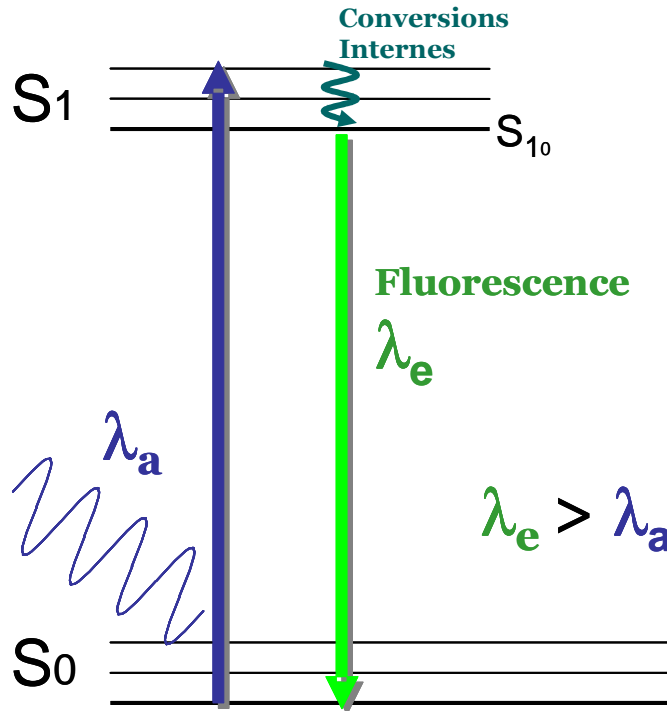


Figure 4 : Principe du phénomène de fluorescence suivant une excitation monophotonique.

Dans le cas d'une excitation monophotonique, l'énergie permettant de faire passer une molécule dans son état S_1 est apportée par un photon unique. Ce photon doit donc présenter une longueur d'onde compatible avec le spectre d'excitation de la molécule.

I.3.B. Excitation monophoton ou multiphoton

De nombreuses molécules constituant les tissus biologiques présentent des caractéristiques d'absorption qui rendent difficiles l'imagerie dans le domaine du visible. En revanche, les tissus biologiques absorbent beaucoup moins les rayons d'excitation qui se situent à une longueur d'onde rouge - proche infrarouge. Ainsi, l'utilisation et l'optimisation d'une technique d'excitation biphotonique permet d'améliorer la pénétration au sein d'échantillons [73]. Par ailleurs, le faible volume d'excitation en mode multiphoton, de l'ordre du femtolitre [74], réduit les effets phototoxiques et cytotoxiques, puisque ceux-ci sont

limités au plan focal. La microscopie multiphoton permet ainsi l'imagerie d'échantillons dans les conditions les plus proches du vivant [75-83].

Le phénomène d'absorption multiphoton a été mis en évidence en 1931 par Marie Göppert-Mayer [84] et les applications en imagerie biologique sont de plus en plus importantes depuis quelques années [85-88].

Dans le cas d'une excitation non linéaire (multiphoton), l'apport d'énergie lumineuse nécessaire à une molécule pour passer dans un état excité provient de deux photons absorbés quasi simultanément. Ces photons apportent chacun environ la moitié de l'énergie nécessaire, et présentent donc une longueur d'onde plus élevée (que dans le cas d'une excitation monophoton) puisque l'énergie d'un photon est inversement proportionnelle à sa longueur d'onde.

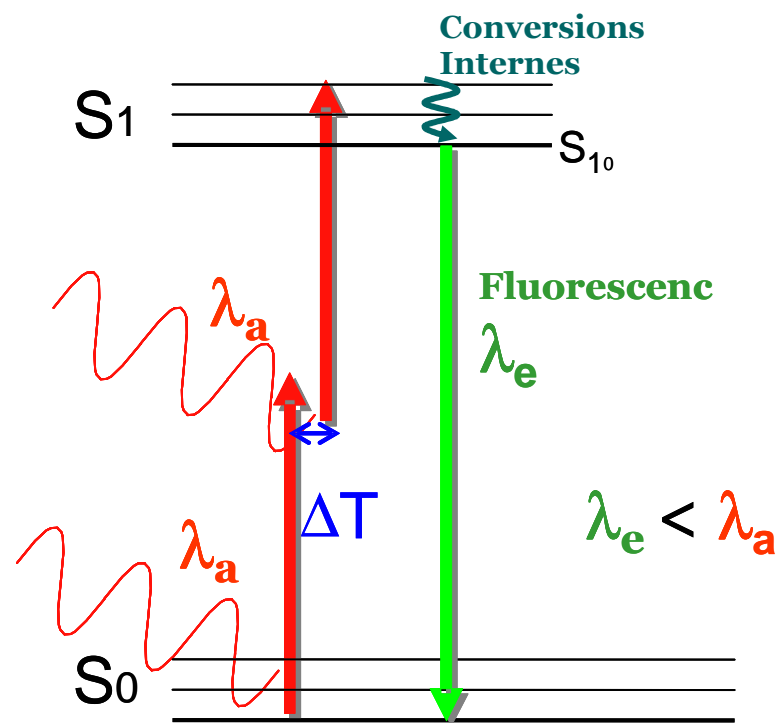


Figure 5 : Principe du phénomène de fluorescence suivant une excitation biphotonique.

Pour que le phénomène d'excitation multiphoton se produise, les photons doivent être confinés à la fois spatialement et temporellement. Lorsque l'énergie d'un faisceau laser est concentrée dans des pulses ultra brefs (~ 150 fs), puis est focalisée sur l'échantillon, on atteint

les conditions de confinement citées précédemment. En pratique, elles sont obtenues par l'utilisation de lasers femtosecondes générant des impulsions de l'ordre de 150 fs à très haute fréquence (100 MHz).

D'une manière générale, l'émission de fluorescence d'une sonde dépend de sa section efficace d'absorption [89] et de l'énergie apportée. En théorie, la probabilité d'absorption 2-photons est dépendante des paramètres des impulsions laser utilisées, de la largeur d'impulsion [90], ainsi que de la puissance moyenne et la fréquence de tir du faisceau d'excitation. Elle suit l'équation :

$$n_a \approx \frac{\delta_2 P_{ave}^2}{\tau_p f_p^2} \left(\frac{2\pi(NA)^2}{2hc\lambda} \right)^2$$

avec δ_2 la section efficace d'absorption de la molécule fluorescente (GM, 1 GM = 10^{-58} [m⁴.s.photons⁻¹]), P_{ave} la puissance moyenne du faisceau laser (W), NA l'ouverture numérique de l'objectif, τ_p la largeur du pulse laser (s), f_p la fréquence de tir des impulsions laser (Hz), h la constante de Planck ($6,626 \cdot 10^{-34}$ J.s.), c la célérité ($3 \cdot 10^8$ m.s⁻¹) et λ la longueur d'onde du faisceau d'excitation. La probabilité d'absorption varie de manière quadratique avec l'énergie impulsionnelle ($E = P_{ave}/f_p$).

1.3.C. Différents modes de résolution

Une fois amenée dans son état excité, une molécule va retrouver son état fondamental en restituant l'excédent d'énergie à l'environnement. Dans le cas de la fluorescence, cette restitution se traduit par l'émission d'un rayonnement lumineux. Le signal de fluorescence détecté peut être résolu spatialement, spectralement, temporellement ou par anisotropie. Chaque mode de résolution met en œuvre une technique spécifique de détection et apporte des informations complémentaires à propos de la concentration du fluorophore ou de son environnement biochimique.

En microscopie de fluorescence, la sélectivité biologique (chimique) provient entre autres du marquage avec des anticorps couplés à des molécules fluorescentes (fluorophores) naturelles ou synthétiques, excitables par absorption à un ou deux photons (multiphotonique). L'excitation doit être compatible avec le spectre d'absorption des molécules (monophoton) ou

avec une section efficace d'absorption suffisante (multiphoton). Des efforts ont été consentis afin de synthétiser des molécules présentant de larges sections efficaces d'absorption [91-93] afin de faciliter la mise en œuvre d'une excitation biphoton. Pour éviter les procédures de marquage et leur invasivité cellulaire, l'expression de protéines fluorescentes (variants GFP) [94,95], obtenue par modification du bagage génétique des cellules, est largement utilisée. Ainsi de nombreuses protéines similaires aux GFP (Green Fluorescent Protein) sont capables de générer un signal de fluorescence à différentes longueurs d'onde (CFP, YFP...) [96,97].

En mode de résolution spectrale, dans le cas de multi marquages fluorescents, les spectres d'émission se chevauchent souvent, ce qui rend très difficile l'exploitation des données (en FRET par exemple). Les industriels s'intéressent fortement à la synthèse de marqueurs présentant un spectre d'émission très étroit pour faciliter la mise en œuvre de marquages multiples. Les Quantum Dots, qui sont des nanocristaux semi-conducteurs dont la taille permet d'ajuster la longueur d'onde d'émission de fluorescence [98], présentent un spectre d'émission très étroit tout en conservant un spectre d'excitation très large [99-101]. En outre, ils sont très photostables par rapport à d'autres marqueurs comme l'Alexa par exemple [102]. Par ailleurs, ces QDots présentent un autre intérêt pour l'imagerie de contraste : ils ont une durée de vie de fluorescence plus longue (~10 ns) par rapport aux autres fluorophores utilisés classiquement pour les marquages cellulaires (~5 ns).

Le mode de résolution temporelle de la fluorescence (mesure des durées de vie de fluorescence) permet d'améliorer la distinction de l'émission de fluorescence de deux fluorophores dont les spectres se chevauchent et ainsi de compléter les informations obtenues en mode de résolution spectrale [103,104]. Le signal d'autofluorescence des tissus a ainsi pu être isolé d'autres fluorophores sur la base des temps de déclin des molécules fluorescentes intrinsèques [105]. De plus, il est indépendant de la concentration locale en molécules, et permet de refléter le microenvironnement de celles-ci (pH, température, viscosité) [106-108]. Le changement d'environnement d'un fluorophore peut faire suite à l'internalisation par une cellule et ainsi être quantifié par la mesure des durées de vie de fluorescence de ces molécules [109]. La localisation d'un même fluorophore au niveau de structures cellulaires différentes, en l'occurrence noyau ou cytoplasme, a également pu être mise en évidence par l'analyse de sa durée de vie de fluorescence [110]. Ainsi, cette technique a pu être mise à profit pour caractériser les changements du microenvironnement tissulaire provoqués par certaines pathologies, l'ischémie par exemple [111]. Les études cliniques s'appuyant sur cette méthode

tendent à se développer, dans le domaine cancérologique [112-117] ou encore pour l'étude par traçabilité de diffusion de médicaments [118].

L'association moléculaire de fluorophores de petite taille (nanocristaux QDots) ou de grande taille (amplification - immunomarquage) à des structures cellulaires peut perturber les métabolismes cellulaires, par exemple un anticorps dirigé contre un récepteur membranaire de surface diminue la mobilité de ce récepteur (coefficient de diffusion moindre) et peut changer la cinétique réactionnelle au niveau de la cascade des voies de signalisation (internalisation, vésiculation...). De plus, les stratégies de détection des fluorophores nécessitent le suivi spatio-temporel du signal de fluorescence et s'appuient sur des méthodes traumatisantes pour les cellules, malgré les diverses voies développées (molécules fusogènes, perméabilisation chimique membranaire, transfections cellulaires). Les possibles effets de phototoxicité (radicaux oxygénés...) et le photoblanchiment (quantification limitée) limitent les développements dans le domaine du vivant. C'est la raison pour laquelle les techniques sans marquage fluorescent se développent en imagerie tissulaire avec la mise au point de nouvelles approches non linéaires comme la seconde, la troisième harmonique (SHG et THG) [119-121] et l'imagerie CARS qui utilisent une excitation multiphotonique. Les applications actuelles tendent de plus en plus à combiner les différents modes de détection afin d'obtenir des résultats complémentaires au niveau de structures cellulaires ou tissulaires dans les conditions les moins invasives [122,123].

1.4. La mesure du signal SHG (Second Harmonic Generation) émanant des fibres de collagène

Les matrices extracellulaires des tissus et en particulier du cartilage et des vaisseaux contiennent une part importante de collagène. Ce collagène provient d'une synthèse de cellules spécialisées (chondrocytes, cellules musculaires lisses). La détection du signal SHG, faisant suite à une excitation biphoton et provenant spécifiquement de ces molécules, permet d'obtenir des informations structurelles de manière non invasive, sans marquage exogène.

1.4.A. Principe

La génération de Seconde Harmonique intervient suite à une irradiation biphoton. Ce rayonnement présente exactement la moitié de la longueur d'onde d'excitation et est propagé principalement vers l'avant (cf. Figure 19 du § II.5).

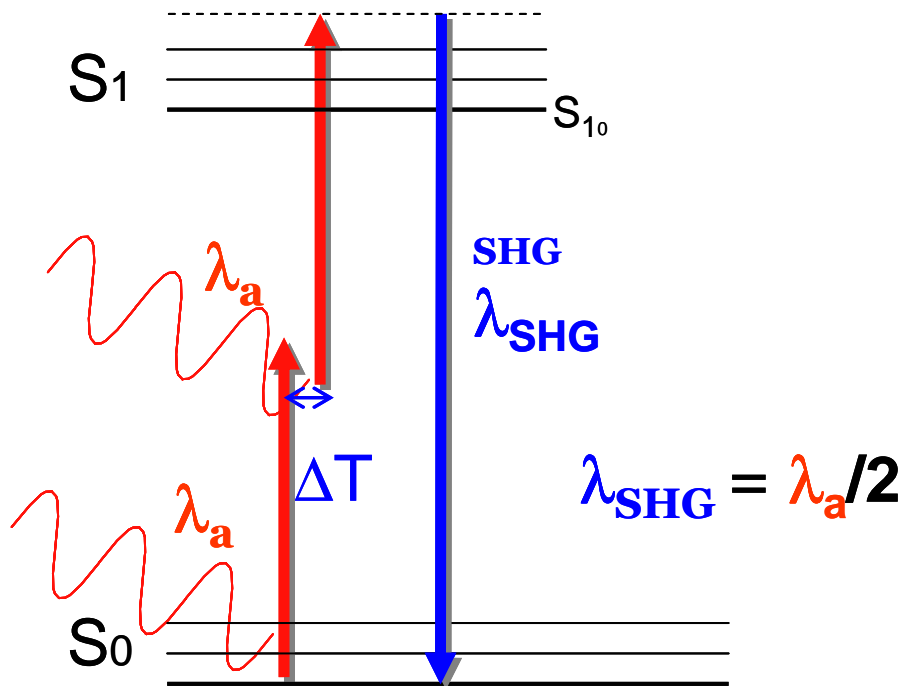


Figure 6 : Principe de génération d'un signal de seconde harmonique suivant une excitation biphotonique.

Une certaine proportion du signal est cependant émise vers l'arrière, et a pu être mesurée dans des tissus épais. Ce signal est composé en réalité du signal SHG émis vers l'arrière, mais également d'une partie du signal émis vers l'avant qui est rétrodiffusé en fonction des propriétés de diffusion du tissu observé [124,125]. Selon l'architecture des tissus imagés, les signaux SHG émis vers l'avant ou vers l'arrière peuvent apporter des informations structurales complémentaires [126].

Plusieurs hypothèses ont été émises par rapport à la direction des deux lobes de diffusion, mais les diagrammes de rayonnement restent souvent très complexes. La quantité de signal émise dépend fortement des molécules imagées, en particulier de leur susceptibilité non linéaire et de leur orientation [127].

Dans les tissus biologiques, le principal composant générateur de Seconde Harmonique est le collagène, surtout lorsque celui est de type fibrillaire (Collagène I, II, V, XI). L'imagerie SHG couplée à une excitation multiphoton apparaît comme une technique appropriée pour les tissus biologiques, puisqu'elle permet une observation en profondeur des réseaux collagéniques de tissus sans marqueur exogène [128,129]. Sa forte résolution en fait un outil adapté à l'échelle cellulaire [130].

1.4.B. Le collagène dans les tissus et applications potentielles

L'enroulement en triple hélice des molécules de collagène leur confère une spécificité structurale non centrosymétrique nécessaire à la génération d'un signal SHG, et un coefficient de susceptibilité non linéaire élevé [131-135].

Les molécules de tropocollagène s'assemblent pour former des fibrilles de collagène. De même, celles-ci se regroupent en fibres, puis en faisceaux de fibres. Les images acquises par collection du signal SHG représentent ces faisceaux de fibres de collagène. Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'à partir d'une longueur d'onde d'excitation de 800 nm, les fibres de collagène n'émettent plus d'autofluorescence [136]. Les signaux de fluorescence mesurés au niveau des MECs proviennent donc d'autres composants (protéoglycannes, élastine...).

Il a été démontré que c'est l'aspect macroscopique de l'arrangement des fibres de collagène qui confère prioritairement aux tissus la propriété de générer un signal SHG détectable. Ainsi, l'adjonction de glycérol sur un échantillon de peau provoque la dissociation des fibres de collagène et s'accompagne d'une diminution de signal SHG. Ce signal est retrouvé par réhydratation de l'échantillon avec du PBS [137]. Cette propriété de génération de signal SHG est ensuite accrue par les caractéristiques chirales mesurables à l'échelle moléculaire. Pour résumer, le signal de SHG provient essentiellement du collagène dit de type 'fibrillaire'. Lorsque ces fibres sont alignés, le tissu apparaît plus dense, et le signal SHG émis est proportionnel au carré de la densité de molécules émettrices. D'autre part, il a été montré qu'un signal SHG a pu être mesuré pour des molécules de Collagène I et de Collagène IV, mais que l'arrangement macroscopique des molécules de collagène de type IV ne permet pas la mesure d'un signal SHG [138]. L'arrangement peu dense et non centrosymétrique de ces molécules entraîne des interférences destructrices du signal SHG au niveau du tissu.

Le collagène fait partie des constituants majeurs des tissus biologiques [128,139,140]. On le retrouve en particulier au niveau du cartilage, des vaisseaux [58,60,141], de tumeurs, de muscles [142], de tendons [143], de ligaments, de la peau [144,145]. Le Tableau 1 résume la présence dans les tissus des différents types de collagène.

	type	forme polymérisée	représentation
formant des fibrilles	I	fibrilles	os, peau, tendon, ligament, cornée, organes internes (ca. 90%), cartilage fibreux (disque intervertébral)
	II	fibrilles	cartilage (élast. et hyalin), corps vitré de l'oeil
	III	fibrilles	hypoderme, vaisseaux, cheveux
	V	fibrilles (avec type I)	voir type I
	XI	fibrilles (avec type II)	voir type II
<u>associé aux fibrilles</u>	IX	connexion latérale aux fibrilles de type II	cartilage
	XII	connexion latérale aux fibrilles de type II	quelques autres tissus
formant un réseau	IV	réseau	lamina basale
	VII	<u>fibrilles d'ancrage de la membrane basale</u>	sous l'épiderme pluristratifié

Tableau 1 : Les différents types de collagène dans les tissus biologiques (<http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/francais/bindegewebe/sfa/fasern/f-kollagen.php>).

De ce fait les applications envisageables couvrent un vaste domaine. Les études mettant en œuvre l'imagerie MP et SHG ne cessent de se développer aussi bien dans le domaine de l'ophtalmologie [146-151], que la dermatologie [152,153], la dentisterie [154], le cardio-vasculaire [155-157], le domaine articulaire [158,159] ou encore la cancérologie [65,67,160]. La technique a notamment pu permettre la caractérisation d'états de fibrose [161-163].

Le signal SHG émanant d'une molécule est émis 'vers l'avant' (cf. Figure 19 du § II.5), dans le sens du rayon incident d'excitation et peut être collecté au moyen d'un objectif à grande ouverture numérique [164] dans le sens de propagation du rayon incident. La quantité de signal émis et son angle de propagation dépendent de la molécule ciblée, de la focalisation du signal d'excitation et de l'ouverture numérique de l'objectif de collection [165].

L'optimisation du signal est donc en partie possible en variant les paramètres instrumentaux mais aussi biochimiques d'observation [166].

1.4.C. Les biomatériaux collagéniques

L'un des intérêts de l'ingénierie tissulaire est d'aboutir à l'élaboration d'un matériau (matrice + cellules) implantable chez l'homme dans le but de suppléer ou de remplacer un organe déficient. Les constructions collagéniques peuvent servir de support de culture cellulaire et constituer la base de ce matériau. Un des enjeux majeurs consiste à obtenir une organisation tridimensionnelle proche de celle des organes à remplacer. L'analyse par SHG pourrait permettre la caractérisation structurale du matériau et mettre en évidence un éventuel remodelage suite à la mise en culture des cellules et leur interaction avec la matrice.

La microscopie multiphoton donne accès à des profondeurs d'environ 1 mm pour imager et caractériser des gels de collagène obtenus pour différentes conditions de synthèse (température notamment). En effet, la température influe sur le diamètre des fibres de collagène obtenues ainsi que sur la microstructure du gel. Par ailleurs, les mesures optiques de signal SHG ont pu être corrélées avec les propriétés des matériaux ainsi constitués [167,168].

Ainsi, la technique SHG pourrait être utilisée à visée diagnostique pour des maladies entraînant une perturbation ou dégradation du réseau collagénique (arthrose, états précancéreux, vieillissement artériel), mais également pour la validation fonctionnelle de biotissus synthétisés (synthèse de collagène) (cf. le cadre de ce travail).

1.5. Objectifs

Les objectifs de cette étude étaient de montrer la potentialité de divers outils d'imagerie microscopique associés à une excitation MP pour l'imagerie tissulaire. En particulier, nous avons cherché à développer une méthode d'investigation non invasive, permettant une imagerie en profondeur et présentant une résolution suffisante pour imager les constituants des matrices extracellulaires du cartilage ou au niveau des parois vasculaires.

La caractérisation de l'absorption MP suite à l'implémentation de différents systèmes de modulation de la puissance d'excitation a constitué la première partie du projet.

Dans un second temps, la détection du signal SHG en fonction de diverses configurations instrumentales réalisées (objectifs d'excitation et de collection de signal) a été étudiée.

Nous avons ensuite montré les potentialités de l'excitation multiphoton couplée à la SHG pour l'imagerie de divers échantillons biologiques riches en collagène. L'association des signaux SHG et de fluorescence recueillis a permis d'imager des structures différentes, le collagène émettant spécifiquement un signal SHG tandis que d'autres molécules (élastine, protéoglycannes...) se sont révélées fortement autofluorescentes.

L'étude du cartilage a été approfondie en caractérisant les modifications de la matrice extracellulaire, contenant essentiellement du collagène de type II, en fonction de contraintes chimiques (digestion enzymatique) ou mécaniques (compression). En associant la détection du signal SHG à la microscopie confocale de fluorescence, la présence de collagène VI dans la matrice péricellulaire a pu être mise en évidence au moyen de l'imagerie par SHG et simultanément par un marquage fluorescent (Alexa488). Cette approche présente un intérêt pour la discrimination du type de collagène selon sa localisation.

Concernant le domaine vasculaire, nous avons observé différents types d'artères (musculaire ou élastique) pour comparer les différentes structures selon différents modes de conservation (cryopréservation et fixation) sur les réseaux de collagène de l'adventice des vaisseaux. Enfin, nous avons observé le remodelage du réseau matriciel d'artères ombilicales ayant subi un traitement de surface puis implantées chez le lapin.

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel biologique et chimique

II.1.A. Marquage de structures cellulaires au moyen de sondes fluorescentes

II.1.A.1. Marquage de noyaux cellulaires

Pour le marquage des noyaux cellulaires des échantillons tissulaires (cartilage, vaisseaux), nous avons utilisé des molécules de Hoechst (Sigma B-2261 [1 mg/mL], dilution 2/1000 dans du PBS).

II.1.A.2. Marquage du cytosquelette

Les Quantum Dots (QDots® Streptavidin Conjugates, Quantum Dot Corporation, Hayward) sont constitués d'un cristal semi-conducteur (CdSe) enrobé d'une couche constituée d'un second semi-conducteur (ZnS). Un enduit en polymère permet la conjugaison avec des molécules biologiques tout en maintenant les propriétés optiques des cristaux (spectre de fluorescence intense et étroit). Pour les molécules dont nous disposons, cette ceinture en polymère a été couplée directement à des molécules de Streptavidine.

Nous avons utilisé ces QDots en tant que marqueur biologique en nous basant sur la forte affinité existant entre Biotine et Streptavidine (marquage primaire de l'actine par de la phalloïdine biotinylée).

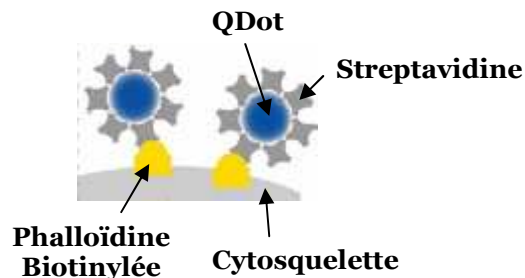


Figure 7 : Principe du marquage du cytosquelette au moyen de Phalloïdine biotinylée présentant une forte affinité avec le complexe QDot-Streptavidine.

II.1.A.3. Marquage du collagène VI de la matrice péricellulaire des chondrocytes du cartilage articulaire

Le marquage du collagène VI contenu dans la matrice péricellulaire des chondrocytes (explants de cartilage prélevés selon la méthode décrite au § II.1.B) a nécessité plusieurs étapes. Une digestion préalable de la matrice par la Hyaluronidase (Sigma H3884 2 mg/mL – 30 minutes) puis la Chondroïtinase (ABC Sigma C 2905 – 2 mg/mL – 30 minutes), à température ambiante a permis de faciliter la diffusion des anticorps.

Un anticorps primaire (Type VI Rabbit polyclonal Antibody, Calbiochem® 234191, 45 minutes à 37°C) a permis de localiser le collagène de type VI au niveau des échantillons. Nous avons imagé le signal de fluorescence provenant de l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488.

II.1.A.4. Digestion du collagène de la matrice extracellulaire au moyen de la Collagénase

Afin de digérer la matrice de collagène d'explants de cartilage, nous avons utilisé la Collagénase B (Roche 1088815, 45mg / 30 mL DMEM sans rouge de phénol). Les échantillons ont été recouverts de Collagénase, puis placés dans un incubateur à 37°C pendant 1, 2 ou 3 heures.

La dégradation du réseau de Collagène de la matrice extracellulaire des artères a nécessité l'incubation des échantillons avec de la Collagénase de type I (vWR 234153-100, conditionnement 100 ng). La dégradation a été suivie en imageant en continu les échantillons, à température ambiante.

II.1.B. Cartilage

Des explants de cartilage articulaire ont été prélevés dans des zones intactes de condyles fémoraux de patients ayant subi une arthroplastie (Dr. D. Mainard ; Département de Chirurgie Orthopédique, CHU Nancy France et en collaboration avec l'équipe du Professeur P. Netter).

Les études sur le cartilage développées par la suite ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du laboratoire travaillant sur cette thématique. En particulier, les prélèvements et les expériences de compression ont été réalisés par le Dr. N. de Isla.

Le cartilage a été séparé de l'os sous chondral en utilisant un scalpel, puis des explants cylindriques ont été prélevés puis immergés dans du milieu de culture (DMEM-F12) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 1% de solution antibiotique : antimycotique et 2 mM de Glutamine à 37°C, 5% de CO₂. Pour chaque échantillon, un témoin correspondant a été prélevé sur une partie adjacente. Toutes les expériences de compression ont été effectuées après avoir permis aux explants d'atteindre un équilibre en culture pendant 72 h.

Un système de compression FX-4000CTM Flexercell® Compression PlusTM (Flexcell International, Hillsborough, NC) nous a permis d'appliquer une contrainte dynamique. Les échantillons ont été soumis à une compression sinusoïdale de 1 MPa à 1 Hz pendant différents temps variables de 1 à 7 h), de manière intermittente (½ h ON, ½ h OFF). Le système est maintenu dans un incubateur à 37°C, 5% de CO₂. Ce système a pu être validé lors de travaux précédents (thèse Dr. Yun Wang, 2007).

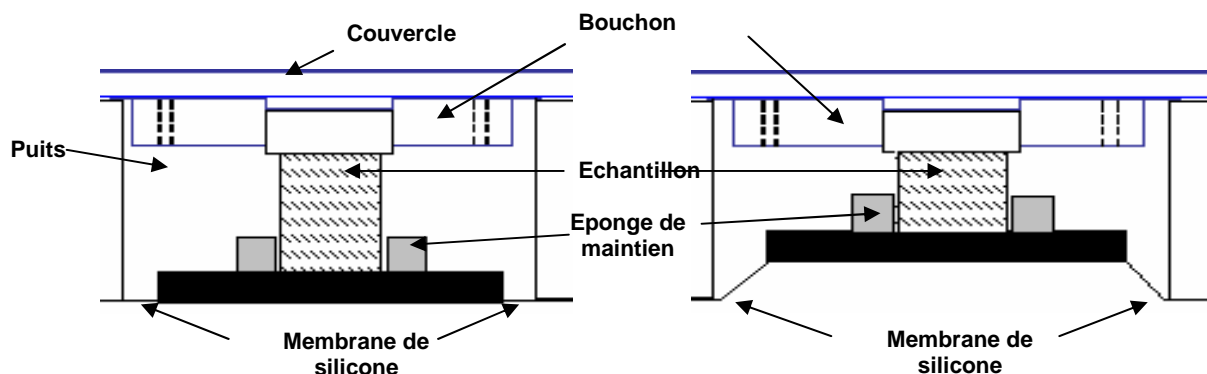


Figure 8 : Schéma de principe de l'appareil de compression.

Une tranche des cylindres a ensuite été coupée, déposée sur une lame puis observée en microscopie. Nous avons distingué trois zones différentes, qui seront nommées par la suite ‘Surface’, ‘Milieu’, ‘Profondeur’, comme il est montré sur la Figure 9.

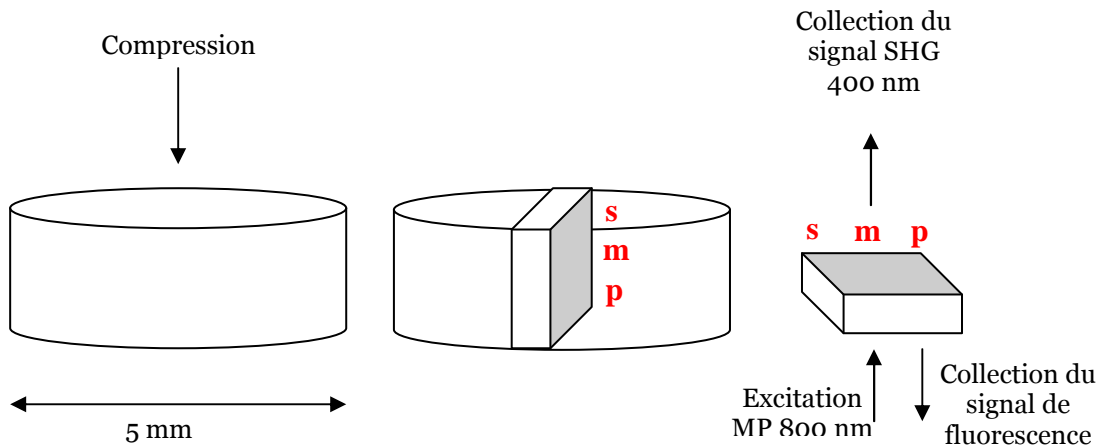


Figure 9 : Préparation des explants de cartilage. (a) Les échantillons cylindriques prélevés au niveau de condyles fémoraux humains (\varnothing 5 mm) sont soumis à une contrainte mécanique (1 MPa, 1 Hz, intermittente). (b) Une tranche (~1mm) est sectionnée puis placée sur la platine d'un microscope confocal. (c) Trois régions distinctes sont repérées (s : surface, m : milieu, p : profondeur).

La dégradation de la matrice extracellulaire a été suivie après digestion enzymatique par de la Collagénase B (Roche 1088815; 45 mg/30 mL DMEM sans rouge de phénol). Les échantillons ont été recouverts de Collagénase, puis incubé à 37°C pendant 1, 2 ou 3 heures.

Le Collagène VI de la matrice péricellulaire a été marqué au moyen d'un anticorps révélé par l'Alexa 488 (Anticorps polyclonal type VI, Lapin associé à l'Alexa 488). Pour ce marquage, une digestion préalable de la matrice extracellulaire a été nécessaire afin de permettre la diffusion des anticorps. Nous avons utilisé successivement deux enzymes : Hyaluronidase (Sigma H3884 2 mg/mL - 30 minutes) et Chondroïtinase (ABC Sigma C2905 - 2 mg/mL - 30 minutes).

II.1.C. Echantillons d'origine vasculaire

Les études menées dans le domaine vasculaire ont été menées en collaboration avec l'équipe travaillant dans ce domaine au sein du laboratoire. En particulier, les prélèvements d'échantillons ont été effectués par le Dr. H. Kerdjoudj et N. Berthelemy faisant partie de l'équipe du Pr. P. Menu.

Différents types de vaisseaux ont été prélevés soit chez le lapin (aorte, carotide, artère fémorale), soit chez l'homme (artère ombilicale humaine). La conservation des échantillons s'est faite dans du PAF 5% ou par cryoconservation (-180°C). La congélation est réalisée après une incubation pendant 1 min dans l'isopentane (Sigma, France). Les cryotubes sont conservés une nuit à -80°C, puis plongés dans de l'azote liquide à -180°C (Air Liquide, France) pendant au moins six mois.

Nous avons suivi la dégradation du réseau de Collagène après incubation des échantillons (artère fémorale et carotide de lapin) avec de la Collagénase de type I (vWR 234153-100, conditionnement 100 ng).

Nous avons observé ces échantillons selon deux directions, comme indiqué sur la Figure 10. Nous avons observé successivement des sections de vaisseaux permettant sur un même plan d'observer la totalité de la paroi artérielle, puis des coupes longitudinales qui nous ont permis d'observer en détail les réseaux de collagène de l'adventice.

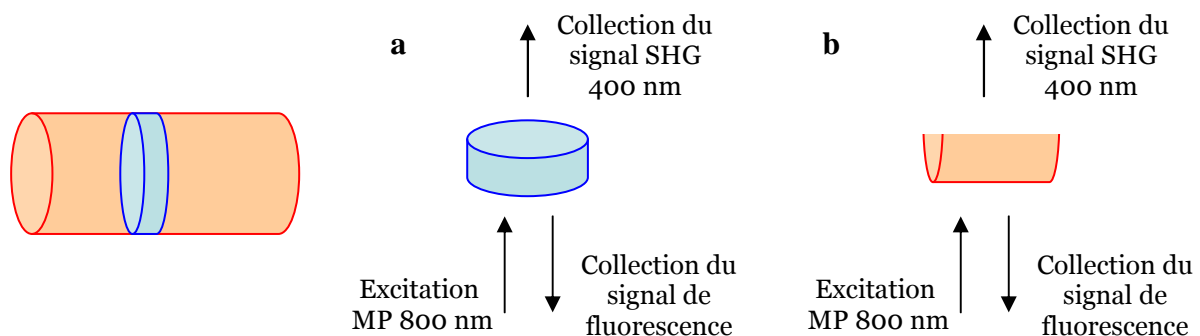


Figure 10 : Modes d'observation des vaisseaux. (a) Une section transversale permet l'observation des différentes couches concentriques composant la paroi artérielle. (b) Une coupe longitudinale permet l'observation des réseaux de collagène de l'adventice.

II.1.D. Echantillons d'origine tumorale humaine

Des tumeurs ont été obtenues après injection sous-cutanée de cellules murines de carcinomes mammaires EMT6 au niveau des cuisses de souris BALB/c femelles (5×10^5 cellules). Les tumeurs ont été prélevées lorsque leur taille était approximativement de 5 mm (c'est-à-dire après 10 jours d'implantation).

Un photosensibilisateur de nouvelle génération (Foslip®, Biolitec AG, Jena, Germany), dérivé de la *m_THPC*, présentant un pic d'émission de fluorescence à 650 nm (après excitation MP à 800 nm) et utilisable dans le cadre de la PDT a été injecté de manière intraveineuse ou intra tumorale (25 μ L de solution de Foslip®, [1,5 mg/mL]).

De plus, cinq minutes avant le sacrifice, des microsphères de polystyrène conjuguées à un fluorophore orange (\varnothing 0,22 μ m, F-8809, $\lambda_{\text{excitation}} = 800\text{nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 560\text{ nm}$, Molecular Probes, France) ont été injectées de manière intraveineuse (veine de la queue) et ont permis de visualiser la vascularisation tumorale.

Toute l'étude concernant les tumeurs a été réalisée en collaboration avec le CAV (Centre Alexis Vautrin, 54505 Vandoeuvre lès Nancy - L. Bolotine, M.A. D'Hallewin, Y. Viry-Babel) et la Société Biolitec, dans le cadre de l'observation des cinétiques de diffusion de photosensibilisateur au sein des masses tumorales. Toute la partie biologique, de l'injection de cellules au prélèvement, a été assurée par le personnel du CAV.

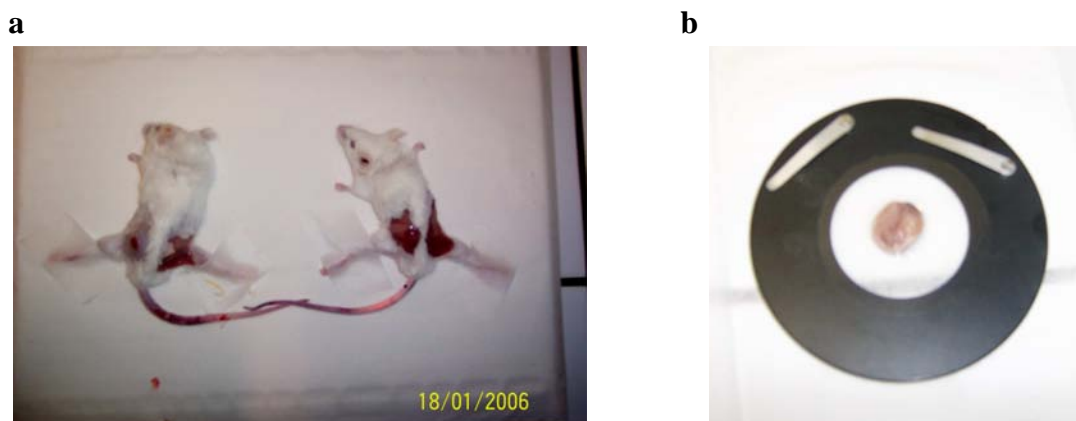


Figure 11 : Photos représentant : (a) deux souris Nude ayant subi une injection de cellules cancéreuses. Une tumeur s'est développée au niveau de chacune des cuisses des souris – 10 jours après l'implantation, (b) une tumeur placée sur une lamelle en vue d'une observation microscopique.

II.2. Excitation Multiphoton

La chaîne instrumentale, permettant d'obtenir un faisceau d'excitation de longueur d'onde rouge – proche IR (690 – 1100 nm), est composée d'un générateur d'impulsions femtoseconde Ti:Sa, et d'un système permettant de moduler la puissance du faisceau obtenu. Deux possibilités de modulation de signal ont été testées :

- au moyen d'un modulateur électro optique (EOM),
- au moyen d'un Cavity Dumper.

II.2.A. Microscopie Multiphoton

Dans cette étude, les impulsions ultra brèves (~150 fs) sont générées au moyen d'un oscillateur femtoseconde (Mira 900F accordable de 600 à 1100nm, Coherent), pompé par un laser à solide (Verdi 8 W à 532 nm, Coherent). La puissance moyenne du faisceau d'excitation de longueur d'onde $\lambda = 800\text{nm}$ (typiquement 1 W) a été mesurée au moyen d'un puissance-mètre (Lasermate, Coherent). Le faisceau en sortie de la cavité laser est polarisé horizontalement.

II.2.A.1. Modulation de la puissance d'excitation multiphoton avec un EOM

Le principe d'un modulateur électro optique repose sur la modification du chemin optique du rayon incident : une tension appliquée au niveau d'un cristal électrique permet de faire varier son indice de réfraction (de manière linéaire avec la tension appliquée – effet Pockels). La biréfringence du cristal est alors modifiée, entraînant un déphasage entre les ondes ordinaires et extraordinaires se propageant dans le cristal. Ce déphasage induit une modification de la polarisation en sortie du modulateur. Le modulateur d'intensité LM 0202P (Linos) dispose d'un polarisateur intégré qui joue le rôle d'analyseur et permet de transformer cette variation de polarisation en variation d'intensité.

L'intensité du faisceau laser en sortie de la cavité laser peut être modulée soit en faisant varier l'angle entre le polarisateur et l'analyseur, soit en réglant les paramètres de gain

et d'offset du champ électrique appliqué au modulateur. Pour nos expériences, nous avons gardé un angle constant entre les cristaux et modulé les paramètres du champ électrique. Un EOM (Electro Optical Modulator LM 0202P 5 W – n°21181, section KD*P, 3x3 mm², 5 W, 660-1050 nm, transmission 90,1%, ratio 1/254, Linos) a permis de moduler la puissance moyenne du faisceau laser de 30 à 193 mW et ainsi de générer des impulsions d'énergie comprise entre 188 pJ et 2,5 nJ. La fréquence de tir des impulsions reste constante (76 MHz).

II.2.A.2. Modulation de la puissance d'excitation multiphoton avec un Cavity Dumper

Le Cavity Dumper (Pulse Switch, APE, cristal silice, 710-990 nm pour Mira 8 W) permet une concentration temporelle de l'énergie, par diminution de la fréquence de tir des impulsions [169].

Son fonctionnement est basé sur un effet acousto-optique. Un signal électrique sinusoïdal est appliqué à un transducteur piézo-électrique (lié à un cristal = milieu acousto-optique). Celui-ci crée au sein du milieu acousto-optique une onde acoustique de même fréquence que celle du signal électrique issu du circuit pilote. L'onde acoustique, par les surpressions qu'elle crée forme un réseau sinusoïdal d'indices qui diffracte le faisceau laser. La fraction du faisceau diffracté est d'autant plus importante que la puissance du signal électrique est élevée. Autrement dit, la variation de la puissance du signal électrique appliqué engendrera une variation de l'intensité du faisceau diffracté.

Pour rendre la modulation acousto-optique possible il faut que le faisceau incident frappe le cristal acousto-optique selon l'angle de Bragg. Cet angle mesuré depuis la normale à la surface d'entrée du cristal vaut quelques minutes d'arc. A la sortie du cristal, on observera deux faisceaux : le faisceau d'ordre 0 colinéaire au faisceau incident et le faisceau d'ordre 1 (faisceau diffracté). L'expression suivante montre la relation existant entre l'angle de Bragg et les caractéristiques du faisceau optique, de l'onde acoustique et du milieu d'interaction.

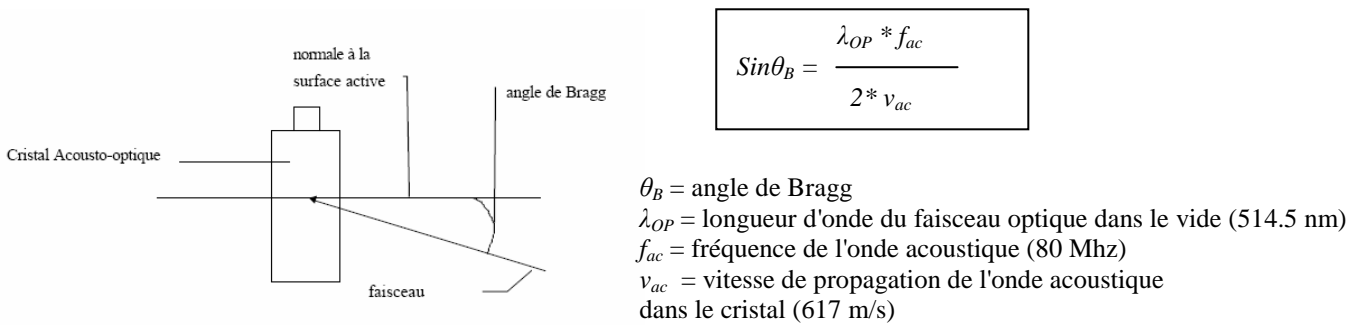


Figure 12 : Le faisceau laser venant frapper le cristal acousto-optique du Cavity Dumper est défléchi. L'angle de Bragg (de déflexion) dépend des propriétés du cristal acousto-optique et de celles du faisceau optique.

L'utilisation de pulses RF courts permet de sélectionner certaines impulsions et de les défléchir en tant que faisceau diffracté du premier ordre. Les impulsions défléchies peuvent alors être distinguées du train d'impulsions initial et peuvent être utilisées expérimentalement (dirigées vers la sortie de la cavité). L'adjonction de la Cavité dumper à la cavité principale du Mira entraîne un allongement du trajet du faisceau optique. La fréquence de tir passe alors de 76 MHz (oscillateur Mira seul) à 54,3 MHz. Le facteur de division de la fréquence initiale du laser (54,3 MHz) est variable de 1/6 à 1/260.000. Autrement dit la plage de fréquence de tir que l'on peut atteindre s'étend de 200 Hz à 9 MHz.

Dans cette étude, le Cavity Dumper a été utilisé pour $30 < DR < 130$, c'est-à-dire avec une fréquence de tir comprise entre 1,8 MHz et 453 kHz. A partir de la puissance moyenne P_{moy} mesurée ($30 \text{ mW} < P_{moy} < 70 \text{ mW}$), la puissance crête et l'énergie d'une impulsion ont été calculées selon la formule : $P_{crête} = P_{moy} * T / \tau_p = \text{Energie} / \tau_p$, avec T la période du signal impulsionnel et τ_p la largeur des impulsions (supposée constante à 150 fs). Ainsi, en utilisant un facteur de division $DR = 30$, soit une fréquence de tir des impulsions de 1,8 MHz, l'énergie d'une impulsion est de 39 nJ pour une puissance moyenne de 70 mW. Pour un facteur $DR = 130$, donc une fréquence de 417 kHz, et une puissance moyenne de 30 mW, l'énergie impulsionnelle est de 72 nJ.

II.2.A.3. Méthode de caractérisation de la probabilité d'absorption

D'une manière générale, l'émission de fluorescence d'un fluorophore à une longueur d'onde donnée dépend de sa section efficace d'absorption [89] et de l'énergie apportée (puissance de l'excitation). Pour une longueur d'onde d'irradiation donnée, la quantité de fluorescence émise (à rendement quantique constant) reflète l'efficacité de l'excitation et donc l'efficacité d'absorption avec une certaine probabilité. Sous l'effet de l'irradiation, plus la fluorescence diminue par photoblanchiment, plus l'absorption est considérée comme efficace. La cinétique d'extinction de la fluorescence émise reflèterait directement l'efficacité de l'excitation [170,171] en lien avec l'absorption. Dans ce travail, pour caractériser l'efficacité de l'excitation multiphotonique, nous avons étudié le photoblanchiment du Hoechst qui nous a permis de marquer les noyaux cellulaires au sein d'une tumeur (cf. § II.1.A.1).

La détection du signal de fluorescence, diaphragme confocal complètement ouvert (Airy 49,46, soit 600 μm), se fait au moyen d'un microscope confocal à balayage laser (TCS SP2-AOBS, Leica Microsystems) équipé d'un objectif x20/0.7 à sec (et du logiciel LCS version 15.37). Des séries de 10 images sont réalisées en fonction du temps (mode 'xzt', zoom x 5,99). Chaque image au format 512*512, avec une taille de pixel (x,z) 0,244*0,244 μm est composée de deux acquisitions successives, avec un moyennage de ligne de 2. Un balayage de l'échantillon à 400 Hz implique un Δt de 6525 ms entre 2 images.

La projection des amplitudes du signal sur l'axe z pour chaque temps donne une fonction $I_{(z)}$ (Figure 13b). Pour chaque série d'images, une courbe $K_{(z)}$ reflète l'efficacité d'absorption du fluorophore, avec K le paramètre d'extinction de fluorescence calculé pour chaque z. Afin de comparer l'efficacité d'une impulsion, ces courbes (après division par le nombre d'impulsions pour une colonne de l'image) ont été normalisées (par impulsion) (Figure 13c).

Les fonctions de répartition des courbes $K_{(z)}$ sont calculées par la relation $F(p) = \int_0^p f(z)dz$, (Figure 13d), puis normalisées (palier à 100%) (Figure 13e). Ce protocole de traitement de données sera détaillé au paragraphe III.1.B.

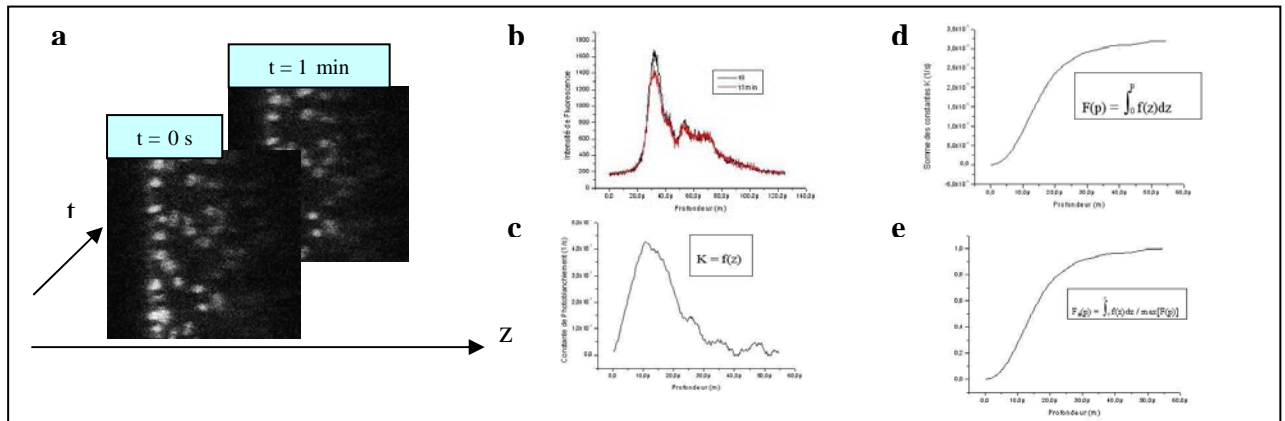


Figure 13 : Protocole de traitement d’images permettant la caractérisation de la probabilité d’absorption en profondeur suivant une excitation multiphoton. Etapes du traitement d’images allant de l’acquisition aux fonctions de répartition. (a) Détection en mode ‘xzt’ de la fluorescence du Hoechst (noyaux) au sein d’une tumeur. (b) Projections sur l’axe z des profils d’intensité pour chaque temps d’acquisition. (c) Calcul d’une constante d’extinction de fluorescence pour chaque valeur de z, $K=f(z)$. Normalisation des constantes par le nombre d’impulsions ayant contribué à l’extinction de la fluorescence. (d) Tracé de la fonction de répartition obtenue en (c), puis normalisation des courbes pour que le palier soit égal à 100%.

II.3. Microscopie confocale

Le microscope confocal à balayage laser (TCS SP2-AOBS, Leica Microsystems) permet un balayage de l’échantillon point par point au moyen d’un système de miroirs galvanométriques, vibrants en x et en y. Le déplacement en z, obtenu au moyen d’un quartz piézo-électrique permet de faire varier le plan de mise au point, c’est-à-dire le plan duquel émanent les photons de fluorescence collectés. L’enregistrement d’une série de coupes optiques plan par plan permet la reconstitution d’une image 3D.

Le système se compose d’une unité informatique, d’un contrôleur de microscope, de trois lasers embarqués et de la tête confocale. Un logiciel a été spécialement développé pour l’utilisation de ce système, ainsi que les applications dédiées au SP2 AOBS de la société Leica Microsystems.

Le système de détection comporte sept photomultiplicateurs de type R6357 (Hamamatsu), permettant une réponse pour des longueurs d’onde allant de 185 à 900 nm. Quatre canaux de détection de fluorescence réglables en position et en largeur au niveau de la bande passante du détecteur sont disponibles. En effet, devant chaque détecteur se trouve une fente ajustable via deux moteurs. Pour la représentation du signal détecté, la possibilité

d'utiliser diverses LUT (Look Up Table) permet l'association d'une couleur à une amplitude, donc un codage et facilite la détection des phénomènes de saturation.

On dispose de trois modes de détection différents :

- Mode lumière transmise (1 photomultiplicateur).
- Mode « descanned » (4 photomultiplicateurs) : la fluorescence traverse la tête confocale avant d'atteindre les PMs.
- Mode « non descanned » (2 photomultiplicateurs) : les PMs détectent directement la fluorescence.

Au niveau de l'acquisition, il existe différents modes selon les espaces sondés (xyz, xyt, xy λ ...). Le gain et l'offset des détecteurs ainsi que la vitesse de balayage (400 Hz par défaut) sont ajustables. Les images obtenues sont de format 512x512 par défaut, et des séries de coupes sont générées en se déplaçant suivant l'axe vertical z, λ ou t.

Pour l'acquisition des images en mode non descanné (NDD), nous avons utilisé un miroir dichroïque (515 nm) qui réfléchit les longueurs d'onde inférieures à 515 nm et transmet celles qui sont supérieures à cette limite. Afin de collecter le signal SHG réfléchi dans le sens inverse au rayon incident d'excitation, nous avons ajouté un filtre passe-bande 400 \pm 25nm. La mesure du signal de fluorescence de l'Alexa 488 en mode NDD a été effectuée après passage du signal par un filtre passe-bande 525 \pm 25 nm (Figure 14).

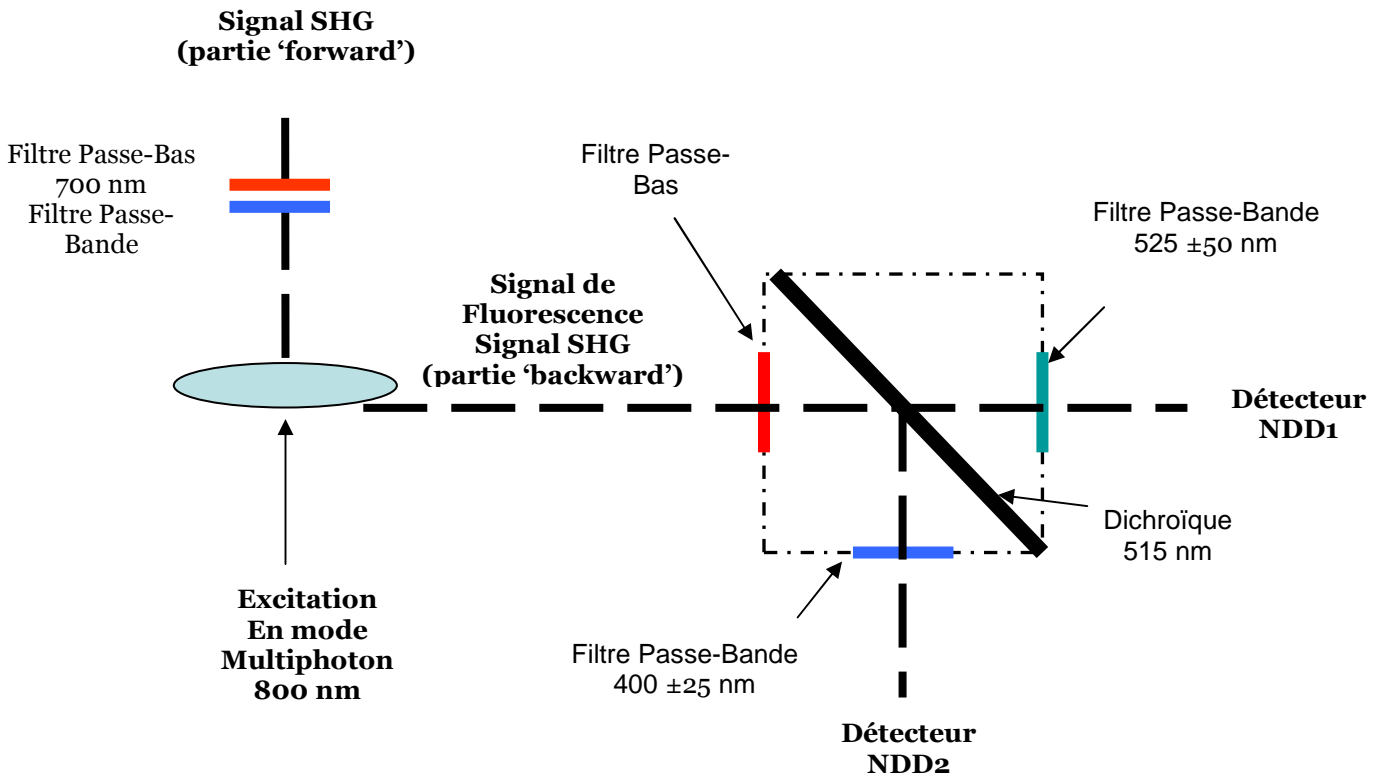


Figure 14 : Schéma de principe de la détection en mode NDD. Le signal de fluorescence traverse dans un premier temps un filtre passe-bas 700 nm qui permet de rejeter le signal d'excitation (800nm). Puis un dichroïque à 515 nm permet de réfléchir les rayonnements présentant une longueur d'onde < 515 nm et laisse traverser les rayonnements de longueur d'onde > 515 nm. L'ajout de filtres avant les détecteurs NDD permet de sélectionner les bandes spectrales correspondant aux signaux d'intérêt.

II.4. FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy)

La chaîne instrumentale utilisée dans ce travail pour la cartographie des durées de vie de fluorescence associe un oscillateur femtoseconde (Mira900-F, Coherent) pompé par un laser continu (Verdi 8 W, Coherent), un microscope confocal à balayage laser (TCS SP2 Leica) et une carte électronique de comptage de photon unique TCSPC (SPC-730 TCSPC Imaging module, Becker & Hickl, Berlin).

La technique de comptage de photon unique est basée sur l'idée que la distribution des probabilités de détection d'un seul photon à la suite d'une excitation reproduit la véritable distribution en fonction du temps de tous les photons émis.

La carte électronique présente 4 fonctions principales (Comparaison, Synchronisation, Conversion Temps-Amplitude, Conversion analogique-numérique). Ses données d'entrée sont les pulses électroniques correspondant à la détection des photons émis par l'échantillon (photomultiplicateur), ainsi que les pulses de synchronisation correspondant à la détection d'un train d'impulsions laser (photodiode ultrarapide). En sortie de la carte, on dispose d'une adresse binaire correspondant au temps Δt qu'a mis le premier photon à atteindre le PM.

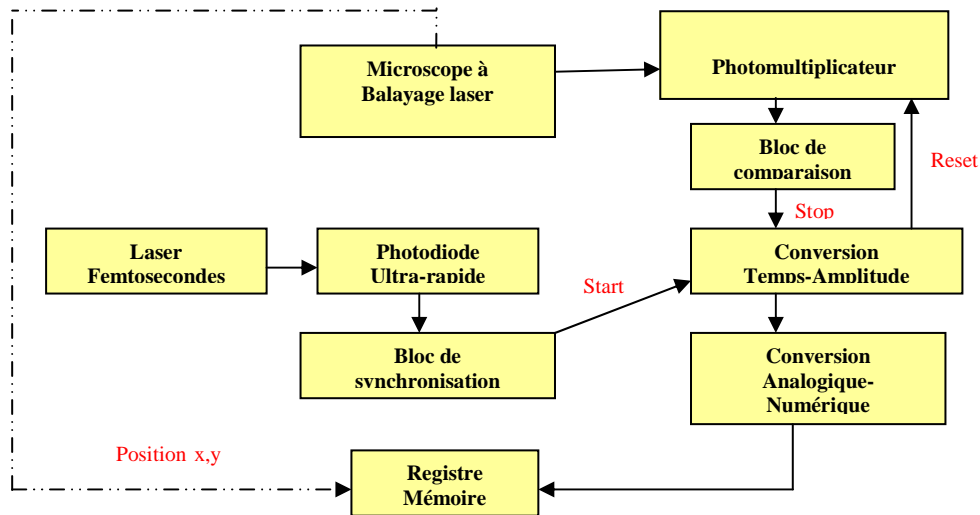


Figure 15 : Schéma de principe d'un système de comptage monophotonique.

La méthodologie appliquée peut être résumée ainsi :

➤ On excite l'échantillon à t_0 et au même instant, on envoie un signal Start à un convertisseur temps-amplitude, qui commence à charger un condensateur. Ce signal est obtenu grâce à une photodiode rapide (un miroir semi transparent permet de dévier une partie du faisceau principal). L'échantillon excité émet des photons de fluorescence.

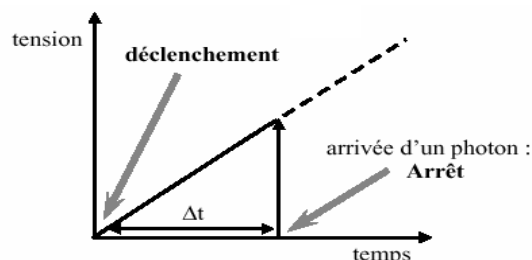


Figure 16 : Principe du convertisseur Temps-Amplitude.

- Dès qu'un photon est détecté par un photomultiplicateur, on envoie un signal stop sur le convertisseur temps-amplitude. L'impulsion émise alors par le convertisseur a une amplitude proportionnelle à la durée qui s'est écoulée entre les signaux Start et Stop.
- La valeur de l'impulsion générée par ce convertisseur est stockée (mémorisation du temps écoulé entre les deux signaux).
- Cette expérience est répétée un grand nombre de fois de manière à construire la distribution des instants d'arrivée de photons de fluorescence après l'impulsion.

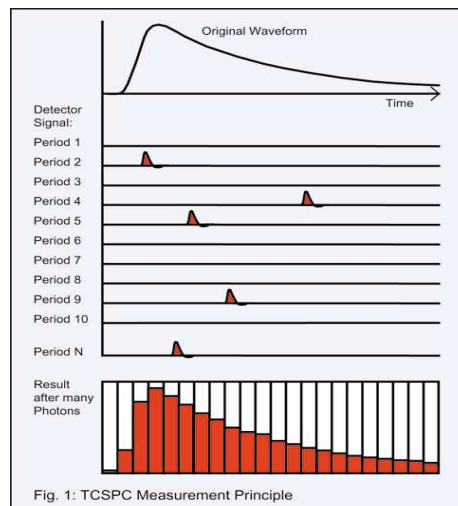
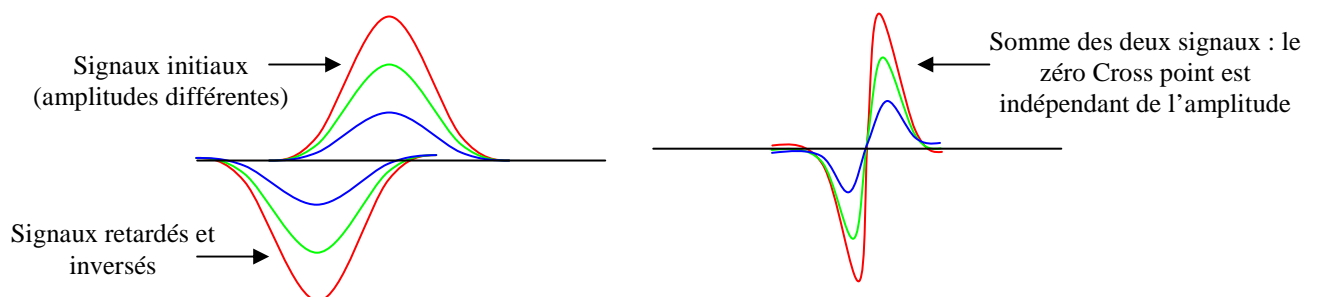


Figure 17 : Principe de construction de l'histogramme de distribution des instants d'arrivée de photons.

La fonction de comparaison est assurée par différents éléments. Un comparateur sert à trier les impulsions amplifiées selon leur amplitude. Le bruit est éliminé grâce au réglage d'un seuil de tension. Un signal Stop est délivré lorsqu'une impulsion électronique est générée par le photomultiplicateur. La détection se fait avec la méthode du « Zero Cross Point » (ZCP), ou passage à zéro. Cette technique repose sur un signal composé de la somme de deux signaux (le signal issu du photomultiplicateur et son homologue retardé et inversé).



Lors de ce passage à zéro (indépendant de l'amplitude du signal), un trigger émet une impulsion positive et constitue l'horloge de la bascule. Lors d'un front montant de cette bascule (détection d'un ZCP), si le pulse issu du PM a une valeur supérieure à la valeur seuil et ne correspond donc pas à du bruit), un **signal Stop** est généré.

La fonction de synchronisation est assurée par une photodiode permettant de générer un **signal Start** corrélé à la localisation temporelle d'un pulse laser. Ici encore, la technique du ZCP est utilisée. Ce signal est dirigé vers le premier comparateur servant à éliminer le bruit. Quand l'amplitude des pulses de la photodiode est supérieure à un seuil bas, son signal de sortie ne sera pas nul. Le signal de la photodiode atteint également un second comparateur qui a pour fonction d'avertir de la présence de pulses d'amplitude trop importante.

La fonction de conversion temps-amplitude est assurée par des composants tels un générateur de rampe, deux amplificateurs, quatre comparateurs et un circuit de contrôle. Dès l'activation du signal Start, le générateur de rampe génère une tension qui croît linéairement en fonction du temps. Deux comparateurs permettent de savoir si la tension est comprise entre deux bornes. Si elle l'est, le bloc fonctionnel de conversion analogique numérique est activé. Sinon, on remet l'ensemble à 0. Le troisième comparateur permet la remise à zéro de l'ensemble s'il n'y a pas eu de détection de photons pendant un temps imparti. Le dernier sert à ne pas convertir une valeur trop petite.

La fonction de conversion permet de transformer le signal issu du convertisseur temps-amplitude en données binaires qui sont ensuite stockées dans un registre mémoire.

Les paramètres de la carte sont ajustables au moyen d'une interface logicielle (SPCM, Becker&Hickl). Puis, le logiciel SPCImage permet une cartographie des durées de vie de fluorescence. En effet, la carte de comptage monophotonique étant couplée au scanner du microscope, chaque photon détecté peut être attribué à un pixel de l'image (128*128 pixels²). Par la suite, à chacun des pixels sera associée une courbe de déclin de fluorescence. Ce logiciel nous a permis l'ajustement des données expérimentales par des modèles de déclin de fluorescence mono ou multi exponentiel (1 à 3 composantes). Différentes options de codage couleur permettent d'attribuer aux pixels la valeur de l'une des constantes de déclin, son poids...

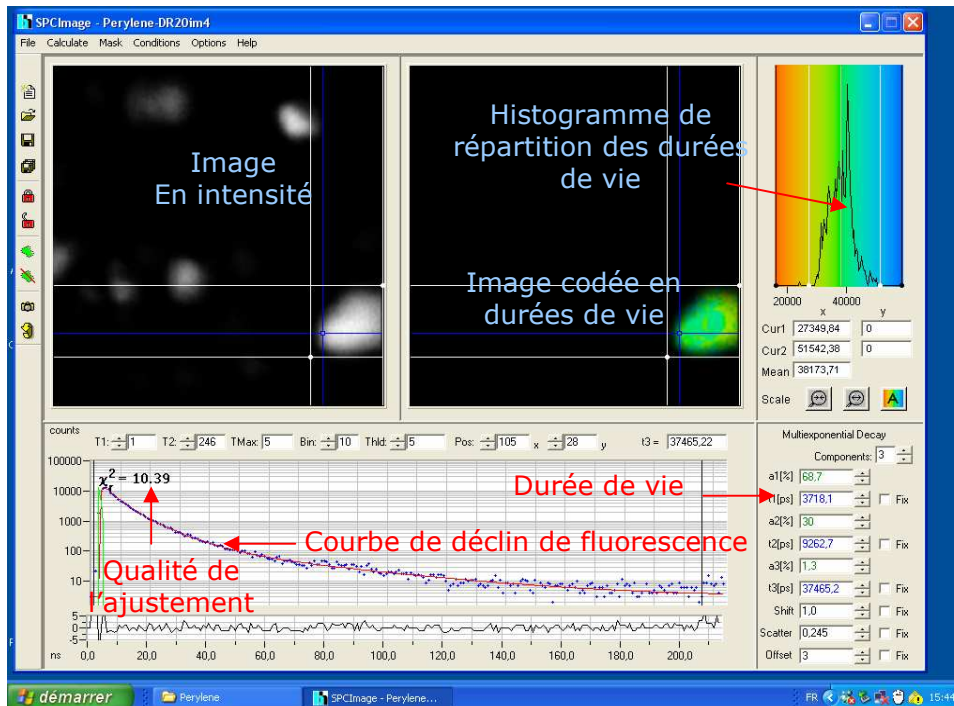


Figure 18 : L'interface du logiciel SPCImage permet d'attribuer à chaque pixel de l'image un déclin de fluorescence, puis après ajustement (mono, bi ou triexponentiel) des valeurs de durées de vie de fluorescence. L'image codée en couleur peut représenter les différents paramètres des ajustements (composantes du déclin, poids des composantes...). L'histogramme permet d'avoir la répartition des valeurs codées pour la région délimitée par les curseurs blancs.

II.5. SHG (Second Harmonic Generation)

Les mesures de signal SHG ont été effectuées suite à une excitation MP à une longueur d'onde de 800 nm. Le signal d'excitation a été focalisé au moyen de différents objectifs dont les caractéristiques sont résumées dans le Tableau 2.

Nous avons utilisé le photomultiplicateur normalement dédié à la réalisation d'image en lumière transmise sur le laser microscope confocal à balayage laser (TCS SP2-AOBS, Leica Microsystems) pour collecter la partie du signal SHG émise dans le sens de propagation du rayon incident. Les modifications apportées à la configuration de base ont été l'ajout de deux filtres ainsi que le remplacement du condenseur par un objectif (Figure 19). Un filtre passe-bande (400 ± 25 nm) a permis de recueillir le signal spécifique SHG (400 nm) et un filtre

un passe-bas (700 nm) a permis de stopper le faisceau d'excitation (800 nm) pouvant éventuellement traverser l'échantillon. Les objectifs de collection utilisés ont été les mêmes que ceux utilisés pour la focalisation du faisceau (cf. Tableau 2).

	Free Working Distance (μm)	Résolution (nm)		NA	Alpha (°)	Profondeur de champ (μm)	Angle SHG(°) = Alpha/racine(2)
		xy	z				
HC PL FLUOTAR 10X 0,3 DRY	11 000	651	4 768	0,30	17	4,34	12
HC PL APCS 20X 0,7 DRY	590	279	768	0,70	44	0,70	31
HCX APO L 40X 0,8 W	3 300	244	821	0,80	37	0,75	26

Tableau 2 : Caractéristiques des différents objectifs utilisés pour la focalisation du faisceau d'excitation et pour la collection du signal SHG.

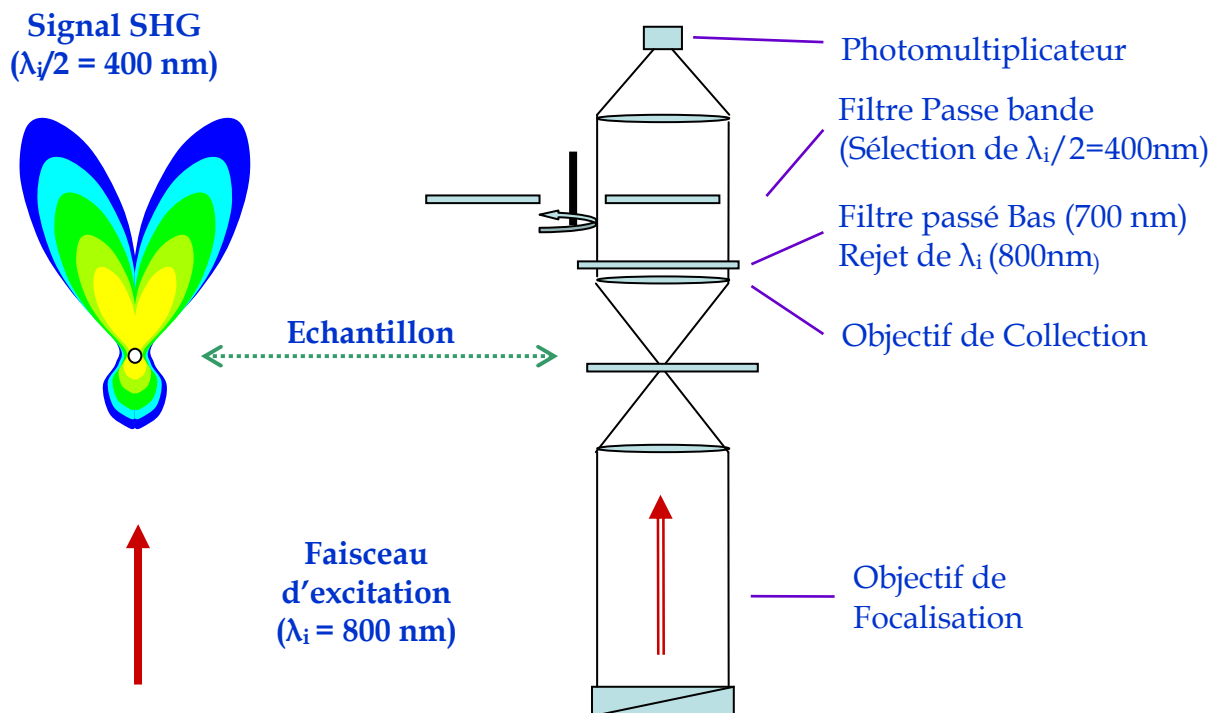


Figure 19 : Schéma de principe et optique de détection du signal SHG suite à une excitation multiphoton. Après une excitation multiphoton, un signal SHG est généré à exactement la moitié de la longueur d'onde d'excitation. Le diagramme de rayonnement SHG présente deux lobes principaux émis dans le sens du rayon incident. Le signal ainsi émis peut être collecté au moyen d'un objectif à grande ouverture numérique, au travers de filtres optiques adaptés.

II.6. Système de Macrofluorescence

Un microscope (Leica MacroFluo™ z6 APO A ; EL6000 120 W) couplé à une source d'excitation (lumière blanche déportée) nous a permis l'observation des tumeurs entières. Une caméra CCD a permis de recueillir le signal de fluorescence. Les images des tumeurs ont été réalisées avec un objectif x1, un facteur de zoom de 0,57 et un temps d'exposition de 630 ms, puis stockées dans des matrices de (1392*1040 pixels).

Un dichroïque à 595 nm et deux filtres passe-bande (BP 560/40 nm et BP 645/75 nm) ont permis de sélectionner la longueur d'excitation et la plage spectrale de collection du signal correspondant au photosensibilisant (Foslip).

II.7. Méthodes d'analyse d'images SHG

II.7.A. Méthode d'analyse d'images SHG – Analyse texturale

Nous avons réalisé des mesures de signal SHG, donc provenant du collagène, au niveau de la MEC du cartilage, pour différents échantillons soumis à diverses contraintes environnementales (mécanique, biochimique). Des images de taille (87*87µm²) ont été enregistrées dans des matrices (512*512 pixels).

Afin de mettre en évidence des différences de structures au niveau du réseau de collagène de la MEC, nous avons appliqué une méthode d'analyse de texture originale. Les méthodes d'analyse de texture ont déjà prouvé leur utilité en biologie, aussi bien sur des acquisitions IRM [172,173], que sur des images de microscopie confocale [174,175].

Notre choix s'est porté sur une analyse de texture par méthode statistique du 2nd ordre basée sur la dépendance spatiale et la probabilité de transition entre niveaux de gris de 2 pixels (matrice de cooccurrence, paramètres de Haralick). La méthode que nous avons appliquée s'appuie sur différents paramètres qualitatifs et quantitatifs : neuf des paramètres proposés par Haralick ont été exploités [176]. Ils nous permettent d'obtenir des informations

concernant l'homogénéité des images ('ASM'), leur contraste, la présence de structures linéaires ('Correlation') et la taille des éléments texturaux ('IDM') entre autres. Les images ont été normalisées de manière à ce que deux motifs texturaux identiques (mis à part l'intensité) présentent les mêmes paramètres. Nous avons également été vigilants par rapport à l'effet de saturation du signal SHG qui entraîne de grandes différences pour le calcul des paramètres texturaux, puisque les motifs peuvent apparaître élargis (cf. § III.3).

N est le nombre de niveaux de gris différents de l'image (256 dans notre cas); $p(i,j)$ est l'entrée (i,j) de la matrice de cooccurrence; et $p_x(i)$ est la $i^{\text{ème}}$ entrée de la matrice obtenue en sommant les

$$p(i, j) = \sum_j p(i, j) \cdot$$

$$p_{x+y}(n) = \sum_i \sum_{\substack{j \\ i+j=n}}^n p(i, j), \text{ avec } n = 2, 3, \dots, 2N$$

$$p_{x-y}(n) = \sum_i \sum_{\substack{j \\ |i-j|=n}}^n p(i, j), \text{ avec } n = 0, 1, \dots, N-1$$

f1	Angular Second Moment	$\sum_{n=0}^{N-1} \sum_j p(i, j)^2$
f2	Contrast	$\sum_{n=0}^{N-1} n^2 p_{x-y}(n)$
f3	Correlation	$\frac{\sum_i \sum_j (i, j) p(i, j) - \mu_x^2}{\sigma_x^2}$
où μ_x et σ_x sont la moyenne et l'écart type de p_x		
f4	Variance	$\sum_i (i - \mu_x)^2 p_x(i)$
f5	Inverse Difference Moment	$\sum_i \sum_j \frac{1}{1 + (i - j)^2} p(i, j)$
f6	Sum Average	$\sum_{n=2}^{2N} n p_{x+y}(n)$
f7	Sum Variance	$\sum_{n=2}^{2N} (n - f_6)^2 p_{x+y}(n)$
f8	Sum Entropy	$-\sum_{n=2}^{2N} p_{x+y}(n) \log(p_{x+y}(n))$
f9	Entropy	$-\sum_i \sum_j p(i, j) \log(p(i, j))$

Tableau 3 : Méthode de calcul des paramètres texturaux de Haralick, basée sur l'analyse des matrices de cooccurrence.

II.7.B. Méthode d'analyse d'images SHG – classification ACP

Le nombre de paramètres que nous avons calculés à partir des images étant élevé, nous avons procédé à une Analyse en Composantes Principales (ACP) de nos données. L'objectif de cette méthode statistique est de pouvoir redimensionner l'espace des données pour en faire une représentation 2D. L'analyse ACP permet de déterminer l'espace bidimensionnel qui permettra de séparer au mieux les populations, en gardant le maximum d'informations par rapport aux données initiales.

Tous les données ont été centrées et normalisées (soustraction de la moyenne puis division par l'écart type). En effet, les valeurs obtenues pour différents paramètres étant très différentes, et pour tenir compte de l'influence de chacun, il convient de procéder à cette étape. Dans le cas contraire, uniquement le paramètre présentant l'ordre de grandeur le plus important serait représenté.

II.7.C. Logiciels utilisés pour le traitement d'images et les reconstructions 3D

L'exploitation des données acquises a nécessité l'utilisation de différents logiciels :

- LCS (Leica Confocal Software) : pour le tracé et l'exportation de spectres de fluorescence de ROIs sélectionnées manuellement.
- SPC Image : pour les ajustements principalement en mode biexponentiel des courbes de déclin de fluorescence et le codage couleur des images en durée de vie.
- Excel : pour l'ajustement linéaire des courbes de photoblanchiment lors de l'étude du Cavity Dumper.
- Microcal Origin : pour la superposition des courbes et les représentations graphiques.
- Edit3D : pour les reconstructions 3D et l'amélioration de la qualité des images au moyen de filtres et d'ajustement de brillance ou de contraste.
- ImageJ : pour le tracé de profils au travers de fibres de collagène, ou des parois artérielles, pour la superposition des images.
- Matlab : pour le calcul des paramètres texturaux d'images SHG, les analyses ACP, les colocalisations, les simulations de probabilité d'absorption et de rayonnement optique.
- Autocad : pour les représentations schématiques des zones de collection des différents objectifs.

III. RESULTATS et DISCUSSION

III.1. Conditions d'excitation Multiphoton – Cavity Dumper

L'excitation MP dépend fortement des propriétés des impulsions femtosecondes utilisées, en particulier du confinement spatial de l'énergie impulsionnelle pour laquelle on détermine la puissance crête. Dans cette expérience, deux systèmes nous ont permis de moduler cette énergie et d'étudier l'efficacité d'absorption dans un processus linéaire d'absorption MP.

Le premier (**Cavity Dumper**) nous a permis de confiner temporellement l'énergie par réduction de la fréquence de tir initiale sur une plage comprise entre 1,8 MHz (DR30) et 417 kHz (DR130), et ainsi de moduler l'énergie impulsionnelle (35 à 75 nJ). Nous avons pu constater que l'énergie d'une impulsion augmente avec la diminution de la fréquence de tir, alors que la puissance moyenne du faisceau laser diminue, conformément aux données du fabricant.

Le second système de modulation est un modulateur électrooptique (**EOM**). Avec ce système, la fréquence de tir reste constante (76 MHz) et l'augmentation de l'énergie impulsionnelle est proportionnelle à l'augmentation de la puissance moyenne.

Le phénomène de fluorescence est un processus qui nécessite l'absorption de photons : le spectre d'excitation doit être compatible avec le spectre d'absorption des molécules. La quantité de fluorescence émise dépend fortement de la section efficace d'absorption des molécules et des paramètres d'excitation. La probabilité d'absorption MP est reliée de manière quadratique avec l'énergie impulsionnelle [86] :

$$n_a \approx \delta_2 P_{ave}^2 * [2 \left[\frac{(NA)^2}{(2hc \lambda)} \right]^2 / \tau_p f_p^2 ; n_a \approx \frac{\delta_2 P_{ave}^2}{\tau_p f_p^2} \left(\frac{2\pi(NA)^2}{2hc\lambda} \right)^2$$

avec δ_2 la section efficace d'absorption de la molécule fluorescente (GM, 1 GM = 10^{-58} [m⁴.s.photons⁻¹]), P_{ave} la puissance moyenne du faisceau laser (W), NA l'ouverture numérique de l'objectif, τ_p la largeur du pulse laser (s), f_p la fréquence de tir des impulsions laser (Hz), h la constante de Planck ($6,626 \cdot 10^{-34}$ J.s), c la célérité ($3 \cdot 10^8$ m.s⁻¹) et λ la longueur d'onde du faisceau d'excitation.

La restitution de l'excédent d'énergie des états excités à l'environnement sous forme d'une émission de fluorescence est affectée par de nombreux paramètres environnementaux, et peut être caractérisée par des constantes de désactivation des états excités, dont la constante de photoblanchiment. Puisque la probabilité d'absorption n'a pu être mesurée directement par le spectre d'excitation, nous avons étudié le photoblanchiment en supposant que ce phénomène reflète l'efficacité d'excitation.

Pour ces expériences, des noyaux de tumeurs de souris ont été marqués avec du Hoechst, dont la section efficace d'absorption est de $\delta_2 \approx 10^{-2} \text{ GM} \approx 10^{-60} [\text{m}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{photons}^{-1}]$ [89]. Des séries d'images en mode 'xzt', avec une excitation MP à 800 nm, un objectif x20 (NA=0,7) ont été acquises pour différentes énergies impulsionnelles. Etant donné qu'après chaque acquisition la fluorescence du marqueur a diminué par processus de photoblanchiment, une seconde mesure n'a pu être effectuée au niveau de la même zone et nous avons supposé une distribution homogène des noyaux au sein de la tumeur. La procédure d'acquisition et de traitement des images a été explicitée dans la partie 'Matériel et Méthodes' au paragraphe II.2.A.3 page 51

III.1.A. Caractérisation de l'énergie impulsionnelle – Cavity Dumper et EOM

III.1.A.1. Cavity Dumper

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les impulsions obtenues en sortie de Cavity Dumper (Système prêté par l'IBL, Lille, L. Hélot). Le paramètre réglable par ce module, le DR (Division Ratio) permet de diviser la fréquence initiale du faisceau laser F (54,3 MHz) par sa valeur. Nous avons pu vérifier cela en utilisant la carte de comptage en mode 'oscilloscope' et 'single', en mesurant le temps entre deux pulses lasers. La comparaison des mesures de la période avec les données attendues nous a permis de valider les données du constructeur pour une plage de DR s'étendant de 20 à 70. Pour des DR supérieurs, nous n'avons pu effectuer ces mesures, puisque la plage accessible au moyen du logiciel SPCM ne permettait plus d'observer deux pulses successifs (temporellement trop éloignés).

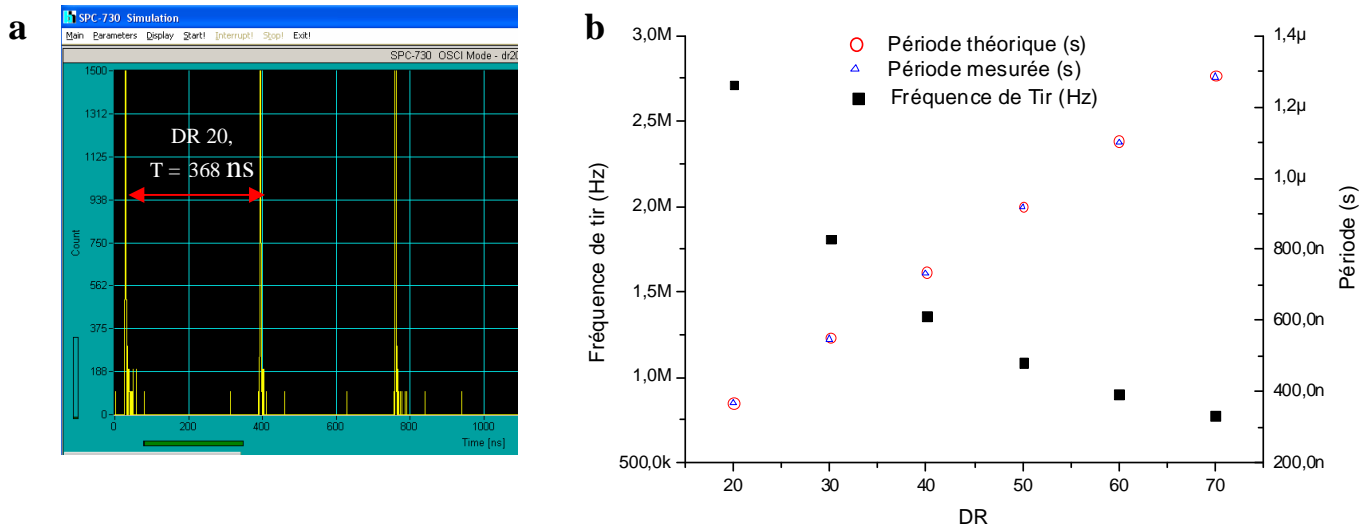


Figure 20 : Mesure de la fréquence de tir des impulsions laser en sortie de Cavity Dumper. (a) La période entre deux pulses est de 368 ns, correspondant à une fréquence de 2,7 MHz (DR20) soit (54,6 MHz/20). (b) La comparaison de la période mesurée à la valeur attendue nous a permis de valider les données du constructeur.

La fréquence de tir des impulsions laser est de $F=54,3 \text{ MHz/DR}$, avec une période du signal d'excitation $T=1/F$. On peut approximer l'énergie impulsionnelle par $E = P_{\text{moy}} * T = P_{\text{Crête}} * \tau$, avec P_{moy} , la puissance moyenne du faisceau laser, $P_{\text{Crête}}$ la puissance crête d'une impulsion, et τ la largeur d'une impulsion, supposée ici constante à 150 fs.

Conformément aux indications du constructeur, plus la fréquence de tir diminue, plus la puissance crête ainsi que l'énergie des impulsions augmentent (Figure 21 et Figure 22). Il en résulte que pour la gamme de fréquence utilisée, les impulsions générées présentent une énergie comprise entre 35 et 75 nJ (Figure 22).

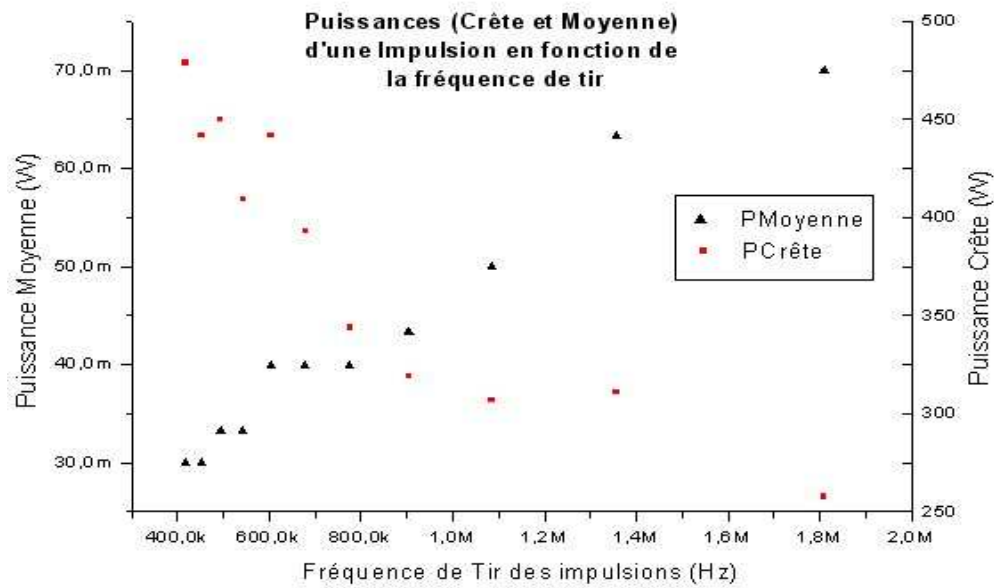


Figure 21 : Représentation de la puissance Moyenne et de la puissance Crête du faisceau laser en fonction de la fréquence de tir (réduite au moyen du Cavity Dumper). Conformément aux données du constructeur, la diminution de la fréquence de tir des impulsions s'accompagne d'une diminution de la puissance moyenne du faisceau et d'une augmentation de la puissance Crête des impulsions.

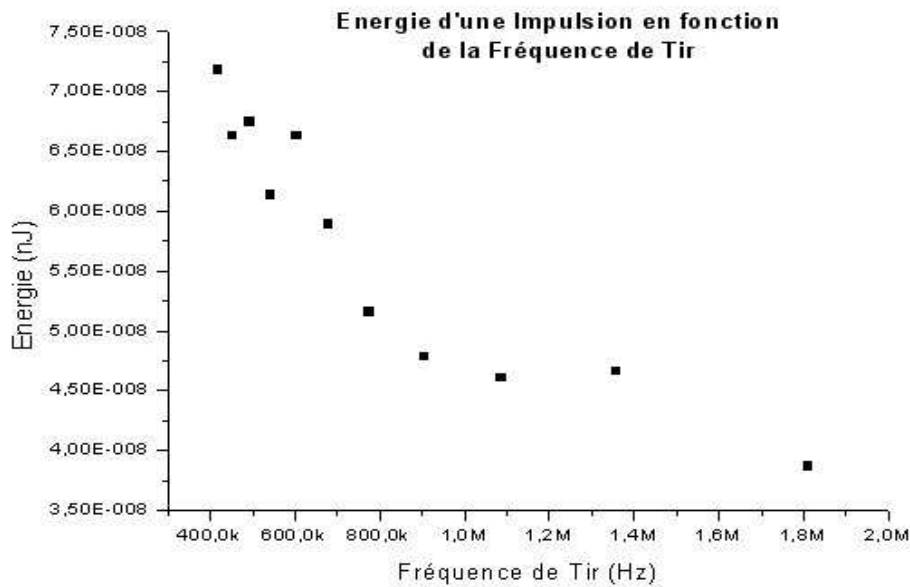


Figure 22 : Représentation de l'énergie d'une impulsion en fonction de la fréquence de tir des impulsions (réduite au moyen du Cavity Dumper). Plus la fréquence diminue, plus l'énergie impulsionnelle croît.

III.1.A.2. EOM

Pour l'EOM, la Puissance Crête des impulsions est proportionnelle à la puissance moyenne du faisceau laser, puisque la largeur d'une impulsion et la cadence de tir sont constantes. Ainsi,

$$E = P_{\text{moy}} * T = P_{\text{moy}} / F = P_{\text{moy}} / 76^{e6} = P_{\text{Crête}} * \tau \text{ et}$$

$$P_{\text{Crête}} = P_{\text{moy}} * T / \tau = 87,7^{e3} * P_{\text{moy}}$$

Le réglage de l'EOM s'effectue en réglant les paramètres de Gain et d'Offset après calibration. Pour un Offset donné, la puissance varie sinusoidalement en fonction du Gain. Pour nos mesures, nous avons modulé la puissance moyenne du faisceau de 30 à 193 mW avec ce module, pour obtenir des impulsions d'énergie comprise entre 395 pJ et 2,5 nJ et de Puissance Crête de 20 kW au maximum (Figure 23).

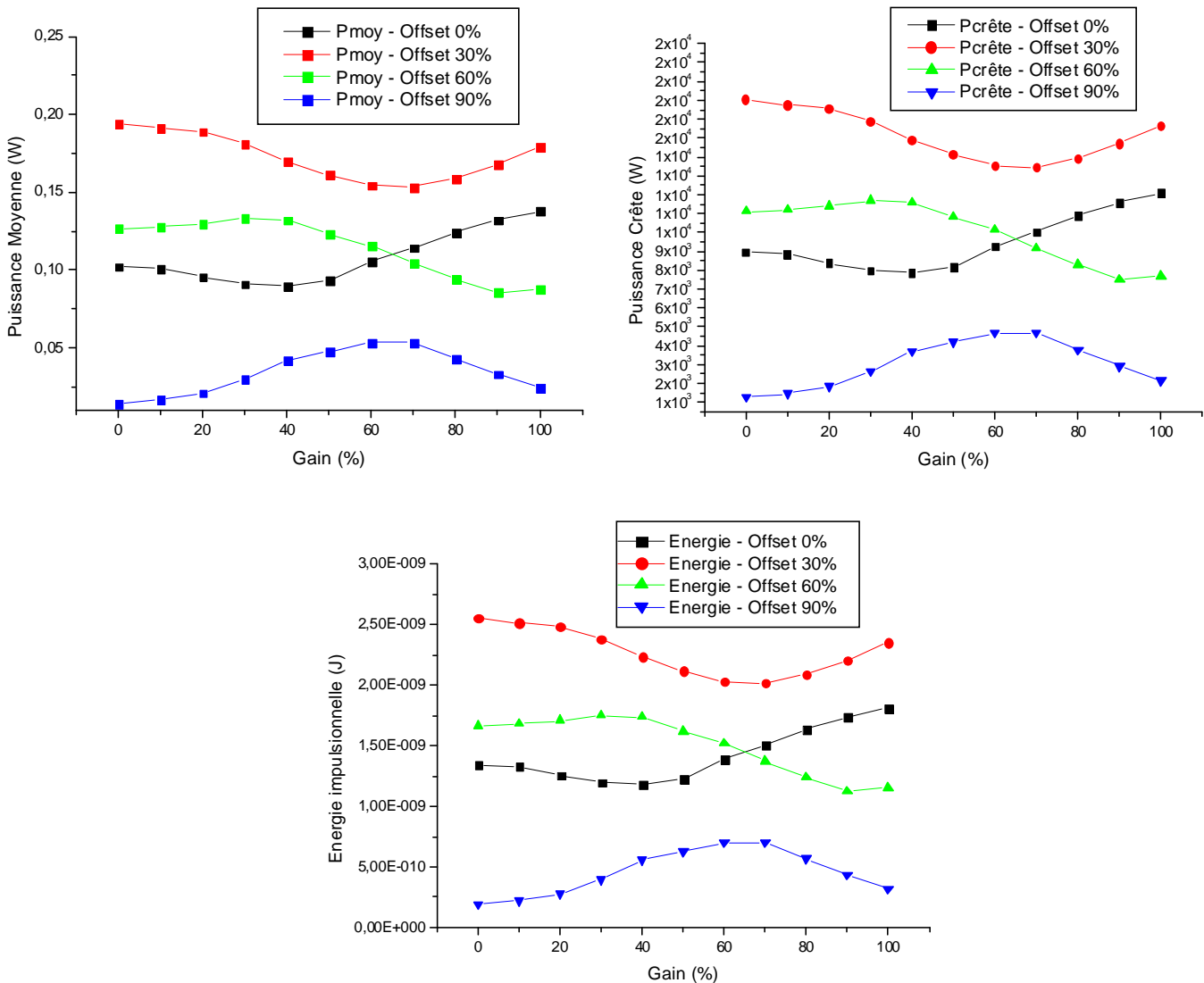


Figure 23 : Représentation de la puissance Moyenne, de la puissance Crête et de l'énergie impulsionnelle du faisceau d'excitation modulé au moyen de l'EOM, en fonction des paramètres de Gain et d'Offset de l'EOM.

A puissance moyenne égale (de 30 à 70 mW), un facteur d'environ 40 est noté entre l'énergie d'une impulsion obtenue par modulation du faisceau au moyen de l'EOM (395 pJ à 1 nJ) et diminution de la fréquence par Cavity Dumper (40 à 70 nJ) (Figure 24).

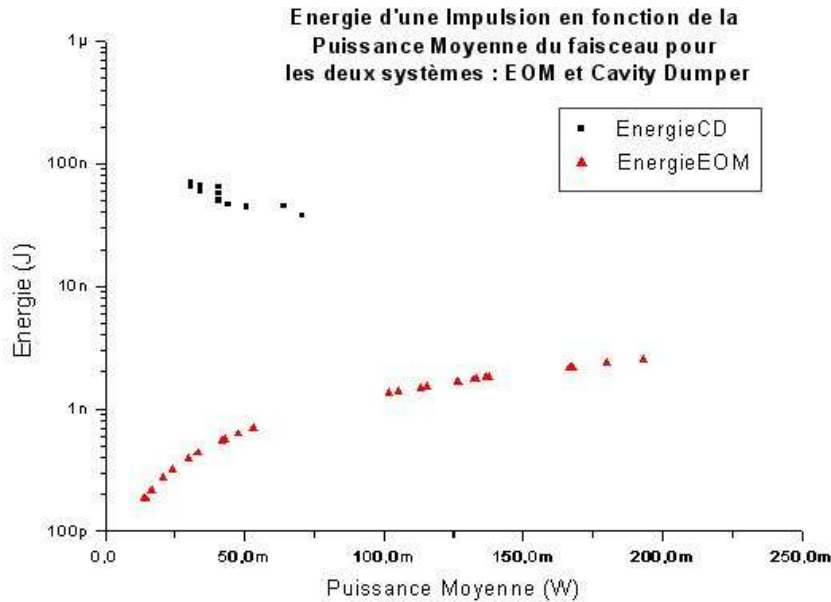


Figure 24 : Représentation des énergies impulsions obtenues avec l'EOM et le Cavity Dumper en fonction de la puissance Moyenne du faisceau d'excitation. A puissance moyenne équivalente, l'énergie atteinte lors d'une modulation avec le Cavity Dumper est environ 40 fois plus élevée qu'avec l'EOM.

III.1.B. Photoblanchiment - Méthode d'analyse (Exemple pour une condition expérimentale)

Ce paragraphe va permettre de détailler la méthode d'analyse d'image appliquée à une série, c'est-à-dire pour une condition d'énergie impulsions donnée (Cavity Dumper, DR30, F = 1,8 MHz, Energie d'une impulsion : 39 nJ).

III.1.B.1. Profils d'intensité de fluorescence

Chaque série temporelle est constituée de 10 images 'xz'. Une projection sur l'axe z est effectuée pour chaque image, c'est-à-dire que nous obtenons au total 10 profils par série (chacun correspondant à un temps).

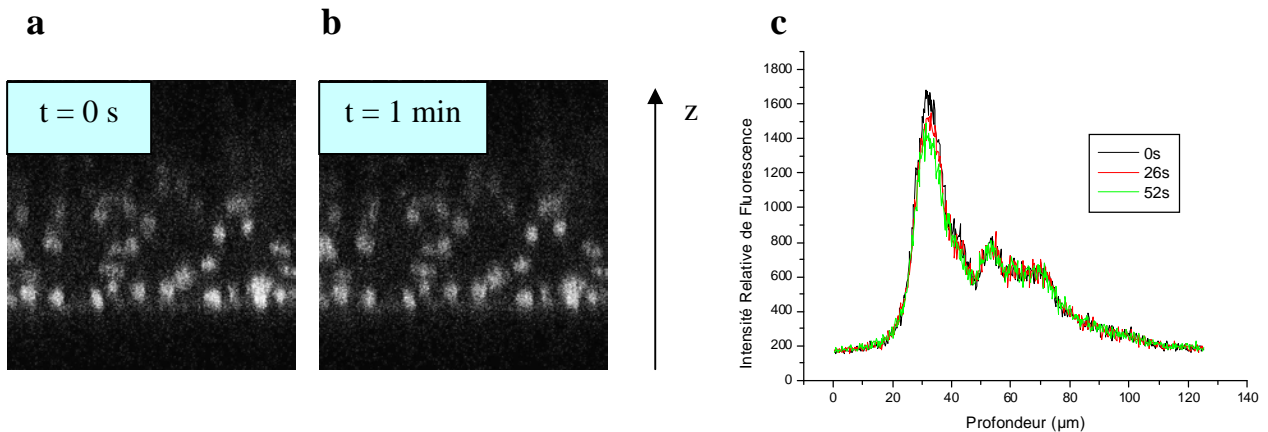


Figure 25 : Images de noyaux tumoraux marqués au Hoechst, en profondeur (mode 'xz') (a) à t=0s et (b) t=1 min. Les profils d'intensité de fluorescence (c) sont tracés en projetant l'intensité du signal suivant l'axe z pour t=0 s, 26 s et 52 s.

L'observation des profils projetés suivant l'axe z montre la diminution de fluorescence au cours du temps (Figure 25). Cette baisse semble plus marquée au niveau des zones proches de la surface de l'échantillon. Si le photoblanchiment est plus important près de la surface, l'efficacité d'excitation est donc plus importante à cet endroit, dans la mesure où il n'y a pas de contribution des interfaces.

III.1.B.2. Détermination du paramètre cinétique – Constante de Photoblanchiment

Pour chaque profondeur donnée, le paramètre cinétique d'extinction de fluorescence est mesuré sur 10 points (1 point par temps). L'évolution d'intensité peut être ajustée de manière linéaire décroissante. La pente de l'ajustement linéaire ainsi calculée est un paramètre cinétique (d'unité 1/s), caractérisant la vitesse de l'extinction de fluorescence à la profondeur donnée.

Ce paramètre ne dépend pas de l'intensité initiale de fluorescence, et pour une meilleure visualisation, nous avons normalisé les courbes (Maximum = 1).

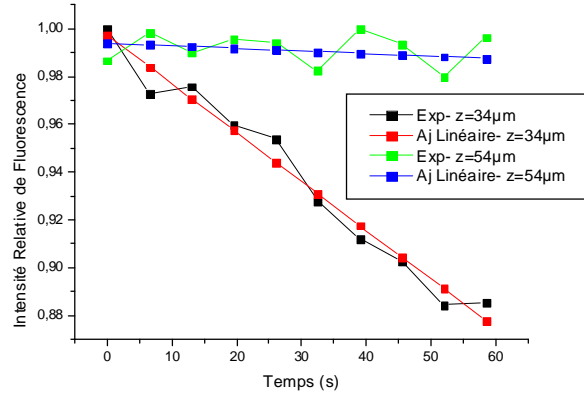


Figure 26 : Les courbes de déclin de fluorescence suite au photoblanchiment sont ajustées linéairement et le graphique représente ces courbes d'ajustement pour des déclinés mesurés à une profondeur $z= 34\mu\text{m}$ et $z= 54\mu\text{m}$.

La Figure 26 représente les déclinés de l'intensité de fluorescence mesurés à deux profondeurs différentes ($z=34 \mu\text{m}$ et $z=54 \mu\text{m}$). Les données expérimentales sont ajustées par des droites de pentes respectives $-2,04 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($z=34 \mu\text{m}$) et $-1,10 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($z=54 \mu\text{m}$). L'écart entre les données expérimentales et la courbe d'ajustement caractérisée par $E = \frac{\sum(|\text{résidus}|)}{\sum(\text{photons exp})}$ est $< 1\%$ dans les 2 cas. Plus la valeur de la pente est élevée en valeur absolue, plus l'effet du photoblanchiment est marqué.

L'étape suivante consiste à calculer les ajustements linéaires pour chaque valeur de z (profondeur). Les courbes représentatives des constantes de photoblanchiment en fonction de la profondeur sont lissées. Le principe du lissage consiste à calculer des moyennes mobiles sur 50 Pixels (soit $12 \mu\text{m}$).

La partie de la courbe la plus intéressante est celle présentant des pentes d'ajustement négatives. Pour la série étudiée dans ce paragraphe, on obtient le graphe présenté sur la Figure 27 qui reflète bien la distribution des cinétiques de photoblanchiment en fonction de la profondeur.

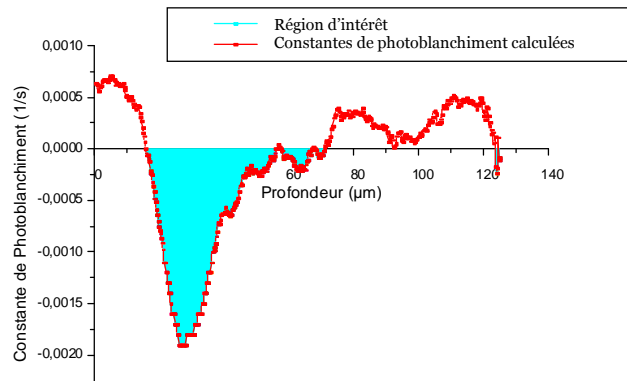


Figure 27 : Une constante de photoblanchiment est calculée pour chaque profondeur.

III.1.B.3. Normalisation par impulsion

Puisque la fréquence de tir des impulsions est un paramètre variable dans cette expérience, pour comparer l'effet de l'énergie d'une impulsion, il convient de normaliser les données. En effet, les cinétiques sont mesurées pour X impulsions (nombre d'impulsions pour une colonne de l'image, soit 512 pixels), autrement dit, X impulsions ont contribué à éteindre la fluorescence. L'effet d'une impulsion unique est obtenu en divisant la constante de photoblanchiment par X.

Pour calculer les paramètres de normalisation, nous avons tenu compte de la vitesse de balayage d'une ligne (400 Hz), d'où le temps de balayage de 2,5 ms et le temps pour un pixel de 4,9 µs. Le nombre d'impulsion pour une colonne de l'image pour chaque condition expérimentale est présenté dans le Tableau 4.

	EOM	DR Cavity Dumper										
		30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
Nombre d'impulsions pour 512 pixels (1 colonne)	190 669	4 541	3 406	2 725	2 270	1 946	1 703	1 514	1 362	1 238	1 135	1 048
Fréquence de tir des impulsions (Hz)	76,0E+6	1,8E+6	1,4E+6	1,1E+6	905,0E+3	775,7E+3	678,8E+3	603,3E+3	543,0E+3	493,6E+3	452,5E+3	417,7E+3

Tableau 4 : Calcul des paramètres de normalisation des cinétiques de photoblanchiment.

	DR30-1	DR40-1	DR50-1	DR60-1	DR70-1	DR80-1	DR90-1	DR100-1	DR110-1	DR120-1	DR130-3
P lue (W)	21,0E-3	19,0E-3	15,0E-3	13,0E-3	12,0E-3	12,0E-3	12,0E-3	10,0E-3	10,0E-3	9,0E-3	9,0E-3
Puissance Moyenne Effective (W)	70,0E-3	63,3E-3	50,0E-3	43,3E-3	40,0E-3	40,0E-3	40,0E-3	33,3E-3	33,3E-3	30,0E-3	30,0E-3
Puissance Crête (calculée) (W)	257,8E+3	311,0E+3	306,9E+3	319,2E+3	343,8E+3	392,9E+3	442,0E+3	409,2E+3	450,2E+3	442,0E+3	478,8E+3
Energie d'une Impulsion (calculée) (J)	38,7E-9	46,7E-9	46,0E-9	47,9E-9	51,6E-9	58,9E-9	66,3E-9	61,4E-9	67,5E-9	66,3E-9	71,8E-9
Fréquence de Tir (Hz)	1,8E+6	1,4E+6	1,1E+6	905,0E+3	775,7E+3	678,8E+3	603,3E+3	543,0E+3	493,6E+3	452,5E+3	417,7E+3
Période (s)	552,5E-9	736,6E-9	920,8E-9	1,1E-6	1,3E-6	1,5E-6	1,7E-6	1,8E-6	2,0E-6	2,2E-6	2,4E-6

Tableau 5 : Caractérisation en Puissance et Energie du faisceau d'excitation en fonction de la fréquence de tir en sortie du Cavity Dumper. Puissance moyenne (mesurée), Puissance Crête (calculée), Energie impulsienne (calculée).

III.1.B.4. Intérêt des fonctions de répartition pour la comparaison des courbes

Soit $\Phi(z)$ la fonction représentant la constante cinétique de Photoblanchiment en fonction de la profondeur (z). La fonction de répartition de $\Phi(z)$ est calculée par la relation :

$$F(p) = \int_0^p \Phi(z) dz$$

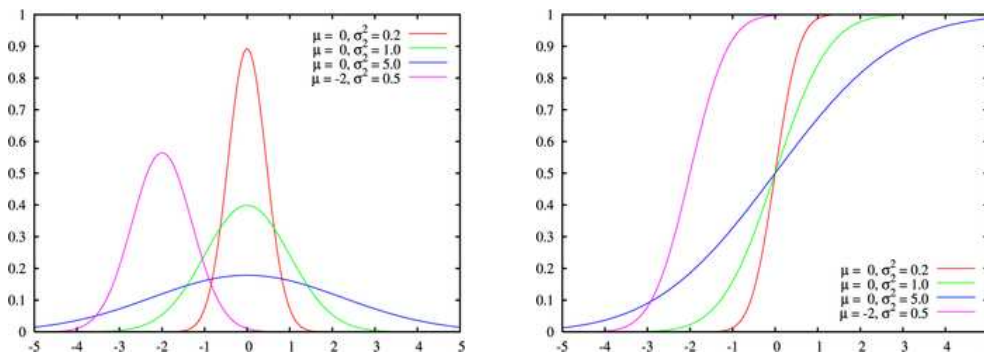


Figure 28 : Représentation des fonctions de répartition de différentes gaussiennes et intérêt pour la comparaison des courbes. Le taux d'accroissement des fonctions de répartition reflète la largeur à mi-hauteur des gaussiennes. La valeur finale des fonctions de répartition reflète l'intégrale sous les courbes gaussiennes. Le pic gaussien se retrouve à la position pour laquelle la fonction de répartition n vaut 50%.

Les fonctions de répartition de la Figure 28 ont été tracées pour des courbes gaussiennes (intégrale = 1). Trois courbes centrées sur la même valeur, mais présentant des largeurs à mi-hauteur différentes seront discriminables par leurs fonctions de répartition. Plus la largeur à mi-hauteur est faible, plus la fonction de répartition est « raide ». Le décalage de la valeur sur laquelle le pic est centré entraîne un décalage de la fonction de répartition. Dans le cas d'une gaussienne (normalisée), la position du pic correspond à l'abscisse pour laquelle $F(p) = 0,5$.

L'application de la notion de Fonction de répartition se révèle intéressante pour l'étude des constantes de photoblanchiment en fonction de la profondeur. En effet $F(p)$ permet de comparer à la fois :

- L'intégrale sous la courbe représentative de $\Phi(z)$, reflétant l'efficacité d'excitation de l'échantillon et qui correspond à la valeur finale de $F(p)$.

- La cinétique de photoblanchiment la plus rapide, reflétant l'efficacité maximum d'excitation et sa profondeur : plus la pente de la fonction de répartition est élevée, plus la cinétique sera rapide.

- La profondeur de confinement si on regarde à quelle profondeur $F(p)$ a atteint 95% de sa valeur finale.

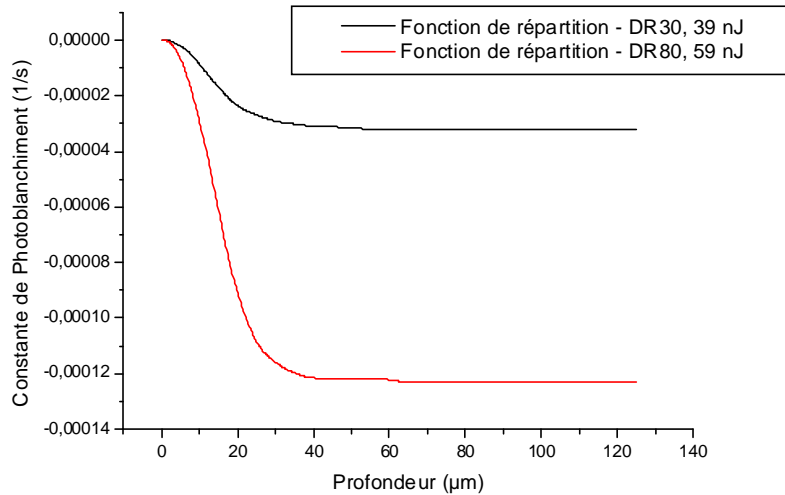


Figure 29 : Fonctions de répartition des courbes représentant la cinétique de photoblanchiment (normalisée par impulsion) en fonction de la profondeur pour deux séries différentes. Série 1 : DR30, 1,8 MHz, Energie d'une impulsion : 39 nJ. Série 2 : DR80, 679 kHz, Energie d'une impulsion : 59 nJ. La valeur finale de la fonction de répartition est beaucoup plus importante lorsque l'énergie impulsionnelle est plus élevée, suggérant un photoblanchiment plus intense.

La Figure 29 permet de comparer deux fonctions de répartition obtenues pour deux séries temporelles correspondant à des énergies impulsionnelles différentes : une série mesurée avec un DR de 80 (soit une énergie par impulsion de 59 nJ) et une série mesurée avec un DR de 30 (soit une énergie par impulsion de 39 nJ).

Soient $F_{30}(x)$ et $F_{80}(x)$ les fonctions de répartition des séries acquises avec respectivement un DR de 30 et un DR de 80. A une profondeur de $100\mu\text{m}$, $F_{30}(x=100\mu\text{m}) < F_{80}(x=100\mu\text{m})$. Pour une impulsion, l'efficacité d'excitation est environ 4 fois plus importante pour DR80. Par ailleurs, la pente de F_{80} est plus élevée en valeur absolue que celle de F_{30} ce qui signifie que l'efficacité d'excitation dans la zone de confinement est meilleure dans le cas où le DR est le plus élevé (fréquence de tir des impulsions plus faible) et l'énergie d'une impulsion plus élevée.

Pour bien visualiser les profondeurs de confinement, il faut normaliser les fonctions de répartition (valeur de $F(\infty) = 1 = 100\%$). $F_{30}(x)$ atteint 95% de sa valeur finale à une profondeur de 37 μm alors que $F_{80}(x)$ atteint 95% de sa valeur finale à une profondeur de 31,5 μm (Figure 30).

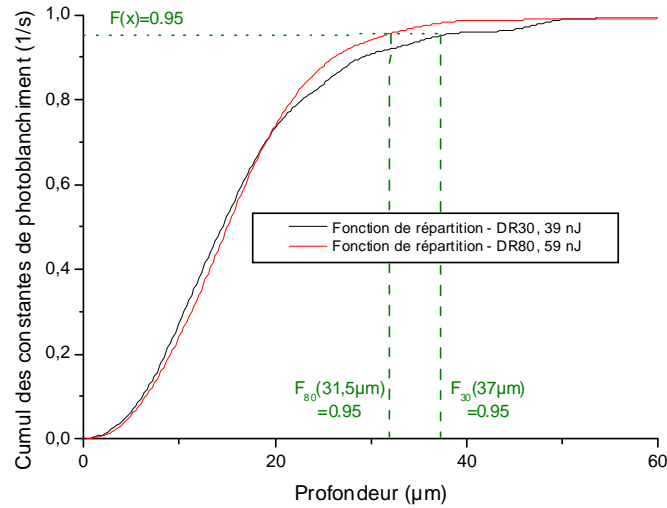


Figure 30 : Fonctions de répartition normalisées à $F(\infty) = 1$ des courbes représentant la cinétique de photoblanchiment (normalisée par impulsion) en fonction de la profondeur pour deux séries différentes. Série 1 : DR30, 1,8MHz, Energie d'une impulsion : 39 nJ. Série 2 : DR80, 679 kHz, Energie d'une impulsion : 59 nJ.

En combinant les informations obtenues à partir des fonctions de répartition des constantes de photoblanchiment en fonction de la profondeur, il résulte que pour une impulsion d'énergie plus élevée (DR80), l'excitation est plus confinée et de meilleure efficacité dans la zone de confinement.

Cette étape de traitement d'images a ensuite été appliquée pour toutes les acquisitions obtenues en modulant l'énergie impulsionnelle de 35 à 75 nJ au moyen du Cavity Dumper et de 395 pJ à 1 nJ avec l'EOM. La comparaison des résultats obtenus fait l'objet du paragraphe suivant.

III.1.C. Cinétique de photoblanchiment et profondeur d'analyse sur des noyaux

Ces expériences visent à relier les constantes d'extinction de fluorescence du Hoechst (marquage de noyaux de tumeur), la probabilité d'absorption MP et la profondeur d'analyse atteinte, pour des impulsions ayant des énergies différentes (EOM – Cavity Dumper).

Avant la normalisation des courbes de photoblanchiment en profondeur, l'efficacité des impulsions obtenues avec l'EOM paraît 2 fois plus élevée (

Figure 31a), sachant qu'à 76 MHz, 40 fois plus d'impulsions sont générées qu'à 1,8 MHz (DR30). Pour les deux systèmes, la constante de photoblanchiment est directement reliée à l'énergie délivrée par une impulsion, ce qui en rend nécessaire la normalisation par impulsion (

Figure 31). Il en ressort que plus l'énergie par impulsion augmente, plus la probabilité maximale d'absorption dans le volume de confinement est élevée avec un risque éventuel de saturation.

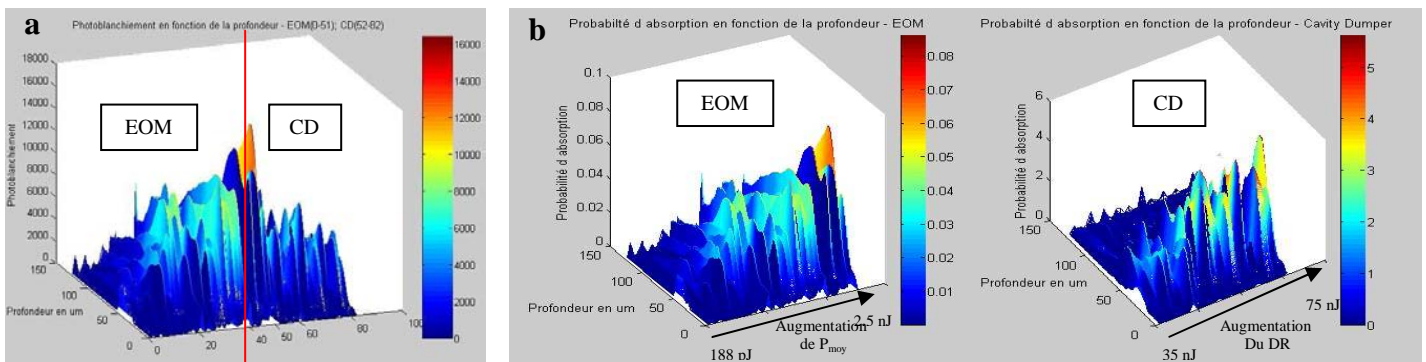


Figure 31 : Cinétiques de photoblanchiment pour des puissances variables de 188pJ à 2,5nJ (EOM) puis de 35 à 75 nJ (Cavity Dumper) – (a) Courbes non normalisées (b) Courbes normalisées par impulsion

III.1.C.1. Fonctions de répartition

Nos résultats montrent que pour les mesures avec l'EOM, plus l'énergie d'une impulsion est élevée, plus la valeur finale de la fonction de répartition augmente en conséquence du photoblanchiment observé sur les noyaux. La tendance est identique lorsque

l'énergie est concentrée temporellement au moyen du Cavity Dumper, avec des valeurs finales des fonctions de répartition 30 fois plus élevées (Figure 32).

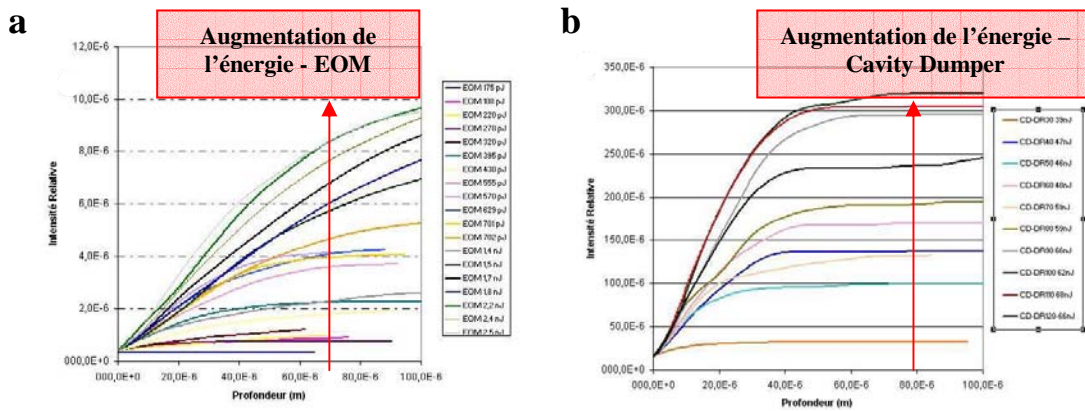


Figure 32 : Fonctions de répartition pour les différentes séries de mesures réalisées avec (a) l'EOM et (b) le Cavity Dumper. Dans les deux cas, plus l'énergie impulsionnelle augmente, plus la valeur finale de la fonction de répartition augmente, suggérant un photoblanchiment total plus intense. Les valeurs atteintes avec le Cavity Dumper (b) sont environ 40 fois plus importantes qu'avec l'EOM (a).

III.1.C.2. Fonctions de Répartition normalisées par impulsion

Les deux systèmes de modulation de l'énergie d'une impulsion laser donnent lieu à des fonctions de répartition (i.e. de la constante de photoblanchiment) d'allures différentes pour des profondeurs allant de 0 à 100 μm (Figure 33).

Avec l'EOM, plus l'énergie mise en œuvre augmente, moins la vitesse initiale de la fonction de répartition est importante, le photoblanchiment étant bien réparti sur toute la profondeur de manière progressive.

Avec le Cavity Dumper, plus l'énergie impulsionnelle augmente (DR faibles), plus la pente de la fonction de répartition est élevée, en particulier pour une profondeur inférieure à 40 μm . Cela signifie que le photoblanchiment serait plus important dans les zones les plus proches de la surface de l'échantillon.

Ainsi pour une profondeur de 40 μm , selon la Figure 33, le cumul des constantes de photoblanchiment vaut 0,62 pour une énergie E de 395 pJ (EOM 30 mW), 0,34 pour E=2,5 nJ (EOM 193 mW), 0,75 pour E=46 nJ (CD-DR40-63 mW), 0,99 pour E=61 nJ (CD-DR100-33

mW). La profondeur d'illumination pour laquelle 95% du photoblanchiment est mesuré vaut 86 µm pour E=395 pJ (EOM 30 mW), 112 µm pour E=2,5 nJ (EOM 193 mW), 77 µm pour E=46 nJ (CD-DR40-63 mW), 23 µm pour E=61 nJ (CD-DR100-33 mW).

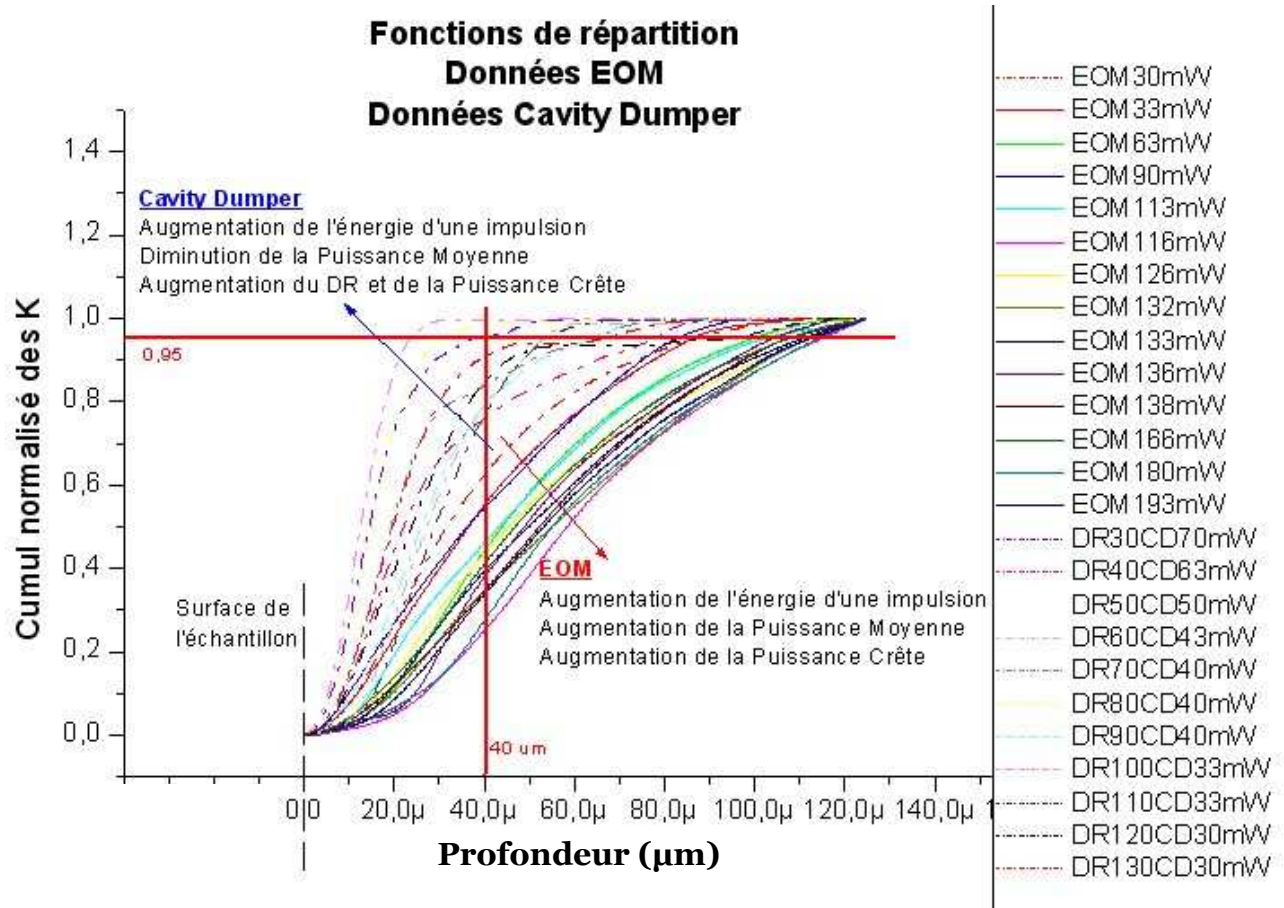


Figure 33 : Fonctions de répartition (normalisées telles que la valeur maximale soit égale à 1) des constantes de photoblanchiment en fonction de la profondeur. Le taux d'accroissement obtenu pour les mesures réalisées avec le Cavity Dumper est plus élevé, suggérant un fort photoblanchiment en surface de l'échantillon. Avec l'EOM, le photoblanchiment est plus homogène en profondeur au sein de l'échantillon.

III.1.D. Probabilité d'absorption multiphoton

III.1.D.1. Simulation de la probabilité d'absorption

Pour le calcul des probabilités d'absorption MP $n_a \approx \frac{\delta_2 P_{ave}^2}{\tau_p f_p^2} \left(\frac{2\pi(NA)^2}{2hc\lambda} \right)^2$ [86], des

paramètres peuvent être considérés constants pour la simulation: $\delta_2=10^{-2}$ GM $\approx 10^{-60}$ [m⁴.s.photons⁻¹], section efficace d'absorption du Hoechst, $\tau_p=150$ fs la largeur d'une impulsion, NA=0.7 l'ouverture numérique de l'objectif, $h=6,626.10^{-34}$ J.s, $c=3.10^8$ m.s⁻¹ et

$\lambda=800$ nm la longueur d'onde du faisceau d'irradiation. Pour les mesures avec l'EOM, f_p est constant à 76 MHz, et P_{ave} compris entre 30 et 193 mW. f_p varie de 418 kHz à 1,8 MHz et P_{ave} de 30 à 70 mW lors des mesures avec le Cavity Dumper.

Une simulation numérique à l'aide du logiciel Matlab (Figure 34) montre que la probabilité d'absorption du fluorophore reste (en théorie) inférieure à 1 pour les mesures EOM pour nos conditions expérimentales (fréquence constante à 76 MHz).

En revanche, pour les conditions du Cavity Dumper la probabilité d'absorption sera très supérieure à 1 quel que soit le DR, donc la fréquence de tir des impulsions. Les mesures avec le Cavity Dumper ont été réalisées pour des Puissances moyennes de 30 à 70 MW et des fréquences < 2 MHz. On atteint donc un effet de saturation de l'absorption multiphoton (probabilité $\gg 1$), comme le montre la Figure 34.

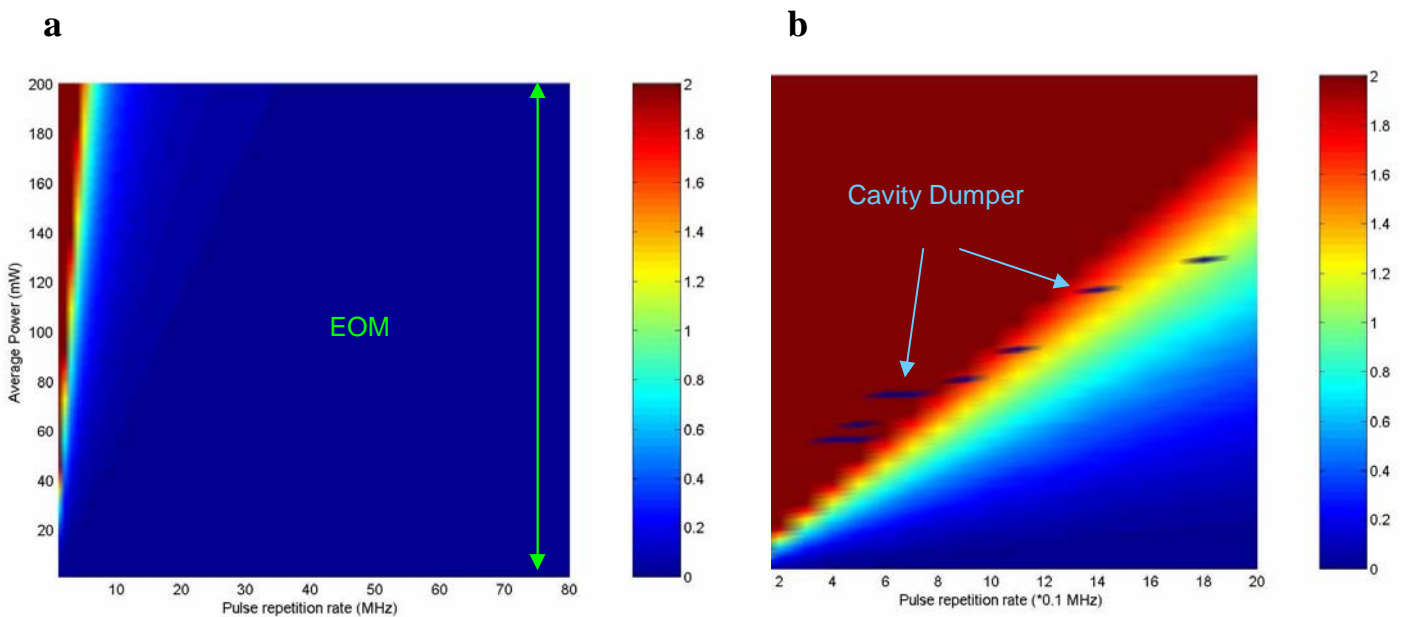


Figure 34 : Probabilité d'absorption multiphoton en fonction de la puissance moyenne et de la fréquence de tir des impulsions. En modulant le faisceau d'excitation au moyen de l'EOM (a) la probabilité d'absorption théorique reste très inférieure à 1. La modulation au moyen du Cavity Dumper (P_{moy} variable de 30 à 70 mW, fréquence de tir < 2 MHz) entraîne une probabilité théorique toujours supérieure à 1 pour nos conditions d'acquisition.

III.1.D.2. Seuils de saturation

Le phénomène de saturation apparaît lorsque la probabilité d'absorption est supérieure à 1, ce qui correspond à une énergie par impulsion supérieure à 10 nJ. Donc, pour une

fréquence fixée, on peut calculer la puissance moyenne à partir de laquelle la saturation apparaîtra (Figure 35). De même, pour une puissance moyenne donnée, la saturation sera atteinte à une fréquence limite. Ainsi, pour les mesures réalisées avec l'EOM, à fréquence constante de 76 MHz, le phénomène de saturation commencerait à apparaître pour une puissance moyenne de 800 mW (\gg puissances expérimentales). Si l'on souhaite travailler avec une puissance moyenne de 20 mW, la fréquence des impulsions doit être supérieure à 2 MHz.

Avec le Cavity Dumper, soit une fréquence de tir < 2 MHz, pour ne pas arriver à saturation, la puissance moyenne aurait dû être inférieure à 25 mW. Or les mesures ont été réalisées avec des Pmoy variables de 30 à 70 mW.

Dans nos conditions expérimentales avec la modulation par EOM, le seuil de saturation n'est jamais atteint. Avec le Cavity Dumper, les conditions d'absorption apparaissent fortement saturées.

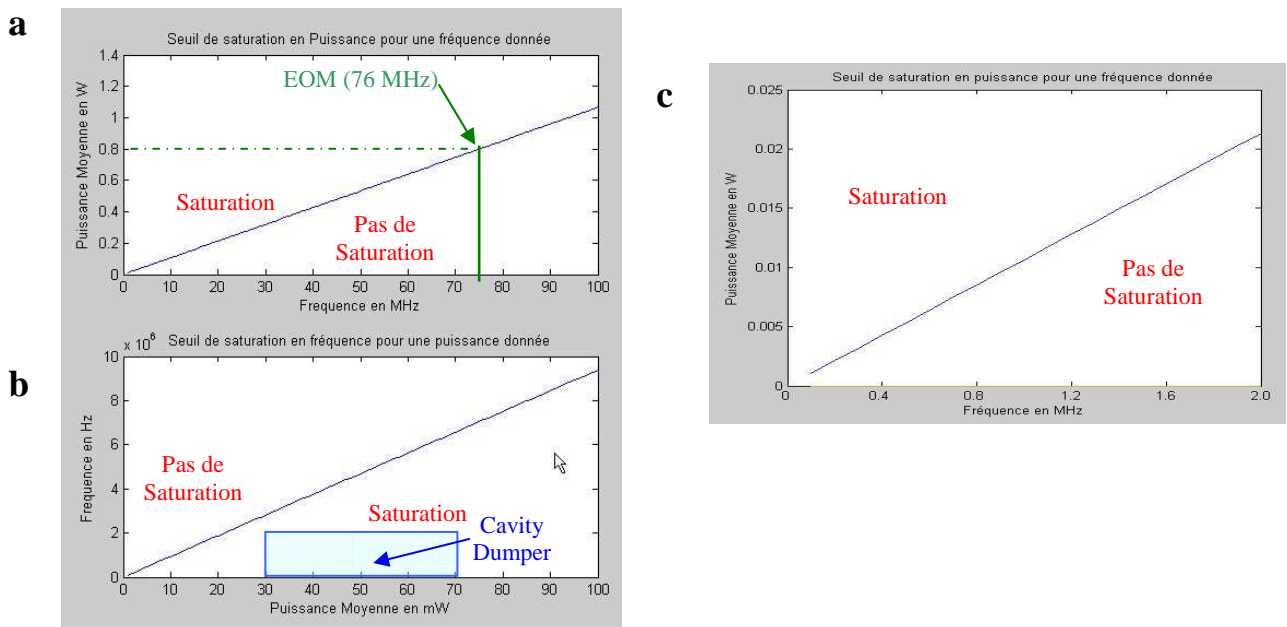


Figure 35 : Seuils de saturation (probabilité d'absorption=1) en fonction de la fréquence de tir des impulsions laser et de la puissance moyenne du faisceau. (a) La modulation avec l'EOM (fréquence de tir constante à 76MHz et Puissance moyenne < 200 mW) n'entraîne pas de conditions de saturation. (b) Avec nos conditions expérimentales lors de l'utilisation du Cavity Dumper (30 mW $<$ Puissance moyenne $<$ 70 mW), le phénomène de saturation est effectif. (c) Avec le Cavity Dumper (fréquence $<$ 2 MHz), il aurait fallu travailler avec une Puissance moyenne inférieure à 25 mW pour ne pas arriver à saturation.

III.1.D.3. Confrontation des résultats expérimentaux et théoriques

Comme nous avons mesuré la puissance moyenne du faisceau d'excitation MP pour chacune des conditions expérimentales, nous pouvons comparer l'efficacité maximale d'absorption n_{exp} avec la probabilité d'absorption théorique n_{th} , en traçant n en fonction de P_{moy} ou $P_{crête}$ (Figure 36). Pour obtenir n_{exp} en fonction de nos données, nous avons divisé la valeur de la pente d'ajustement la plus élevée en valeur absolue par deux, puisque les images sont réalisées à partir de deux acquisitions accumulées, puis par la taille d'un pixel ($2,44 \mu m^2$). Ainsi, $n_{exp} = (-Pente \text{ Min} / (2 * 2,44^{e-6}))$. Nous avons supposé que le phénomène de photoblanchiment était identique lors des deux balayages successifs de l'image.

Avec l'EOM, la probabilité d'absorption 2-Photons mesurée sur les données expérimentales varie de 0.001 à 0.1 et demeure proche de la théorie, en particulier pour les faibles puissances moyennes. L'utilisation du Cavity Dumper met en œuvre des puissances crête beaucoup plus importantes, avec des probabilités d'absorption supérieures à 1 quelle que soit la fréquence de tir (1,8 à 1,4 MHz, 3,7 à 452 kHz) mais très inférieures aux valeurs théoriques attendues (217 à 1,4MHz, 440 à 452 kHz). Un possible effet de saturation permet peut-être d'expliquer ce facteur 100 entre les données théoriques et expérimentales pour le Cavity Dumper, et l'écart pour les puissances élevées de l'EOM.

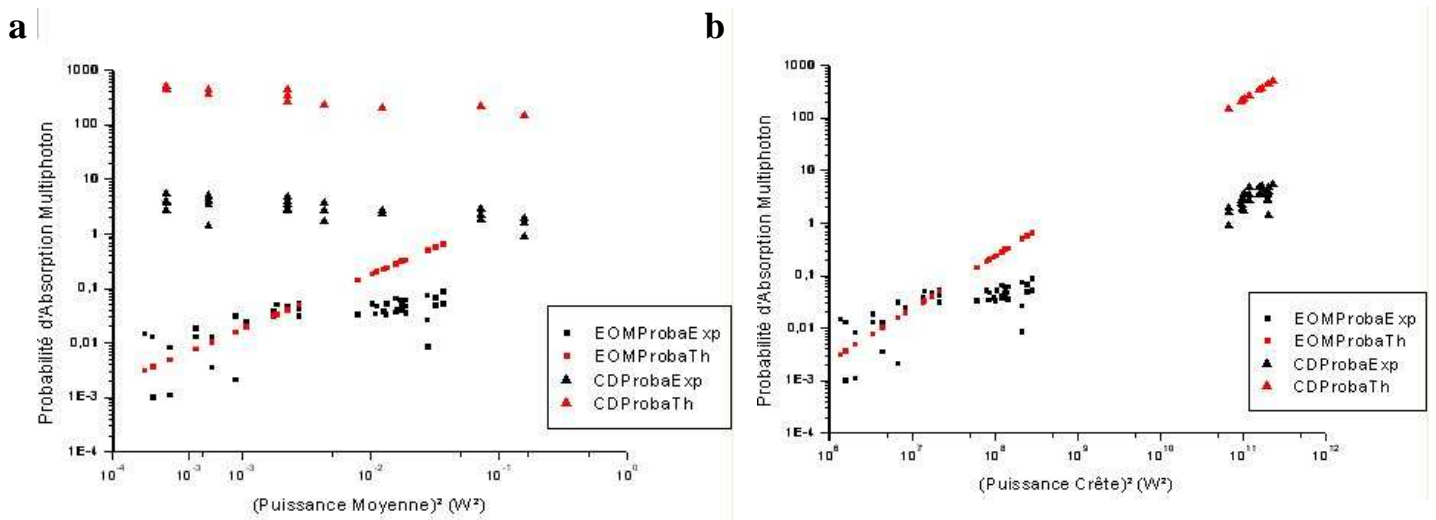


Figure 36 : Probabilité d'absorption multiphoton (théorie – expérience) en fonction de (a) (Puissance Moyenne)² puis (b) (Puissance Crête)². Les mesures expérimentales restent proches des attentes théoriques

à puissance crête faible, pour la modulation avec l'EOM. En revanche, lors de l'utilisation du Cavity Dumper, les mesures sont inférieures aux données attendues.

Un ajustement linéaire des données expérimentales en fonction de $(P_{\text{crête}})^2$ permet de déterminer une valeur plus exacte de $\delta_2 \approx 0,8 \cdot 10^{-2} \text{ GM} \approx 0,8 \cdot 10^{-60} [\text{m}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{photons}^{-1}]$.

III.1.E. Profondeur d'irradiation

Les résultats montrent que la concentration temporelle de l'énergie, par réduction de la fréquence de tir des impulsions, ne nous a pas permis d'imager avec une profondeur d'analyse supérieure qu'avec des impulsions moins énergétiques (Figure 37). Cependant, à puissance moyenne égale, l'ordre de grandeur de la distance atteinte est identique (Données obtenues après normalisation par le nombre d'impulsions). Cela implique qu'avec un nombre réduit d'impulsions, le Cavity Dumper est aussi efficace que l'EOM en terme de profondeur d'illumination.

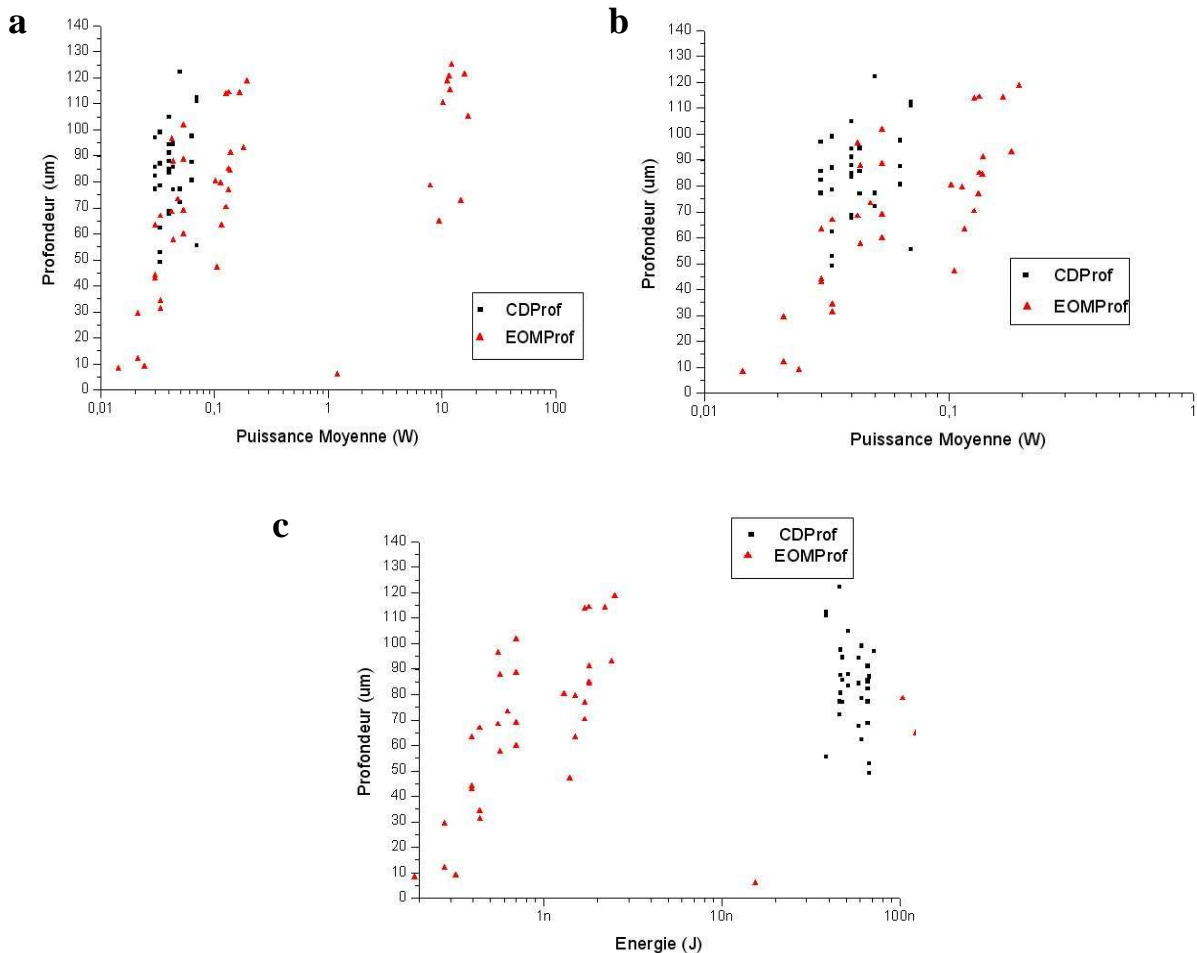


Figure 37 : Profondeur d'analyse en fonction de (a-b) la Puissance moyenne d'excitation, puis (c) de l'énergie d'une impulsion. Les profondeurs atteintes sont équivalentes quel que soit le système de modulation utilisé (EOM ou Cavity Dumper).

En théorie, la fluorescence générée décroît exponentiellement avec la profondeur suivant la loi : $F \propto [P_{av} * \exp(-z/l_s^{(ex)})]^2$, avec P_{av} la puissance moyenne à la surface de l'échantillon, z la profondeur et $l_s^{(ex)}$ la longueur de diffusion à la longueur d'onde d'excitation. En conséquence, la profondeur maximale atteinte varie de la manière suivante : $z_{max} \approx l_s^{(ex)} * \ln[\alpha * P_{moy} * \sqrt{(\Phi(z_{max}) * T/\tau)}]$, avec Φ la fraction de photons de fluorescence détectée, T la période du signal d'excitation, τ la largeur d'une impulsion et α un paramètre dépendant des propriétés intrinsèques du fluorophore et du système de détection [73].

Pour nos mesures avec l'EOM ou le Cavity Dumper, puisque nous avons utilisé le même système de détection, le même échantillon et le même fluorophore, nous pouvons en première approximation considérer α , $\Phi(z_{max})$ et $l_s^{(ex)}$ ($l_s^{(800\text{ nm})}$) comme des constantes. De même la largeur d'une impulsion τ est considérée invariable et égale à 150 fs. Pour les mesures avec l'EOM, la période du signal impulsionnel d'excitation est $T = (1/76^{e6}) \approx 13$ ns, et le seul paramètre variant est P_{moy} . Pour les mesures réalisées au moyen du Cavity Dumper, nous avons modulé à la fois P_{moy} et T .

Pour nos simulations, nous avons dans un premier temps fixé arbitrairement les paramètres supposés constants, soit $l_s^{(800\text{ nm})} = 50 \mu\text{m}$, $\Phi(z_{max}) = 1$ et $\alpha = 1$.

Nous pouvons constater que lorsque le faisceau d'excitation est modulé avec l'EOM, z_{max} croît avec l'augmentation de la puissance moyenne du laser. Avec le Cavity Dumper, la puissance moyenne du faisceau diminue lorsque la période du signal augmente. Comme ces paramètres évoluent en sens inverse, nous nous sommes basés sur nos mesures expérimentales de puissance moyenne en fonction de la période pour calculer z_{max} . Nous pouvons constater que malgré la diminution de la puissance moyenne du faisceau d'excitation, la profondeur d'irradiation reste constante (compensée par l'augmentation de la période du signal impulsionnel). A puissance moyenne équivalente de 50 mW, l'utilisation du Cavity Dumper devrait permettre une irradiation deux fois plus profonde que la modulation par l'EOM (Figure 38).

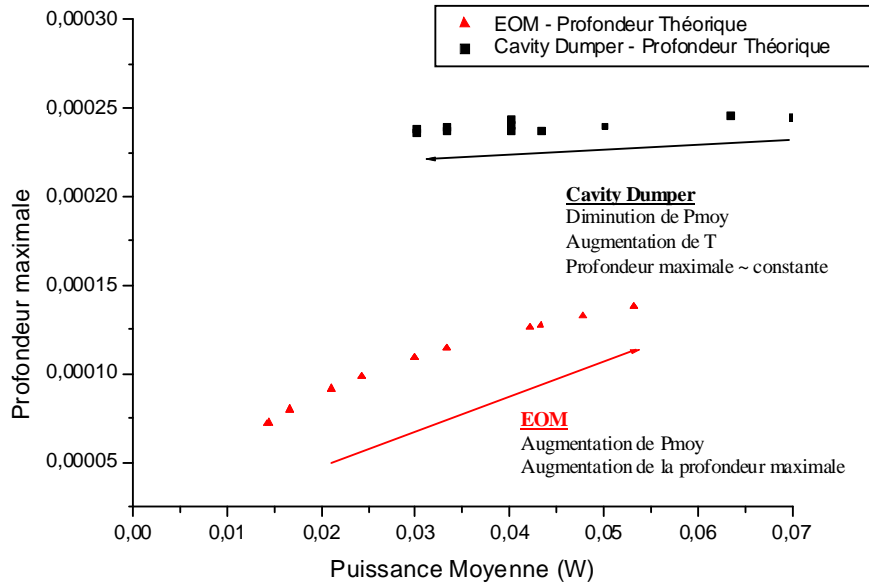


Figure 38 : Evolution de la profondeur maximale d'irradiation (valeurs théoriques calculées) atteinte lorsque le faisceau d'excitation est modulé avec l'EOM ou le Cavity Dumper.

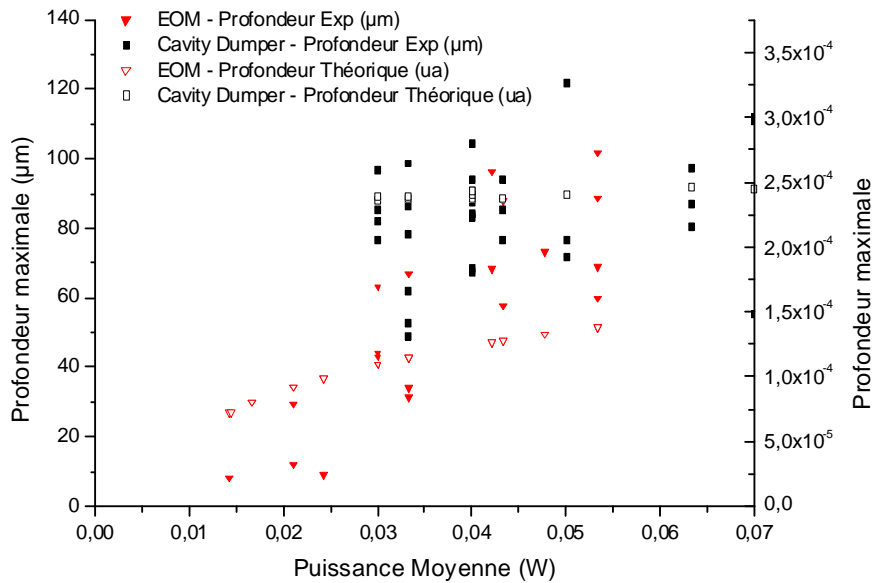


Figure 39 : Evolution de la profondeur maximale d'irradiation (valeurs théoriques calculées et valeurs expérimentales) atteinte lorsque le faisceau d'excitation est modulé avec l'EOM ou le Cavity Dumper.

En représentant les valeurs obtenues expérimentalement et les valeurs théoriques que l'on devrait obtenir pour nos conditions d'excitation sur le même graphique (2 axes des ordonnées différents), la même évolution est notée (Figure 39). Autrement dit, la profondeur d'irradiation augmente avec la Puissance moyenne d'excitation dans le cas d'une modulation avec l'EOM et reste relativement constante avec l'utilisation du Cavity Dumper. En revanche, le facteur 2 que nous aurions dû mesurer à Puissance moyenne équivalente n'est pas effectif. Le gain en profondeur obtenu avec le Cavity Dumper est plus faible que celui attendu.

En outre, ce système (Cavity Dumper) présente l'avantage d'avoir accès à des durées de vie de fluorescence plus longues (55 ns pour un DR30-1,8 MHz, 2,2 μ s pour un DR120-455 kHz contre 13 ns seulement avec l'EOM-76MHz), tout en préservant son aptitude à mesurer des durées de vie courtes.

III.1.F. Influence de la puissance d'excitation sur la mesure des durées de vie de fluorescence

Il a déjà été montré que le phénomène de photoblanchiment entraîne des variations lors de la mesure de courbes de déclin de fluorescence [177].

Etant donné que les fluorophores sont plus soumis au phénomène de photoblanchiment lorsque l'énergie d'excitation est élevée, nous avons observé l'influence de la modulation de puissance au moyen du Cavity Dumper sur ces courbes de déclin.

Nous avons marqué le cytosquelette d'une artère fémorale de lapin au moyen de phalloïdine couplée aux QDots, et les noyaux cellulaires avec du Hoechst. Nous avons procédé à des acquisitions au moyen du logiciel SPCImage pour différentes conditions d'excitation.

Après un ajustement des courbes de déclin (biexponentiel), les valeurs moyennes des constantes de déclin diffèrent peu en fonction des conditions d'excitation. Pour le Hoechst, on obtient une valeur τ_{moyen} proche de 5 ns avec un écart type de 10%. Pour le QDot, on trouve un τ_2 de 14,5 ns avec un écart type de 4%. La Figure 40 représente les courbes de déclin de

fluorescence pour les QDot et le Hoechst en fonction de différents paramètres d'excitation, c'est-à-dire en fonction de la modulation de l'énergie impulsionnelle.

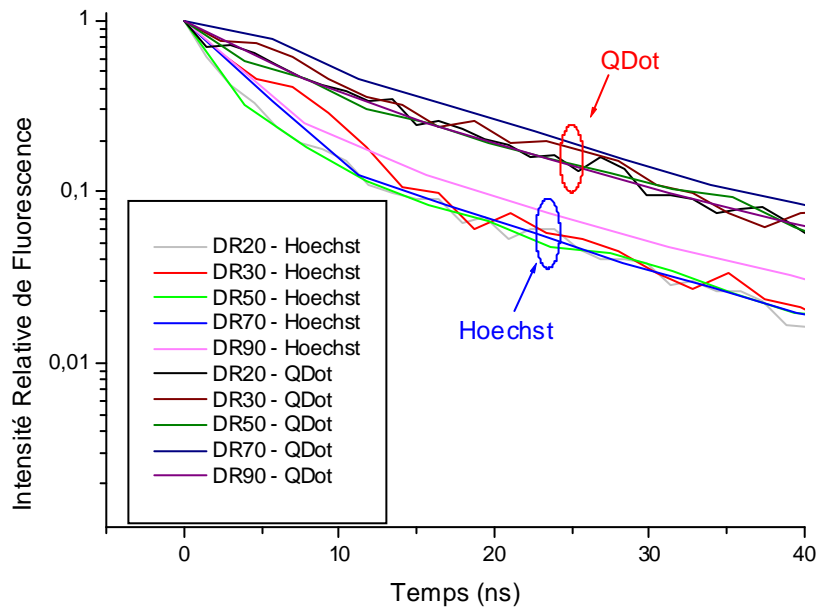


Figure 40 : Courbes de déclin de fluorescence pour deux fluorophores (QDot et Hoechst) en fonction des paramètres d'excitation modulés au moyen du Cavity Dumper. Normalisation des courbes – max = 1. Puissances moyennes du faisceau laser : 102 mW (DR20) ; 69 mW (DR30) ; 45 mW (DR50) ; 36 mW (DR70) ; 30 mW (DR90).

Pour nos mesures, nous avons choisi de fixer la durée d'acquisition. La diminution de la fréquence de tir du faisceau laser au moyen du Cavity Dumper s'accompagne d'une augmentation de la puissance moyenne. Ainsi, pour un même temps d'acquisition, lorsque l'on diminue la fréquence de tir, moins de pulses laser d'excitation sont générés, mais ils sont plus efficaces. Ces deux paramètres (efficacité et nombre) variant en sens inverse, nous n'avons pas observé des phénomènes de photoblanchiment plus importants lors de l'utilisation du Cavity Dumper (pour un DR modulé de 20 à 90).

Ces résultats sont intéressants pour l'imagerie d'échantillons biologiques. En effet, réaliser une mesure plus longue, mais à puissance moyenne réduite permettra de préserver ces échantillons, sans pour autant modifier de manière significative les résultats d'ajustement.

III.1.G. Conclusion

Dans cette étude, nous avons étudié le photoblanchiment de sondes fluorescentes de noyaux cellulaires, relié à l'efficacité d'absorption du fluorophore utilisé (Hoechst), afin de caractériser l'efficacité multiphonique pour différentes énergies impulsionnelles d'excitation.

Pour des impulsions d'énergie comprise entre 188 pJ et 2,5 nJ, obtenues avec un EOM, la probabilité d'absorption reste inférieure à 1, proche des données théoriques.

La concentration temporelle de l'énergie, au moyen du Cavity Dumper, permet d'atteindre des énergies comprises entre 30 et 75 nJ (pour des puissances moyennes du faisceau laser équivalentes à l'EOM), et de multiplier la probabilité d'absorption par un facteur 30. Cependant, pour cette gamme d'énergie, les probabilités d'absorption sur les données expérimentales restent nettement inférieures aux valeurs théoriques.

L'augmentation de la puissance crête des impulsions entraîne très probablement un effet de saturation. A ce niveau d'énergie très élevée, l'éparpillement dans l'espace serait plus important : si l'on suppose la distribution spatiale d'une impulsion gaussienne, plus l'énergie sera élevée, plus la largeur à mi-hauteur de la gaussienne sera importante, d'où une zone d'irradiation élargie.

Concernant la profondeur d'analyse, les deux systèmes présentent la même efficacité à puissance moyenne équivalente, bien que le signal d'extinction de fluorescence engendré par une impulsion d'excitation soit beaucoup plus élevé en surface avec le Cavity Dumper. Cependant, la profondeur d'analyse ne représente pas forcément la profondeur d'irradiation, car elle suppose que l'échantillon soit marqué sur toute la profondeur. Par ailleurs, la profondeur d'analyse varie en fonction de $(P_{\text{moy}} * T)$. Lors de la modulation du faisceau avec l'EOM, il est aisé de comprendre que la profondeur d'irradiation augmente avec la puissance moyenne d'excitation, puisque la période du signal est constante. En revanche, l'utilisation du Cavity Dumper entraîne des variations inverses de ces deux valeurs $(P_{\text{moy}} * T)$, ce qui rend plus difficile cette analyse.

Pour compléter cette étude, il serait intéressant de tester un système générant un train d'impulsions à fréquence comprise entre celles obtenues avec l'EOM et celles du Cavity

Dumper. Par exemple, les lasers femtosecondes de la série t-Pulse (Amplitude Systemes) délivrent des impulsions de longueur d'onde 1 030 nm à une fréquence de 50 MHz et pourraient présenter un intérêt en biologie par un compromis acceptable entre la puissance crête (saturation) et la cadence de tir (temps de déclin accessible).

III.2. Optimisation des Conditions de mesure du signal SHG

Le signal SHG (Génération de Seconde Harmonique) apparaît suite à l'excitation 2-photons de molécules présentant des caractéristiques structurales particulières (pas de centrosymétrie). Ce signal est émis principalement vers l'avant (Figure 41) et la collection du signal se fait de manière générale au moyen d'un objectif présentant une ouverture numérique élevée. La diffusion des lobes de SHG est souvent comparée au rayonnement émis par une antenne et la quantité de signal émise dépend de la susceptibilité non linéaire des molécules imagées.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la partie du rayonnement SHG dans le sens du rayon incident d'excitation (signal 'forward'). Pour une molécule susceptible, la quantité de signal SHG généré dépend des conditions d'excitation et de focalisation du faisceau excitateur (notamment ouverture numérique de l'objectif de focalisation et aire de focalisation). Les conditions d'émission jouent un rôle important également (zone de collection des objectifs, NA et profondeur de champ). Pour optimiser la mesure du signal SHG, il convient de bien choisir les objectifs d'excitation et de collection. Nous avons comparé le signal SHG mesurable en fonction de différentes associations d'objectifs.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la proportion de signal SHG émise dans le sens inverse (signal 'backward') au rayon incident d'excitation (Figure 41). Pour cela, nous avons utilisé les détecteurs NDD équipant le système du laboratoire. Nous avons étudié l'influence de ce signal sur les ajustements des courbes de déclin de fluorescence. Cependant, il est à noter que le signal ainsi collecté est composé d'une part du signal SHG directement émis vers l'arrière qui peu révéler des structures différentes s'il est comparé au signal 'forward'. D'autre part, en fonction des tissus imagés, la contribution du signal 'forward' qui est rétrodiffusé contribue fortement au signal total collectable avec ce mode de détection.

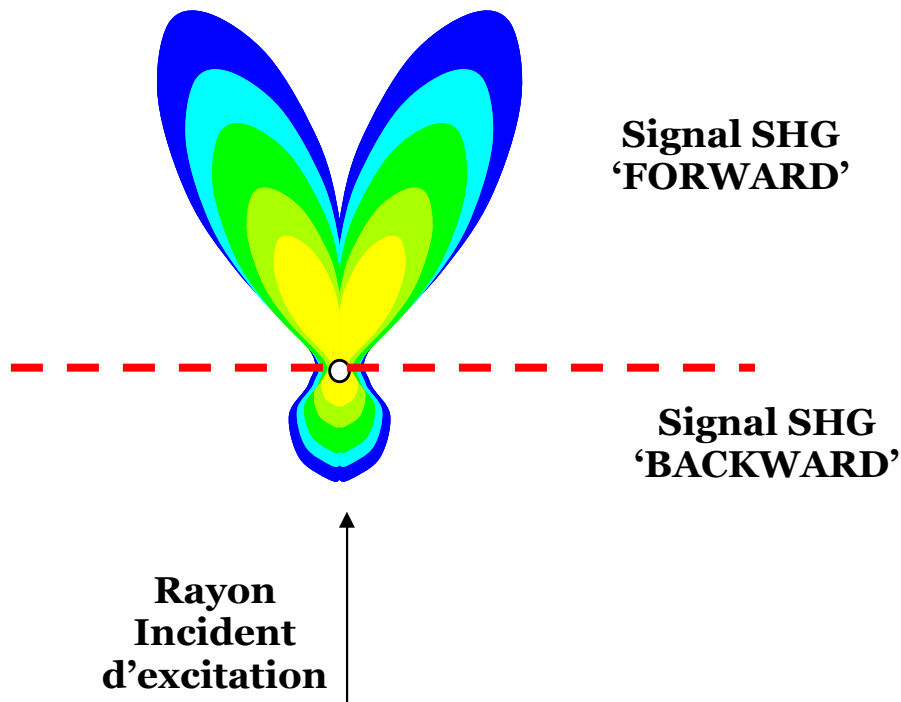


Figure 41 : Représentation des différentes zones de collection du signal SHG ('Forward' et 'Backward'). Le signal 'FORWARD' correspond au signal SHG diffusé dans le sens du rayon incident d'excitation. Le signal 'BACKWARD' correspond au signal émis dans le sens inverse.

III.2.A. Mesures expérimentales

Pour ces expériences, nous avons travaillé avec un échantillon de peau de souris Nude que nous avons excité en mode multiphoton à 800 nm. La puissance moyenne du faisceau était de 270 mW, correspondant à une énergie de 3,55 nJ par impulsion ($F=76$ MHz). Nous avons réalisé des séries d'images en z, 20 coupes avec un pas variable.

Concernant l'optique, le faisceau a été focalisé au moyen de deux objectifs différents (x10 et x20) dont nous disposons et dont les caractéristiques sont résumées dans le Tableau 6. L'objectif x40 a été utilisé pour la collection du signal SHG au travers d'un filtre passe-bande à 400 nm.

La quantité de signal SHG collecté dépend fortement de la position (hauteur) de l'objectif de collection. Pour ces expériences, nous avons choisi de garder une position constante de l'objectif d'excitation par rapport à l'échantillon, et de faire varier la hauteur de

l'objectif de collection. Nous avons pris comme référence pour nos mesures la hauteur du plateau sur lequel est fixé l'objectif (Figure 42).

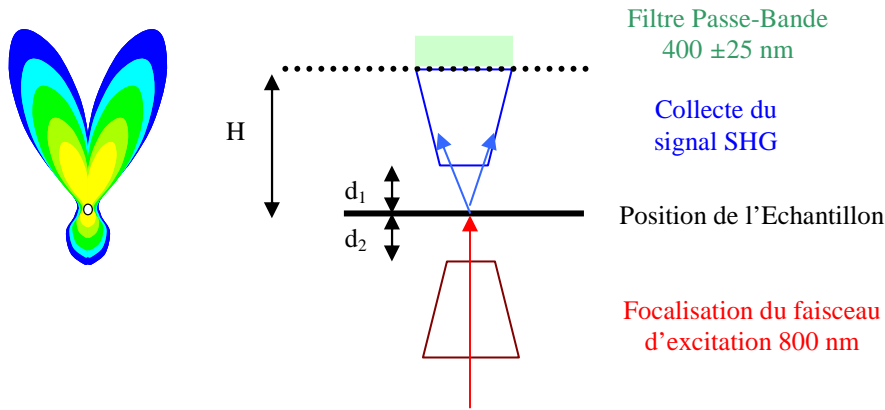


Figure 42 : Schéma du système optique utilisé. Le faisceau d'excitation à 800 nm est focalisé au moyen d'un objectif sur un échantillon de peau, la distance d_2 entre l'objectif d'excitation et l'échantillon est maintenue constante. L'objectif de collection du signal SHG a été déplacé (variation de la distance H et donc de d_1).

	Free Working Distance (μm)	Résolution (nm)		NA	Alpha ($^\circ$)	Profondeur de champ (μm)	Angle SHG($^\circ$) = Alpha/racine(2)
		xy	z				
HC PL FLUOTAR 10X 0,3 DRY	11 000	651	4 768	0,30	17	4,34	12
HC PL APCS 20X 0,7 DRY	590	279	768	0,70	44	0,70	31
HCX APO L 40X 0,8 W	3 300	244	821	0,80	37	0,75	26

Tableau 6 : Caractéristiques des différents objectifs utilisés pour la focalisation du faisceau d'excitation et pour la collection du signal SHG.

III.2.A.1. Collection du signal SHG au travers de l'objectif x40 – Focalisation du faisceau d'excitation Objectif x10

III.2.A.1.1. Expérience a

Pour notre première série de mesures, l'acquisition des images est faite entre les plans -4390 et -3085 μm correspond à 20 sections et un pas de 65 μm . Nous avons tout d'abord observé le plan correspondant à -3803 μm et tracé la projection sur l'axe des abscisses de l'image. Nous avons répété ce procédé pour 4 distances différentes de l'objectif de collection (Figure 43). En parallèle, nous avons mesuré l'intensité totale de l'image en fonction de la distance de l'objectif de collection. Nous pouvons constater qu'avec cette configuration optique (Excitation Objectif x20, NA=0,7 et Collection Objectif x40, NA=0,8), le maximum de signal SHG est collecté lorsque le plateau se situe à une distance de 4,9cm par rapport à l'échantillon. Lorsque l'on s'éloigne de part et d'autre (rapprochement ou éloignement de l'échantillon) de cette position optimale, le signal collecté décroît fortement.

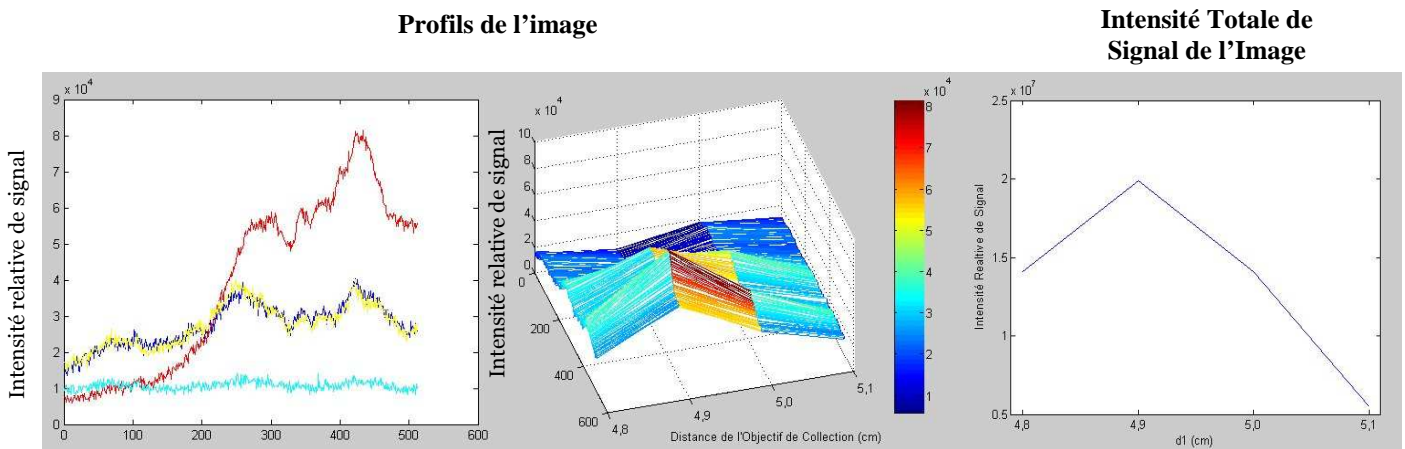


Figure 43 : Profils des images SHG pour le plan -3803 μm en fonction de la position de l'objectif de collection. Objectif d'excitation x10 (NA=0,3). Objectif de collection x40 (NA=0,8). Intensité totale du signal de l'image. Expérience a.

III.2.A.1.2. Expérience b

Nous avons renouvelé cette expérience sur une zone différente de l'échantillon et procédé à une acquisition d'images entre les plans -4186 et -4313 μm (soit 20 sections avec un pas de 6 μm). L'observation du plan à -4243 μm entraîne les mêmes constatations que

précédemment avec cette configuration d'objectifs, soit une collection maximale pour une distance du plateau de 4,9 cm (Figure 44).

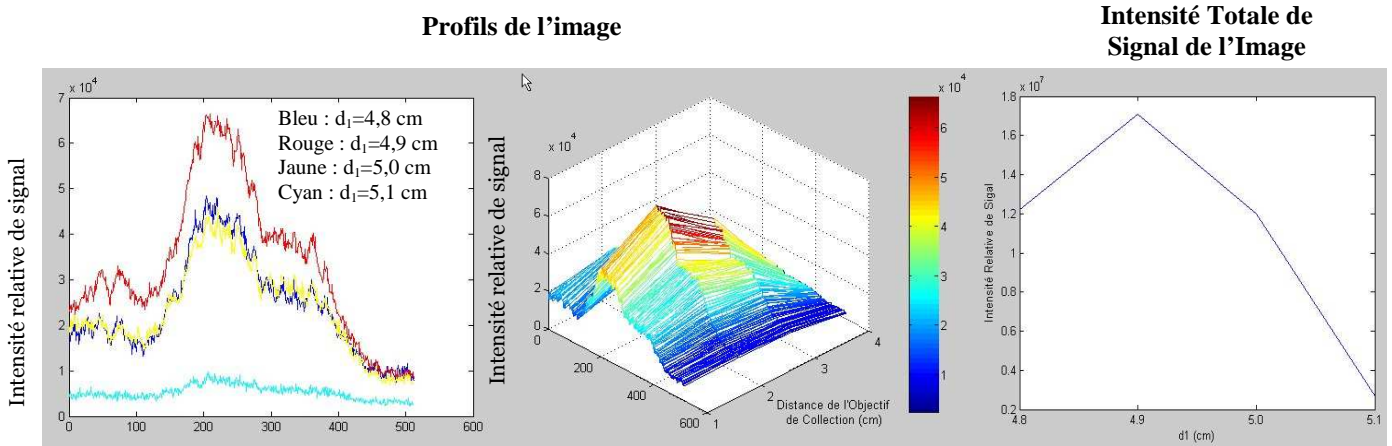


Figure 44 : Profils des images SHG pour le plan $-4243 \mu\text{m}$ en fonction de la position de l'objectif de collection. Objectif d'excitation $\times 10$ ($\text{NA}=0,3$). Objectif de collection $\times 40$ ($\text{NA}=0,8$). Intensité totale du signal de l'image. Expérience b.

III.2.A.1.3. Expérience c

Enfin, nous avons réalisé une troisième série de mesures avec la combinaison de l'objectif $\times 40$ (Collection) et l'objectif $\times 10$ (Excitation). La série en z a été bornée par les plans -4295 et $-4336 \mu\text{m}$ (20 sections, pas de $10 \mu\text{m}$). Nous avons observé plus précisément le plan $-4336 \mu\text{m}$. Le maximum de collection est toujours effectif lorsque le plateau se situe à une distance de 4,9 cm, avec une décroissance de part et d'autre de cette position optimale (Figure 45).

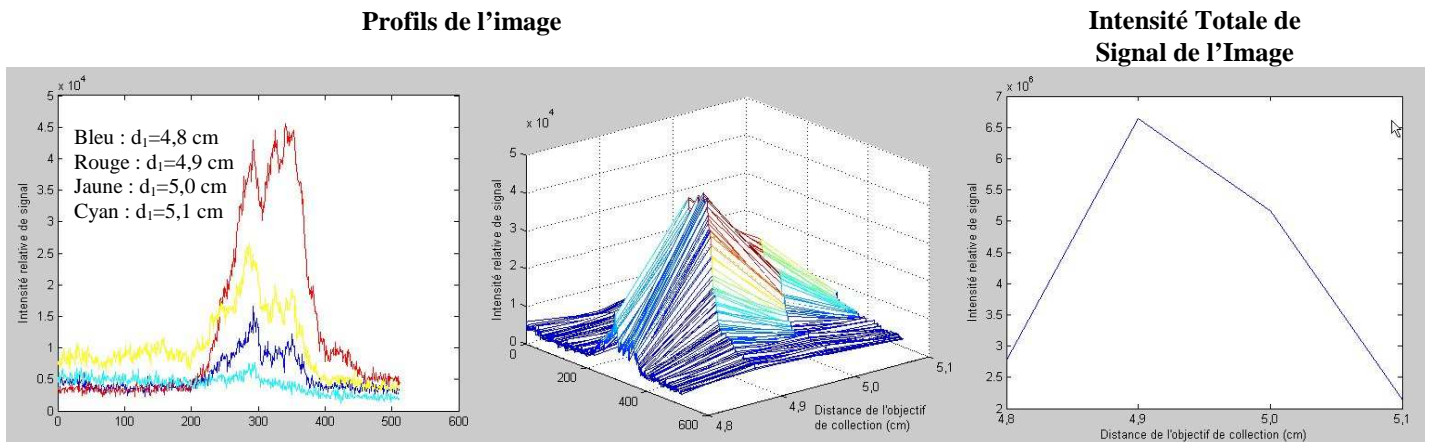


Figure 45 : Profils des images SHG pour le plan $-4336 \mu\text{m}$ en fonction de la position de l'objectif de collection. Objectif d'excitation $\times 10$ ($\text{NA}=0,3$). Objectif de collection $\times 40$ ($\text{NA}=0,8$). Intensité totale du signal de l'image. Expérience c.

III.2.A.1.4. Comparaison des 3 expériences

En traçant les profils en profondeur pour ces trois expériences, on peut constater que le signal le plus important est toujours mesuré pour une distance du plateau de 4,9 cm, quelle que soit la profondeur dans l'échantillon à laquelle on se situe (Figure 46).

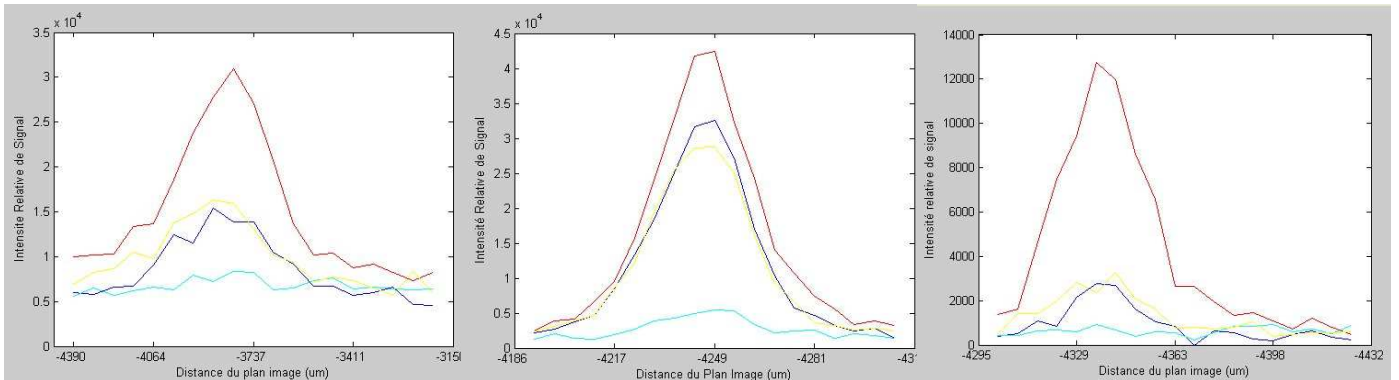


Figure 46 : Profils en profondeur pour des régions d'intérêt sélectionnées sur trois zones différentes de l'échantillon de peau en fonction de la position de l'objectif de collection. Bleu : $d_1=4,8$ cm ; Rouge : $d_1=4,9$ cm ; Jaune : $d_1=5,0$ cm ; Cyan : $d_1=5,1$ cm. Objectif d'excitation x10 (NA=0,3). Objectif de collection x40 (NA=0,8).

III.2.A.2. Collection du signal SHG au travers de l'objectif x40 – Focalisation du faisceau d'excitation Objectif x20

III.2.A.2.1. Expérience a

Pour la première série de mesures, l'acquisition des images est faite entre les plans -4135 et -4435 μm , correspondant à 20 sections avec un pas de 15 μm . On remarque que dans un premier temps le signal SHG augmente lorsque l'on éloigne l'objectif de collection pour passer par un maximum et redevenir nul. Avec l'objectif x40, la position de collection maximale de signal correspond à une distance du plateau de 5 cm.

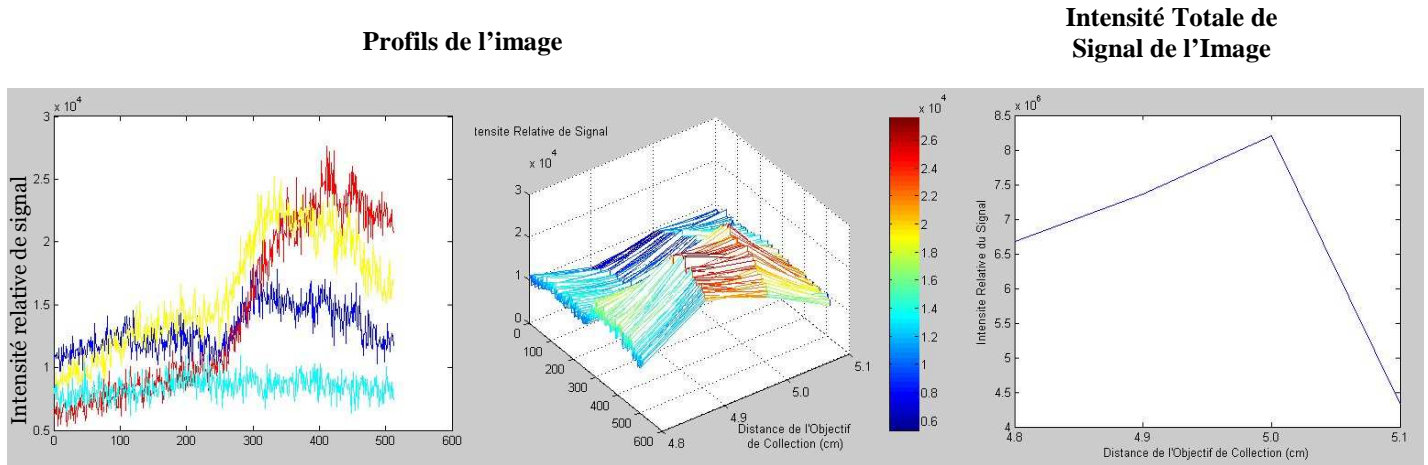


Figure 47 : Profils des images SHG pour le plan $-4225 \mu\text{m}$ en fonction de la position de l'objectif de collection. Objectif d'excitation x20 (NA=0,7). Objectif de collection x40 (NA=0,8). Intensité totale du signal de l'image. Expérience a.

III.2.A.2.2. Expérience b

Pour une seconde zone de l'échantillon, nous avons acquis des images entre les plans -4045 et $-4182 \mu\text{m}$ (soit 20 sections avec un pas de $6,8 \mu\text{m}$). De la même manière, nous avons observé le plan à $-4120 \mu\text{m}$ et collecté un maximum de signal lorsque le plateau se situe à une distance de 5 cm (Figure 48).

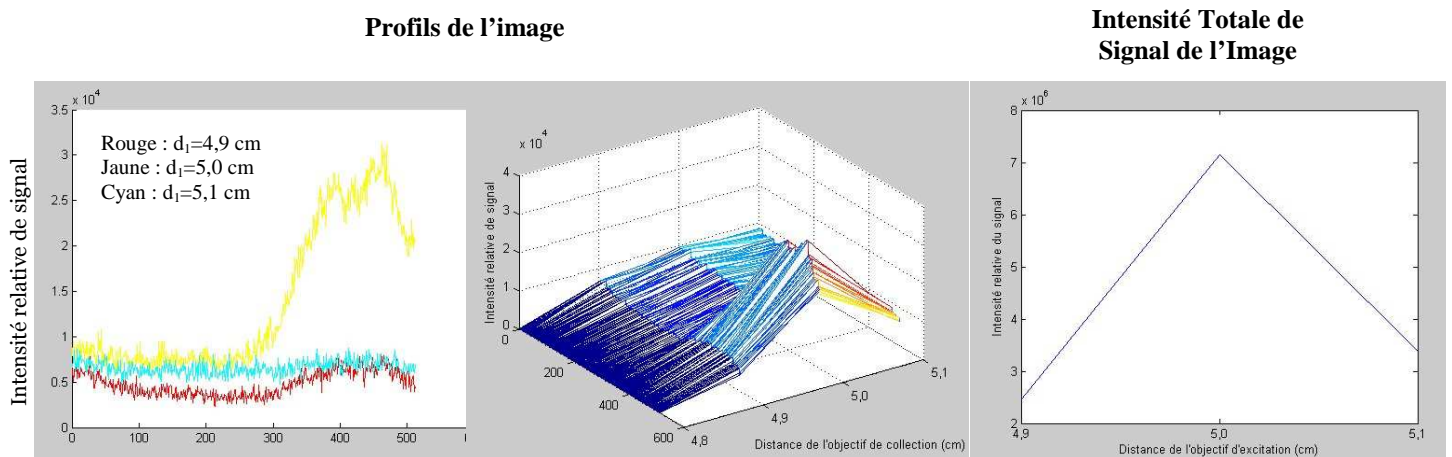


Figure 48 : Profils des images SHG pour le plan $-4120 \mu\text{m}$ en fonction de la position de l'objectif de collection. Objectif d'excitation x20 (NA=0,7). Objectif de collection x40 (NA=0,8). Intensité totale du signal de l'image. Expérience b.

III.2.A.2.3. Expérience c

Pour notre troisième série de mesures, l'acquisition des images est faite entre les plans -4045 et -4182 μm (20sections avec un pas de 6,85 μm). Comme précédemment, la quantité de signal collecté croît dans un premier temps avec l'éloignement de l'objectif de collection, passe par son maximum (distance du plateau = 5 cm), puis retend à diminuer (Figure 49).

Profils de l'image

Intensité Totale de Signal de l'Image

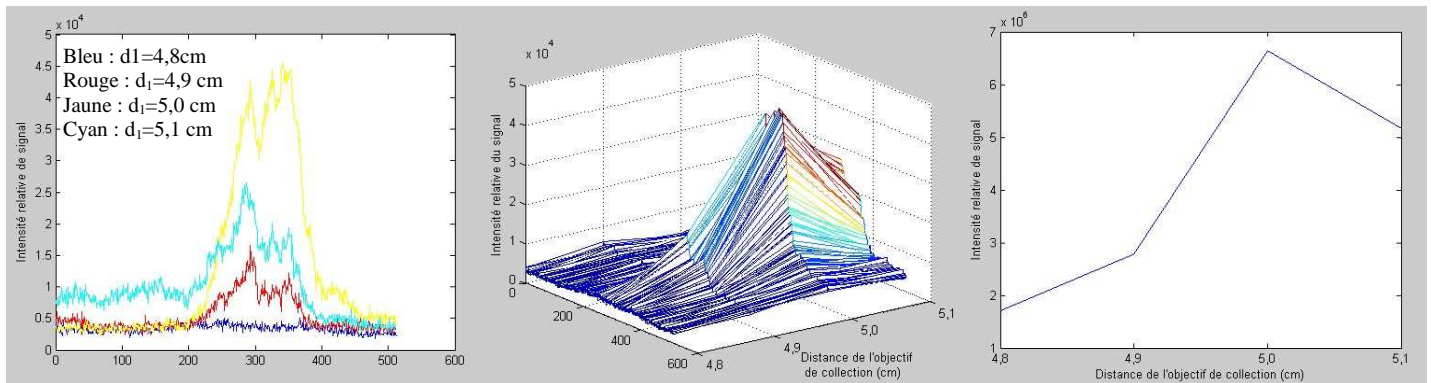


Figure 49 : Profils des images SHG pour le plan -4120 μm en fonction de la position de l'objectif de collection. Objectif d'excitation x20 (NA=0,7). Objectif de collection x40 (NA=0,8). Intensité totale du signal de l'image. Expérience c.

III.2.A.2.4. Comparaison des 3 expériences

Comme dans le cas d'une excitation avec l'objectif x10, quelle que soit la profondeur à laquelle on se situe dans l'échantillon, le maximum de signal est mesuré pour une position donnée de l'objectif de collection : 5 cm pour une excitation avec l'objectif x20 (Figure 50).

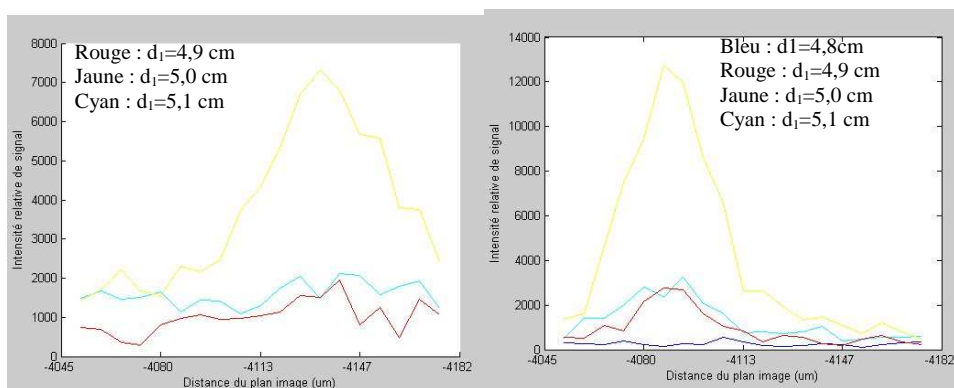


Figure 50 : Profils en profondeur pour des régions d'intérêt sélectionnées sur deux zones différentes de l'échantillon de peau en fonction de la position de l'objectif de collection. Objectif d'excitation x20 (NA=0,7). Objectif de collection x40 (NA=0,8).

Pour la suite, nous avons supposé que la position pour laquelle la collection du signal est maximale correspond au plan focal de l'objectif de collection.

III.2.A.3. Collection du signal SHG au travers de l'objectif x40. Comparaison des résultats obtenus selon l'objectif d'excitation

Nous avons mesuré pour chaque configuration de mesure du signal SHG (combinaison d'objectifs), et pour chaque distance de l'objectif de collection le rapport du signal mesuré par rapport au signal maximal (H=5,0 cm pour une excitation objectif x10 ; H=4,9 cm pour une excitation objectif x20) sur des Régions d'Intérêt de 25*25 pixels. L'éloignement de la position maximale de collection a beaucoup plus d'influence dans le cas d'une excitation avec l'objectif x20, NA=0,7, puisqu'un déplacement de 1 mm du plateau fait perdre jusqu'à 75% du signal. En revanche pour une excitation avec l'objectif x10, un déplacement de 1 mm de la position optimale permet de collecter encore aux alentours de 70% du signal. Etant donné que la même optique de détection du signal SHG a été utilisée, nous avons supposé que cette différence dans la perte de signal provenait d'une propagation différente du signal.

Distance Plateau (cm)	4,8	4,9	5	5,1
Collection objectif x40 (NA=0,8)				
Excitation objectif x10 (NA=0,3)				
Moyenne du rapport (%)	67,7	100	71,3	17,1
Ecart Type (%)	22		12	23
Excitation objectif x20 (NA=0,7)				
Moyenne du rapport (%)	20,9	44,7	100	24,5
Ecart Type (%)	33	45		11

Tableau 7 : Rapport de l'intensité du signal par rapport au signal maximal mesuré en fonction de la distance de l'objectif de collection. Excitation MP 800 nm, objectif x40, NA=0,8. Objectif de Collection x20, NA=0,7 ou x10, NA=0,3.

III.2.B. Théorie – Propagation du signal SHG en fonction des objectifs d'excitation et de collection du signal

Une des théories par rapport à la diffusion du signal SHG est que l'angle des lobes par rapport à la direction d'excitation dépend fortement de l'ouverture numérique de l'objectif de focalisation du faisceau d'excitation [178]. Cet angle serait égal à $\theta/\sqrt{2}$ avec θ le demi-angle

d'ouverture ($\theta = \sin^{-1}(NA)/n$), soit 31° , 12° et 26° respectivement pour nos objectifs x20, x10 et x40. Par ailleurs la zone de collection de signal dépend de la distance de travail des objectifs ainsi que de leur ouverture numérique. La Figure 51 permet de représenter schématiquement la direction du signal SHG en fonction de l'objectif d'excitation et les zones de collection des différents objectifs.

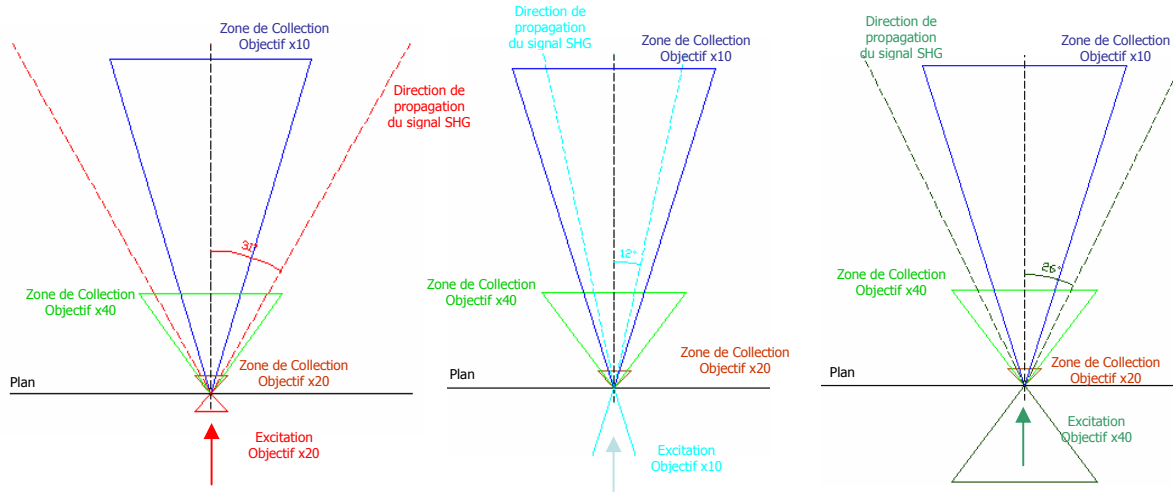


Figure 51 : Représentation des directions de propagation du signal SHG en fonction de l'objectif d'excitation et représentation des zones de collection des différents objectifs utilisés (x10, NA=0,3 ; x20, NA=0,7 ; x40, NA=0,8).

Pour chaque configuration, le fait de déplacer l'objectif de collection permet de décaler la zone de collection (Figure 52 et Figure 53). Nous pouvons constater lorsqu'on déplace l'objectif de collection (x40) vers le haut, l'axe de propagation du signal SHG après excitation au moyen de l'objectif x10 reste dans la zone de collection. En revanche, l'écart par rapport à l'axe de propagation SHG suivant une focalisation de l'excitation avec l'objectif x20 est beaucoup plus important.

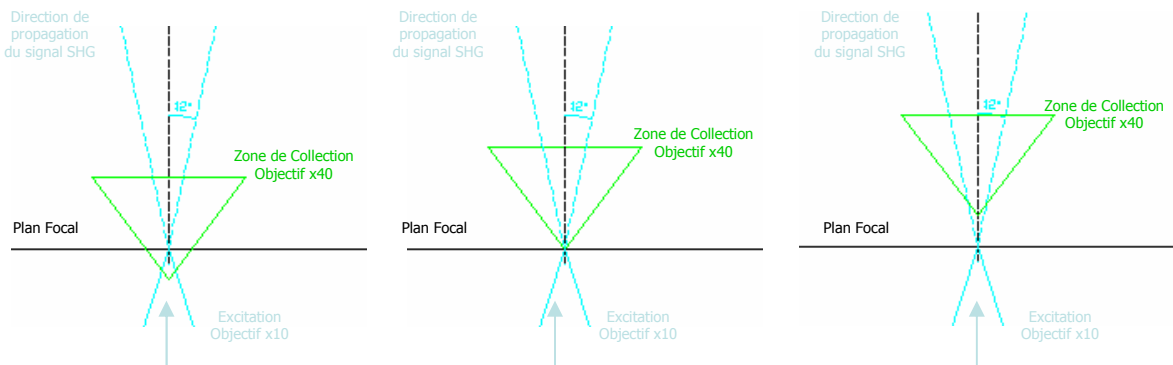


Figure 52 : Représentation de la direction de propagation du signal SHG après une focalisation du faisceau d'excitation au moyen d'un objectif x10, NA=0,3. Représentation des zones de collection de l'objectif x40, NA=0,8 en fonction de sa position en z.

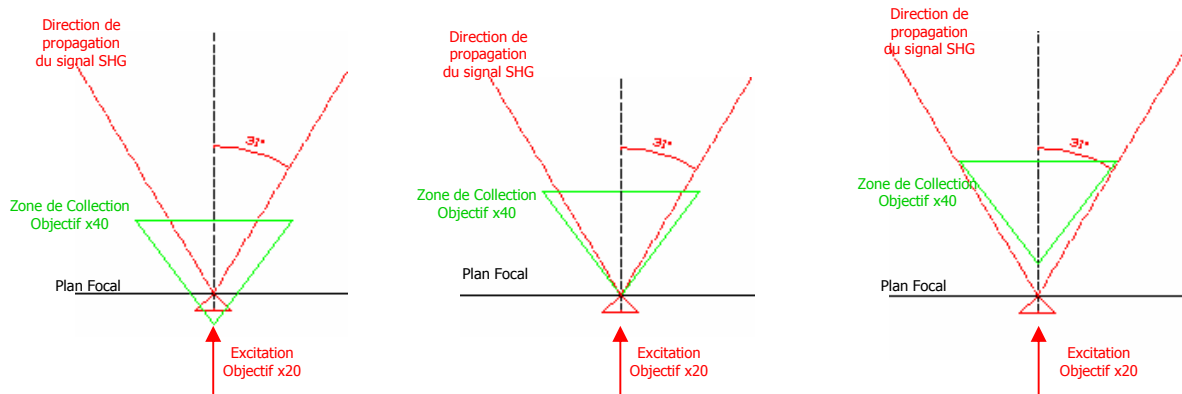


Figure 53 : Représentation de la direction de propagation du signal SHG après une focalisation du faisceau d’excitation au moyen d’un objectif x20, NA=0,7. Représentation des zones de collection de l’objectif x40, NA=0,8 en fonction de sa position en z.

Si dans un premier temps, on suppose que l’intensité du signal SHG suit une loi décroissante suivant l’axe de propagation, on peut intégrer le signal sur la portion de l’axe comprise dans la zone de collection. Puis on calcule le rapport du signal obtenu à 1 mm du plan focal sur le signal obtenu au niveau du plan focal. De cette manière, nous pouvons comparer les valeurs théoriques avec les valeurs mesurées. En observant le schéma obtenu pour une excitation avec l’objectif x20 et une collection au travers de l’objectif x40, à 1 mm du plan focal le signal mesuré serait nul si le signal SHG ne diffuserait que sur l’axe de propagation (Figure 53).

Or, le rayonnement SHG est souvent comparé au diagramme de rayonnement d’une antenne, variant suivant une loi sinus cardinal. En optant pour une représentation en coordonnées polaires dans l’espace 3D, cette loi est :

Energie(r,θ,φ)=(L*I*sinc(π*L*(sinφ)*(cosθ)/ λ)*sinc(π *I*(sinθ)/λ))/(λ *r), loi comparable à la théorie de la diffraction avec $r=\sqrt{(x^2+y^2+z^2)}$; $\varphi=\text{atan}(y/x)+\pi*(-x)*\text{sign}(y)$ et $\theta=\text{acos}(z/r)$.

La théorie de la diffraction n’est valable que dans les conditions où l’approximation de Fraunhofer est vérifiée ($NF= \rho^2 / \lambda z \ll 1$ avec $\rho = \sqrt{(x^2+y^2)}$). Ici, pour $x=y=1 \mu\text{m}$, $\lambda=800 \text{ nm}$ et $z=3000 \mu\text{m}$ $NF= 7,5e^{-4}$. Nous avons redéfini un nouveau système de coordonnées, x suivant l’axe de propagation du signal SHG, y perpendiculaire à x dans le plan représenté, et z la troisième coordonnée orthonormale (Figure 54). La plus grande partie du signal est concentrée sur l’axe de propagation et peut être mesurée de part et d’autre de cet axe sur

plusieurs centaines de μm , ce qui explique pourquoi, même si l'axe de propagation ne se situe pas directement dans la zone de collection une partie du signal a pu être mesurée.

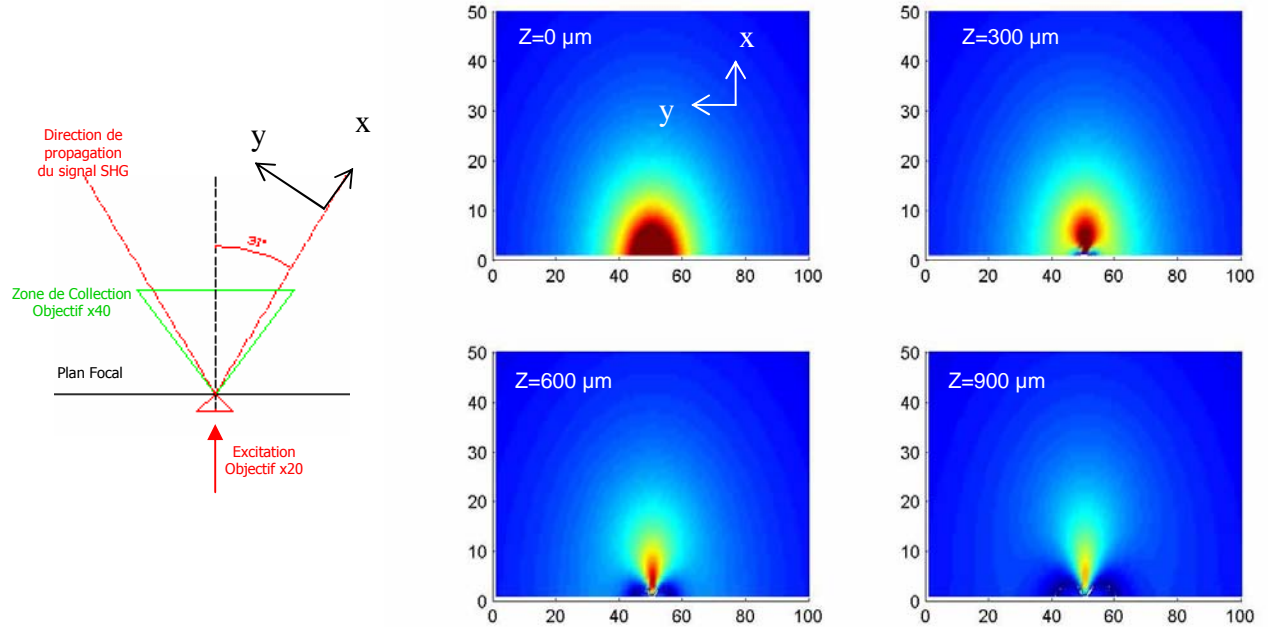


Figure 54 : Représentation des lobes de diffusion du signal de SHG suivant l'axe de propagation. L'unité pour la matrice correspond à $100 \mu\text{m}$. Un nouveau système de coordonnées a été utilisé de manière à ce que la direction principale d'un lobe du rayonnement suive l'axe des x et varie en sinus cardinal suivant cet axe.

Pour achever la modélisation, nous devons tenir compte de la dépendance de la quantité de signal SHG généré avec l'aire de focalisation. En effet, le signal SHG est proportionnel à la quantité $[\mathbf{p}/\mathbf{a}\tau]^2 * \tau(\chi^2)^2 \mathbf{a}$, avec p : énergie du pulse ; a : aire du point focal ; χ^2 : facteur de susceptibilité non linéaire des molécules excitées et τ : largeur du pulse laser. Le seul paramètre variable dans cette expérience est l'aire de focalisation que nous avons déterminée (Tableau 8) en nous basant sur la formule décrite dans la Figure 55.

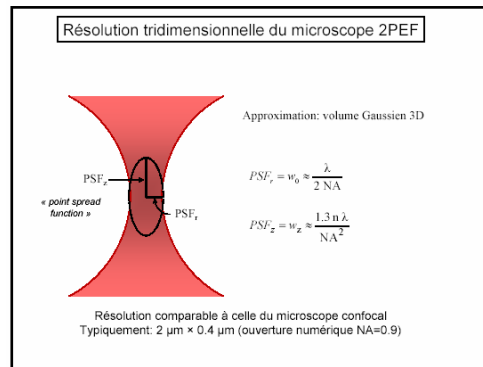


Figure 55 : Détermination de l’aire de focalisation du faisceau d’excitation en fonction de la longueur d’onde et de l’ouverture numérique de l’objectif d’excitation.

	λ (nm)	NA	n	w_r (μm)	w_z (μm)	Aire de focalisation (μm^2)
HC PL FLUOTAR 10X 0,3 DRY	800	0,3	1	1,3	11,5	47,0
HC PL APCS 20X 0,7 DRY	800	0,7	1	0,57	2,12	3,8
HCX APO L 40X 0,8 W	800	0,8	1,33	0,5	2,16	3,39

Tableau 8 : Détermination de l’aire de focalisation pour une longueur d’onde de 800 nm.

Le signal SHG généré étant inversement proportionnel à l’aire de focalisation, et en prenant comme référence $S_{\text{SHG}40}$, le signal obtenu en excitant l’échantillon avec l’objectif x40, on obtiendra un signal $S_{\text{SHG}20} = 0,89 * S_{\text{SHG}40}$, en excitant avec l’objectif x20 (NA=0,7) et un signal $S_{\text{SHG}10} = 0,0722 * S_{\text{SHG}40}$, en excitant avec l’objectif x10 (NA=0,3).

III.2.C. Confrontation des mesures expérimentales avec la théorie

La quantité de signal perdu lorsque l’on s’éloigne de la position optimale de collection du signal SHG dépend de l’angle que fait l’axe de propagation du signal SHG avec la verticale, mais aussi de la loi de propagation du signal SHG. Pour confronter cette simulation avec les mesures expérimentales, nous avons intégré le signal sur les lobes pour $z = 0 \mu\text{m}$ de la manière suivante :

- $I_{collectée}$ = Somme des valeurs matricielles situées au niveau de la zone de collection de l'objectif
- I_{totale} = Somme des intensités sur la totalité de la matrice
- Rapport $I_{collectée} / I_{totale}$

En supposant que le maximum de signal est mesuré au niveau du plan focal, nous avons obtenu les résultats transcrits dans le Tableau 9.

	Objectif d'Excitation	HC PL FLUOTAR 10X 0,3 DRY	HC PL APCS 20X 0,7 DRY	HGX APO L 40X 0,8 W
Objectif de Collection	Position de l'objectif de Collection			
HC PL FLUOTAR 10X 0,3 DRY	Plan Focal - 1 mm		0%	12%
	Plan Focal		100%	100%
	Plan Focal +1 mm		0%	0%
HC PL APCS 20X 0,7 DRY	Plan Focal - 1 mm	0%		0%
	Plan Focal	100%		100%
	Plan Focal +1 mm	40%		5%
HGX APO L 40X 0,8 W	Plan Focal - 1 mm	99%	86%	
	Plan Focal	100%	100%	
	Plan Focal +1 mm	43%	37%	

Tableau 9 : Quantité de signal SHG collecté en fonction de la position de l'objectif de collection en supposant une propagation du signal SHG similaire au rayonnement d'une antenne (lobe de diffraction suivant une loi sinus cardinal).

Nos mesures n'ont concerné que la collection avec l'objectif x40 et dans tous les cas, la proportion de signal mesuré suite au déplacement de l'objectif de collection est plus faible que celle attendue (Tableau 10). Mais puisque la baisse de la fraction de signal mesuré en fonction de l'éloignement de la position optimale de collection n'est pas la même lorsque l'on excite l'échantillon au moyen de deux objectifs différents, elle confirme la dépendance de l'axe de propagation du signal SHG avec l'ouverture numérique de l'objectif d'excitation.

	Objectif d'Excitation	HC PL FLUOTAR 10X 0,3 DRY	HC PL APCS 20X 0,7 DRY
Objectif de Collection	Position de l'objectif de Collection		
HCX APO L 40X 0,8 W Théorie	Plan Focal - 1 mm	99%	86%
	Plan Focal	100%	100%
	Plan Focal +1 mm	43%	37%
HCX APO L 40X 0,8 W Mesures Expérimentales	Plan Focal - 1 mm	68%	45%
	Plan Focal	100%	100%
	Plan Focal +1 mm	71%	25%

Tableau 10 : Quantité de signal SHG collecté en fonction de la position de l'objectif de collection en supposant une propagation du signal SHG similaire au rayonnement d'une antenne (lobe de diffraction suivant une loi sinus cardinal). Confrontation des résultats théoriques et des mesures expérimentales pour une collection avec l'objectif x40.

Si à présent on tient compte de l'aire de focalisation de l'excitation, les quantités maximales de signal que l'on peut collecter en combinant différemment les objectifs sont très contraignantes (Tableau 11).

Objectif d'Excitation	HC PL FLUOTAR 10X 0,3 DRY	HC PL APCS 20X 0,7 DRY	HCX APO L 40X 0,8 W
Objectif de Collection			
HC PL FLUOTAR 10X 0,3 DRY		<1%	<1%
HC PL APCS 20X 0,7 DRY	<1%		~10%
HCX APO L 40X 0,8 W	~4%	~49%	

Tableau 11 : Quantité maximale de signal SHG pouvant être mesuré en combinant les différents objectifs, en supposant l'aire de focalisation optimale pour une excitation avec l'objectif x40.

Lorsque le signal généré est très intense (comme dans le cas du collagène de la peau), la faible quantité collectée nous a suffi pour réaliser une image en excitant l'échantillon avec l'objectif x10. Mais dans le cas d'un faible signal, l'optimisation passerait par l'utilisation de l'objectif x20 pour l'excitation de l'échantillon et de l'objectif x40 pour la collection du signal SHG. De plus l'objectif x40 présentant une distance de travail importante, et comme le signal SHG est collecté dans le sens du rayon incident (objectif au dessus de l'échantillon), son utilisation permet l'imagerie d'échantillons plus épais.

Il est à noter cependant que l'approximation du diagramme de rayonnement, représentant la répartition énergétique dans l'espace, que nous avons faite est très simple. En

effet, lors de mesures de rayonnement SHG au moyen d'autres méthodes, notamment l'utilisation de rayonnements polarisés, les diagrammes de rayonnements apparaissent beaucoup plus complexes [129].

III.2.D. Collection du signal SHG dans le sens inverse au rayon incident

Une partie du rayonnement SHG faisant suite à une excitation bi-photon est réfléchi vers l'arrière. Dans la plupart des travaux publiés, le rayonnement SHG est collecté dans le sens inverse au rayon incident. La proportion du signal collectable dans le sens inverse au rayon incident dépend fortement des tissus observés [124,125]. De plus, les caractéristiques optiques des tissus vont entraîner une rétro diffusion plus ou moins importante du signal émis vers l'avant. Cette partie de signal réfléchi vient s'ajouter au signal SHG directement émis vers l'arrière et qui permet souvent d'obtenir des informations structurales complémentaires à propos de l'architecture tissulaire.

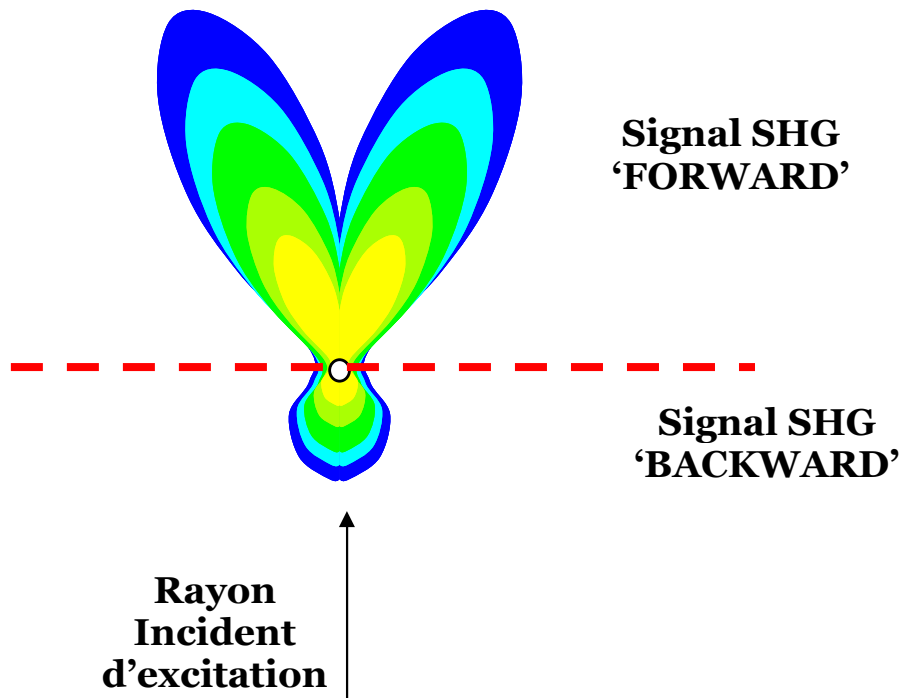


Figure 56 : Représentation des différentes zones de collection du signal SHG ('Forward' et 'Backward'). Le signal 'FORWARD' correspond au signal SHG diffusé dans le sens du rayon incident d'excitation. Le signal 'BACKWARD' correspond au signal émis dans le sens inverse.

Avec les détecteurs classiques implémentés sur le système (passage dans la tête confocale), nous n'avons pas réussi à mesurer cette faible proportion de signal. Nous avons cherché à la caractériser en utilisant le mode de détection de lumière transmise non descanné disponible sur le système, en utilisant un filtre passe-bande 400 ± 25 nm. En parallèle, nous avons mesuré le signal FLIM correspondant en sortie de la tête confocale. Le processus de génération de seconde harmonique est en réalité très court et présente une durée de vie de l'ordre de quelques centaines de picosecondes. Afin de valider ces deux modes de détection (NDD et FLIM), nous avons utilisé un échantillon d'acide urique, puis un échantillon de carotide de lapin.

Pour chaque échantillon, nous avons sélectionné trois zones différentes sur lesquelles nous avons mesuré le signal SHG diffusé dans le sens du rayon incident, le signal SHG diffusé en sens inverse (mode NDD). De plus, nous avons mesuré une image en durée de vie de fluorescence en utilisant différents filtres. Dans tous les cas, le signal collecté est filtré par un filtre passe-bas 700 nm, permettant de rejeter les éventuelles fuites provenant du faisceau d'excitation (800 nm). A ce filtre, nous avons ajouté dans un premier temps un filtre passe-bande 400 ± 25 nm, permettant de sélectionner la bande spectrale du signal SHG. Puis nous avons mis en place un filtre passe-bande 525 ± 50 nm qui permettrait de sélectionner une partie de l'autofluorescence des échantillons et surtout de rejeter la partie du signal correspondant à la bande SHG.

III.2.D.1. Mesure du signal SHG 'backward' pour un échantillon d'acide urique

La Figure 57 présente les résultats obtenus sur un échantillon d'acide urique, soit l'image correspondant au signal SHG mesuré en mode NDD, en mode 'Lumière transmise', la superposition de ces deux signaux et leur colocalisation. Cette dernière a été calculée en binarisant les deux premières images (avec un seuil $t=20$), puis en appliquant une fonction 'AND'.

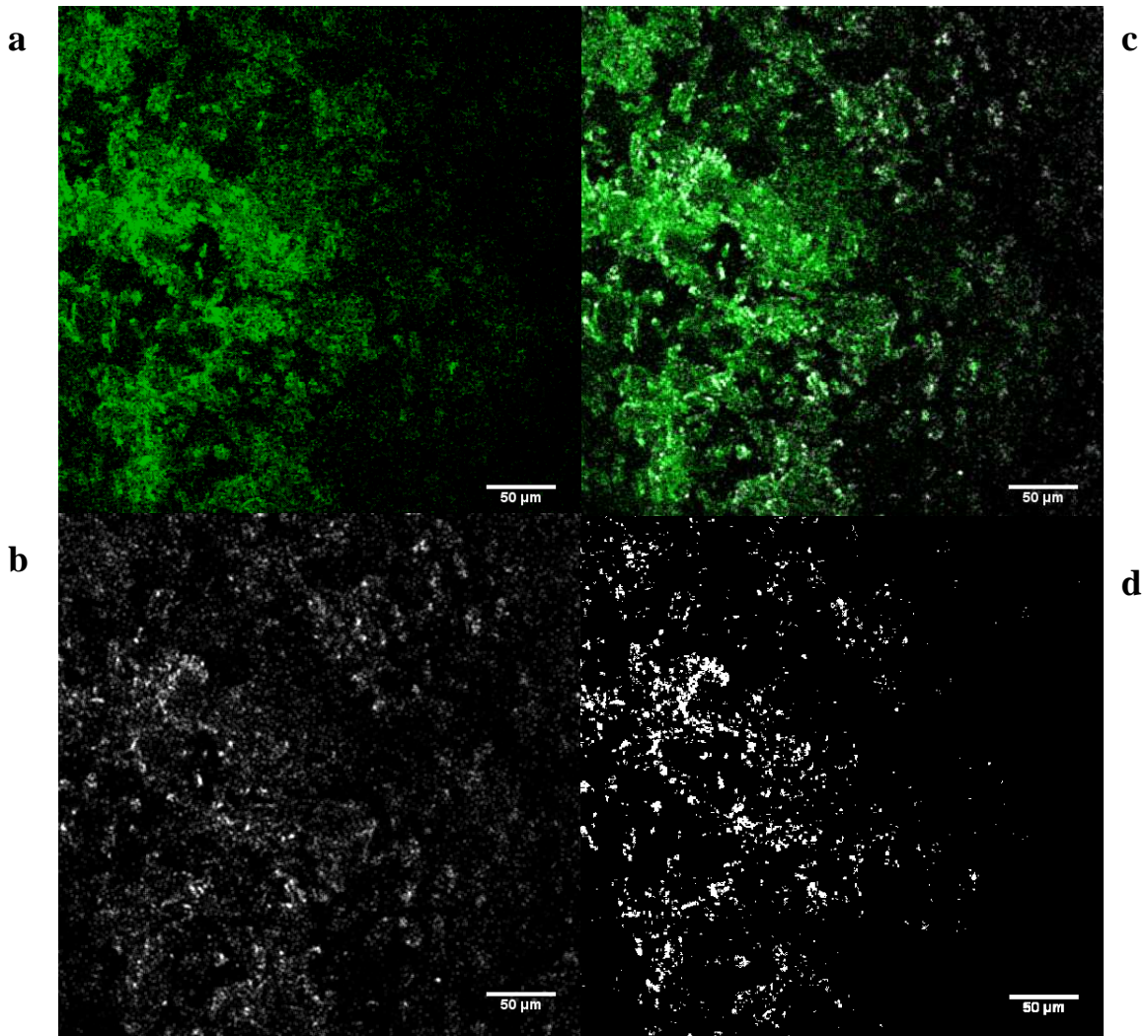


Figure 57 : Cristaux d'acide urique. Excitation MP 800 nm, objectif x40, NA=0,8. Détection du signal SHG émis (a) signal 'BACKWARD' dans le sens inverse au rayon incident (détection NDD) ; (b) signal 'FORWARD' dans le sens du rayon incident (détection en mode 'Lumière transmise'). (c) Superposition des signaux 'forward' et 'backward'. (d) Colocalisation des signaux.

La mesure des durées de vie de fluorescence permet d'isoler des déclinés très courts, de l'ordre de 200 ps (Figure 58) qui pourraient correspondre à l'émission d'un signal SHG (phénomène quasi instantané). Par ailleurs, on remarque que l'ajout du filtre 400 ± 25 nm entraîne une diminution de la quantité de signal recueilli (Figure 59). Lors de l'utilisation du filtre 525 ± 50 nm, la quantité de photons collectés est très faible. Ces résultats justifieraient donc qu'une partie du signal SHG est émis dans le sens inverse au rayon incident d'excitation et peut être caractérisé en mode d'imagerie FLIM. Les ajustements ont été effectués en mode biexponentiel, les codages couleur représentent les valeurs de la première composante (τ_1 en ps) et une valeur (q_1 en %) calculée à partir de la relation : $q_1 = \frac{a_1 * \tau_1}{\tau_m}$.

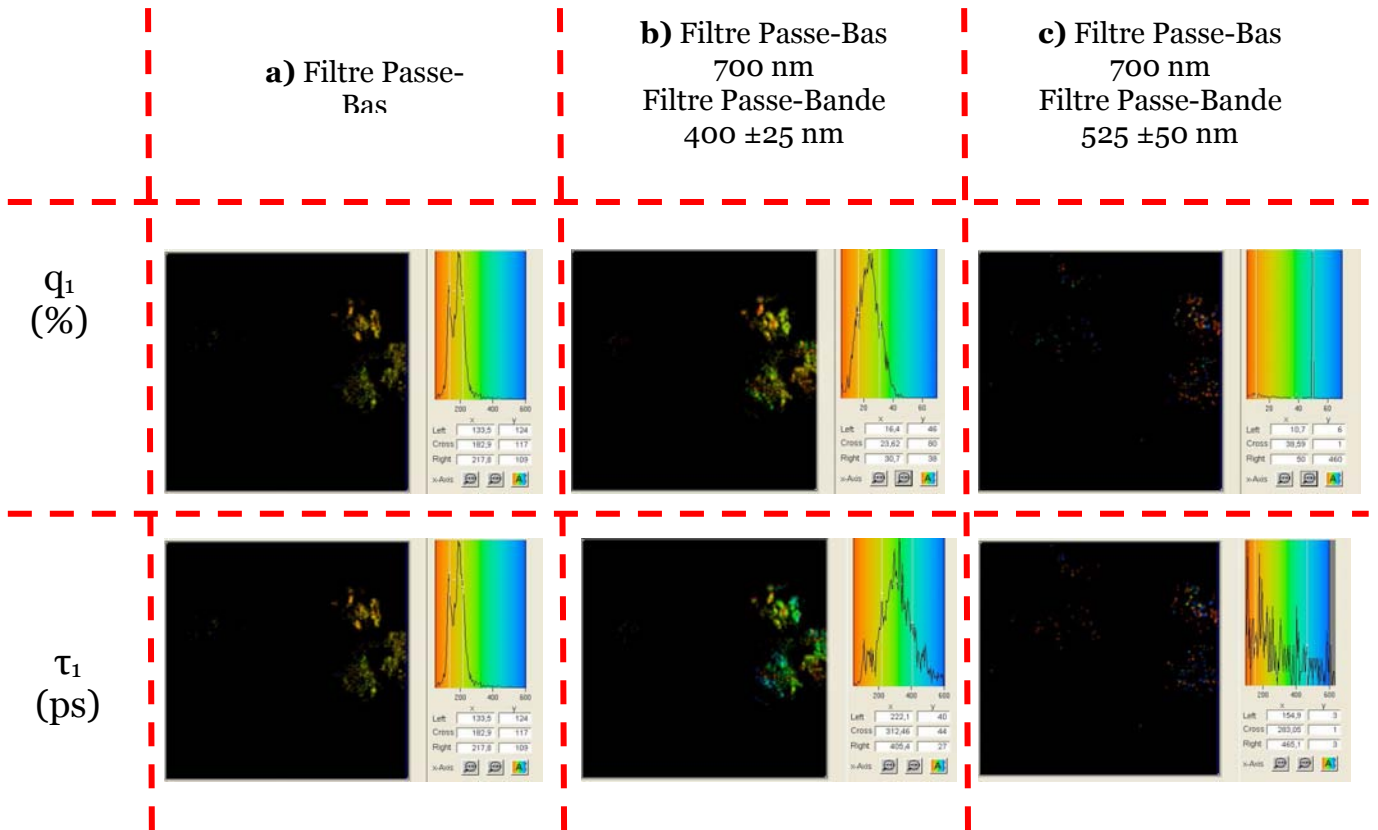


Figure 58 : Imagerie des durées de vie de fluorescence pour un échantillon d'acide urique. Excitation MP 800 nm, objectif x40, NA=0,8. Codage couleur et histogrammes de répartition de q_1 (%) et de τ_1 (ps) Détection du signal FLIM au travers de différents filtres : (a) Passe-bas 700 nm ; (b) Passe-bas 700 nm + Passe-bande 400±25 nm ; (c) Passe-bas 700nm + Passe-bande 525±50 nm

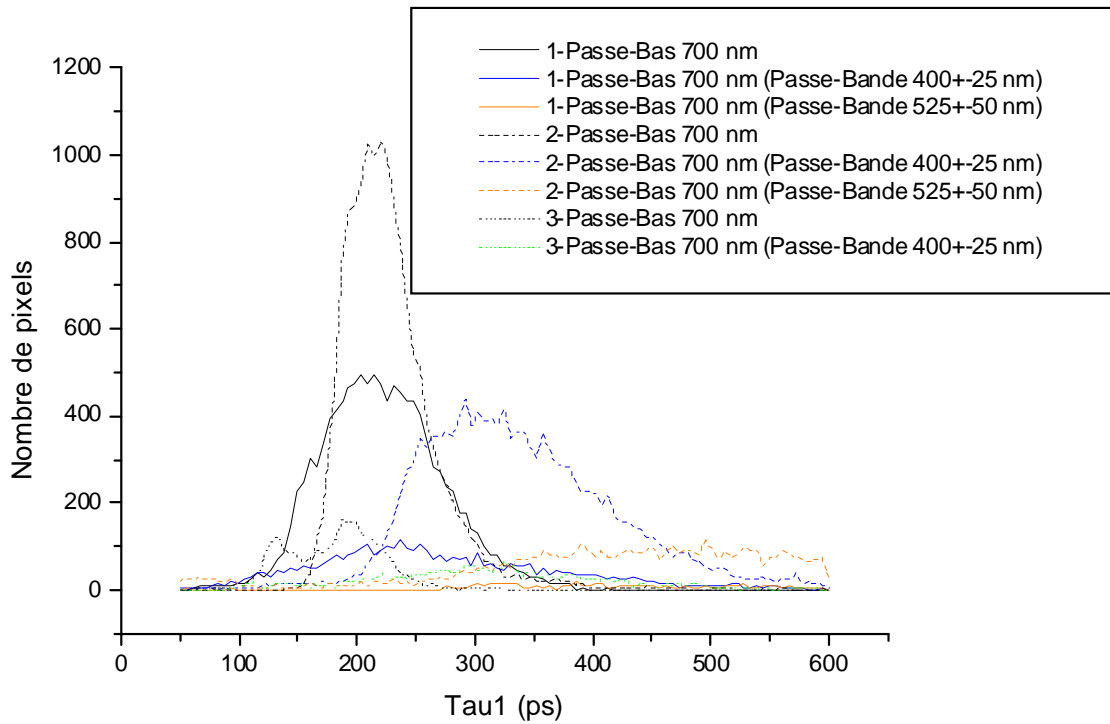


Figure 59 : Histogramme de répartition des durées de vie de fluorescence pour différents filtres d'arrêt à l'émission.

III.2.D.2. Mesure du signal SHG 'backward' émis par les faisceaux de collagène de l'adventice d'une carotide prélevée chez le lapin

Une étude analogue a été menée pour un échantillon de carotide. Nous avons imagé le signal SHG émis par des faisceaux de collagène de l'adventice. De la même manière, on note une forte colocalisation des signaux SHG mesurés pour le lobe rétro diffusé (détecté en mode NDD) et les lobes de diffusion dans le sens de propagation du rayon incident (détectés en mode 'Lumière transmise'). Malgré l'épaisseur importante de la carotide (de l'ordre de 350 à 400 μm), les signaux SHG 'forward' et 'backward' sont similaires, provenant des mêmes fibres de collagène.

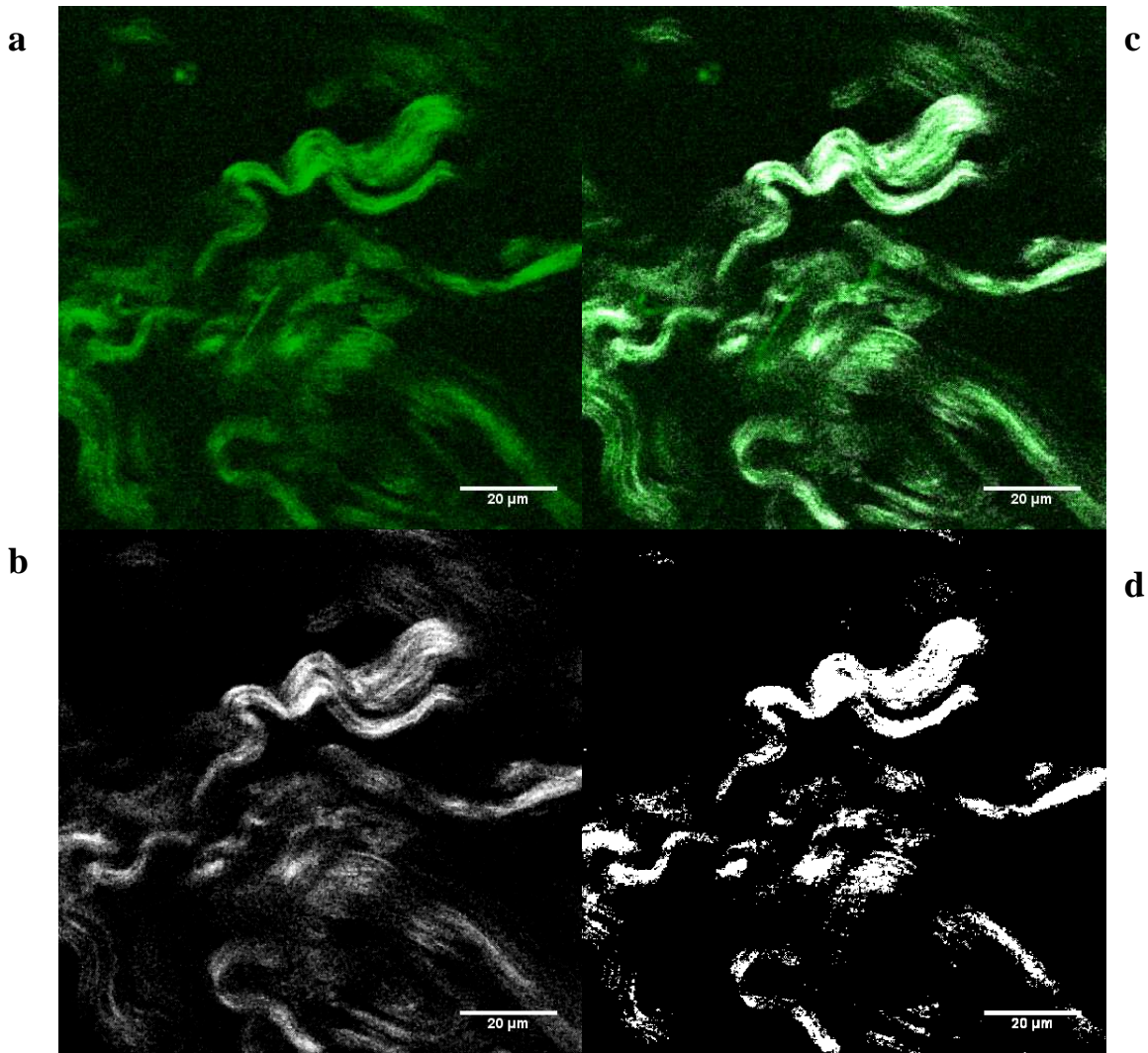


Figure 60 : Faisceaux de Collagène d'une carotide de lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x40, NA=0,8. Détection du signal SHG émis (a) signal 'BACKWARD' dans le sens inverse au rayon incident (détection NDD) ; (b) signal 'FORWARD' dans le sens du rayon incident (détection en mode Lumière Transmise). (c) Superposition des signaux 'forward' et 'backward'. (d) Colocalisation des signaux.

Les résultats d'études concernant la fluorescence du collagène restent assez mitigés. Dans certains travaux, la fluorescence de cette molécule serait nulle pour une excitation inférieure à 800 nm [136], tandis que d'autres équipes parviennent à mesurer un signal, mais très faible.

Pour confirmer nos images mesurées en mode NDD, nous avons réalisé des acquisitions FLIM. Le calcul des constantes de déclin de fluorescence montre l'apparition d'une composante très courte, de l'ordre de 200 ps en collectant le signal après le filtre passe-bande 400 ± 25 nm. Sur cet échantillon, l'utilisation du filtre 525 ± 50 nm ne permettait plus de

recueillir un nombre de photons acceptables pour un ajustement des courbes de déclin, suggérant que la quasi-totalité du signal collecté est du signal SHG, arrêté par l'utilisation de ce filtre.

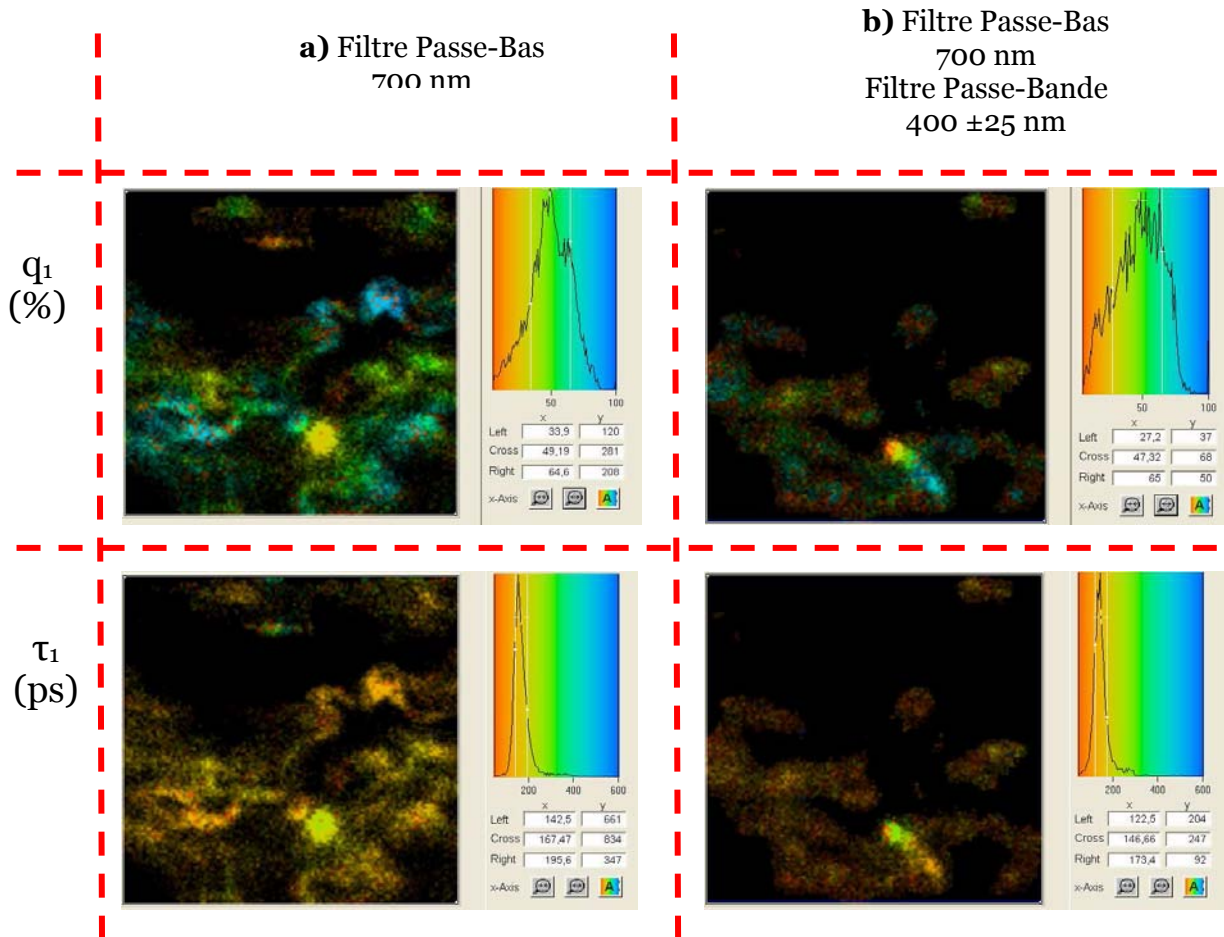


Figure 61 : Imagerie des durées de vie de fluorescence pour les faisceaux de collagène d'une carotide de lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x40, NA=0,8. Codage couleur et histogrammes de répartition de q_1 (%) et de τ_1 (ps) Détection du signal FLIM au travers de différents filtres : (a) Passe-bas 700 nm ; (b) Passe-bas 700 nm + Passe-bande 400±25 nm .

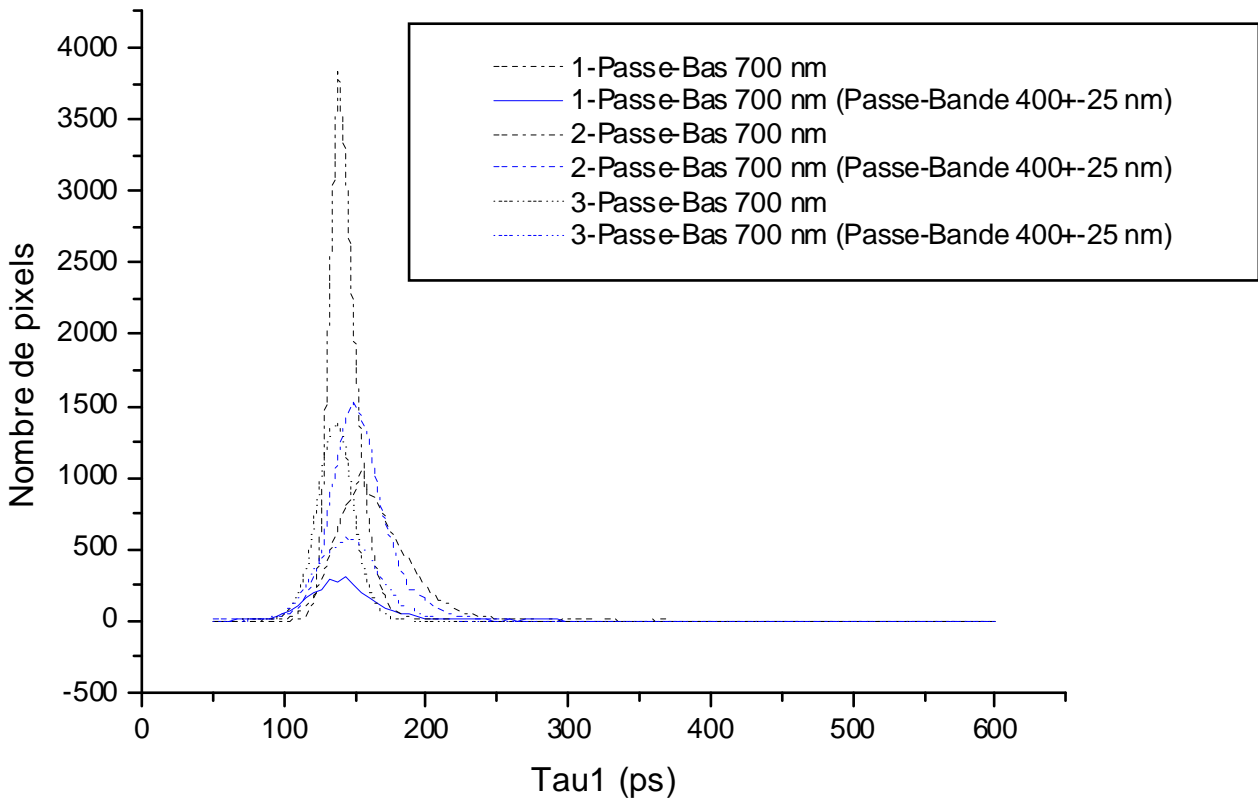
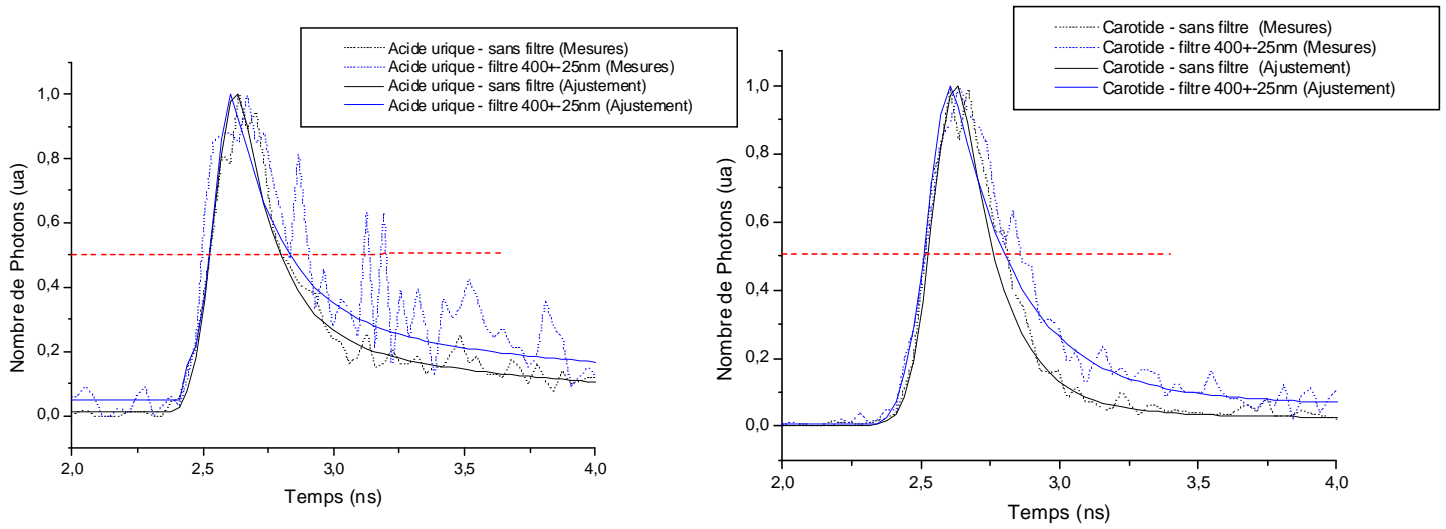


Figure 62 : Histogramme de répartition des durées de vie de fluorescence.

III.2.D.3. Limites de détection du signal FLIM

Nous avons utilisé les expériences ci-dessus afin de déterminer les limites de détection de la carte de comptage monophotonique telle qu'elle est actuellement implémentée sur le système du laboratoire. En effet, le processus de génération d'un signal SHG est quasi instantané, et le calcul de la FWHM permet d'avoir une indication des limites du système de comptage de photons.

En comparant les résultats obtenus sur les deux échantillons (acide urique et carotide), nous avons pu mesurer une FWHM proche de 300 ps.



		FWHM (ps)	
Acide Urique	sans filtre	Ajustement	270
		Mesures	270
	filtre 400±25nm	Ajustement	310
		Mesures	410
Carotide	sans filtre	Ajustement	240
		Mesures	300
	filtre 400±25nm	Ajustement	290
		Mesures	340

Figure 63 : Courbes de déclins de fluorescence (mesures et ajustement) pour un échantillon d'acide urique et de collagène d'une adventice de carotide de lapin. Calcul de la FWHM.

III.2.E. Mesure du signal SHG sur différents tissus

III.2.E.1. Le Collagène dans les tissus biologiques

Le collagène est un constituant majeur de la plupart des tissus biologiques. Ces molécules présentent la particularité d'être non centrosymétriques et de générer un intense signal SHG lorsqu'elles s'assemblent de manière fibrillaire comme c'est le cas pour les types I, II ou III par exemple.

Les molécules de base ('tropocollagène') s'assemblent en fibrilles ($\varnothing \sim 100$ nm) qui elles-mêmes se regroupent en fibres ($\varnothing \sim 1$ μ m) puis en faisceaux ($\varnothing \sim 5-10$ μ m). La résolution apportée par l'imagerie SHG permet de distinguer les fibres au sein d'un même faisceau.

La Figure 64 représente les faisceaux de collagène présents au sein de l'adventice d'une carotide +-de lapin (a-b) et montre qu'il nous a été possible de distinguer les fibres de collagène d'un même faisceau (c). La microscopie électronique nous a permis de confirmer que ces fibres sont en réalité composées d'un assemblage d'éléments plus petits, les fibrilles que l'on ne distingue pas en microscopie SHG.

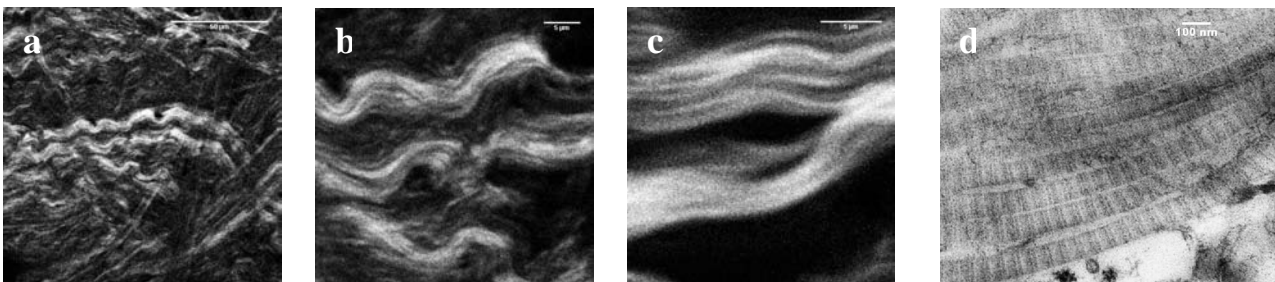


Figure 64 : Collagène de l'adventice d'une carotide de lapin. Observation par Imagerie SHG (Excitation MP 800 nm) : (a-b) Faisceau de fibres et (c) fibres ; (d) Observation par microscopie électronique de fibrilles constituant une fibre.

La quantité de signal SHG mesuré dépend de la concentration des molécules de collagène dans les tissus, mais aussi de leur arrangement. L'observation d'une coupe de languette sternale de lapin permet d'illustrer ce point. En réalité, la languette sternale est composée de cartilage hyalin entouré d'un périchondre, mais n'est pas sollicité mécaniquement comme le cartilage articulaire. Dans le cartilage hyalin, les fibres de

collagène sont réparties de manière pseudo-aléatoire et génèrent un faible signal SHG. Au contraire, le périchondre émet un signal très intense dû à l'arrangement fibrillaire et aligné des molécules (Figure 65).

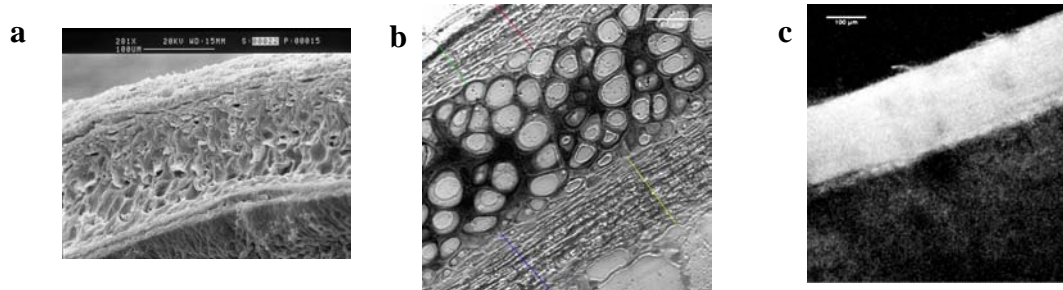


Figure 65 : Languette sternale de lapin. (a) Microscopie électronique. (b) Image en ‘Lumière transmise’ (488 nm). (c) Image SHG.

L'arrangement des réseaux de collagène au sein des tissus biologiques peut prendre des formes très variées. Ainsi, pour le tendon les fibres apparaissent ondulées, dans le muscle elles sont beaucoup plus droites (Figure 66), dans les vaisseaux elles s'enroulent de manière hélicoïdale, dans le cartilage hyalin elles affichent une organisation pseudo-aléatoire.

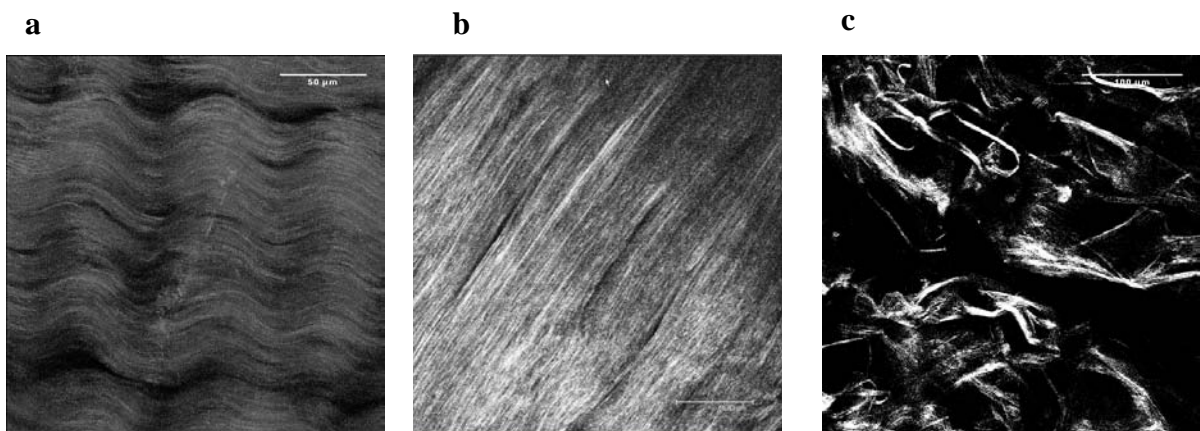


Figure 66 : Signal SHG provenant du réseau de Collagène. (a) Tendon de lapin. (b) Muscle de souris. (c) Eponge de collagène de type I.

III.2.E.2. L'association de la détection du signal SHG et du signal de fluorescence

L'imagerie par SHG peut être couplée à des méthodes de fluorescence plus classiques afin d'apporter des informations structurales complémentaires. Le signal SHG collecté sur une bande spectrale très étroite (400 ± 20 nm) est caractéristique du réseau de collagène des

tissus et est obtenu sans marquage fluorescent. Il est donc facilement discriminable du signal de fluorescence intrinsèque ou de marqueurs provenant d'autres structures cellulaires. L'utilisation de marqueurs excitables de manière efficace en mode multiphoton permet alors de visualiser lors du même balayage de l'échantillon le réseau de collagène (non marqué) par SHG et des structures cellulaires ou tissulaires spécifiques (marquées). On peut ainsi s'affranchir du phénomène de chevauchement spectral que l'on aurait sans doute observé si le réseau de collagène avait été marqué avec un fluorophore classique.

Par exemple, la Figure 67 représente un échantillon de peau d'une souris ayant subi une injection intraveineuse de photosensibilisateur. Le signal SHG, représenté en niveaux de gris émane des fibres de collagène tandis que le signal codé en rouge provient du photosensibilisateur intégré par les cellules. Spectralement, nous avons vérifié que le signal de fluorescence présente un pic aux environs de 650 nm et caractérise le photosensibilisateur.

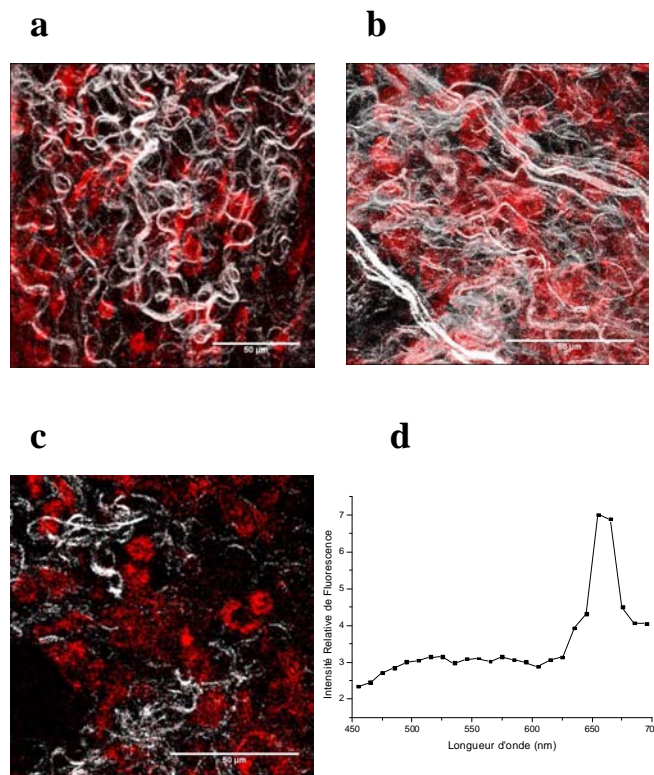


Figure 67 : Peau de souris ayant subi une injection intraveineuse de photosensibilisateur. Excitation MP 800 nm (obj x40, NA=0,8). (a) Projection sur 70 µm. (b) Projection sur 30 µm. (c) 1 plan avec (d) le spectre correspondant à l'image complète. Signal codé en niveau de gris : SHG ; Signal codé en rouge : bande spectrale 650-700 nm.

De la même manière, si on marque le noyau des cellules, on peut visualiser leur organisation par rapport aux réseaux de collagène.

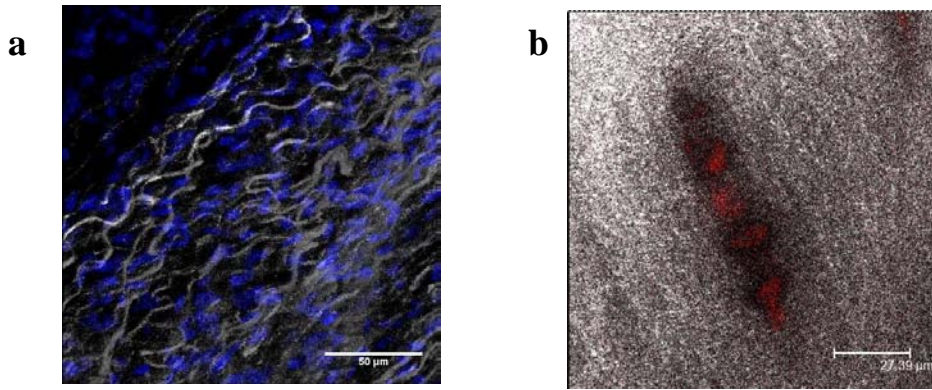


Figure 68 : (a) Mésentère intestin de souris, noyaux marqués au Hoechst. (b) Cartilage hyalin, Noyaux marqués à l'iodure de propidium.

III.2.F. Conclusion

Dans cette partie, dans un premier temps, nous avons étudié différentes combinaisons d'objectifs afin de mesurer un signal SHG émanant de molécules de collagène. Bien que le diagramme de rayonnement SHG soit très complexe à modéliser, nous avons supposé que les lobes de diffusion vers l'avant étaient comparables à un rayonnement d'antenne (variant suivant une loi sinus cardinal). La plupart des mesures de signal SHG présentées par la suite a été réalisée en focalisant le rayon d'excitation au moyen de l'objectif x20. Le signal a été collecté dans le sens du rayon incident avec l'objectif x40.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés au signal SHG émis dans le sens inverse au rayon d'excitation. Celui-ci n'a pas pu être mesuré au moyen des détecteurs classiques équipant le microscope confocal du laboratoire. Cependant, il a pu être mesuré au moyen des détecteurs NDD. Par ailleurs, nous avons constaté que lors d'une mesure FLIM, une composante courte intervient pour l'ajustement des courbes de déclin de fluorescence lorsque les molécules imagées génèrent un signal SHG.

En termes d'applications, nous avons observé différents types de tissus, afin de mettre en évidence les potentialités de cette méthode d'imagerie (SHG). Les axes de recherche développés au laboratoire concernent principalement le domaine vasculaire et le cartilage et il apparaît nécessaire de développer une approche macroscopique de cette modalité SHG afin de garder le côté non invasif de cette méthode.

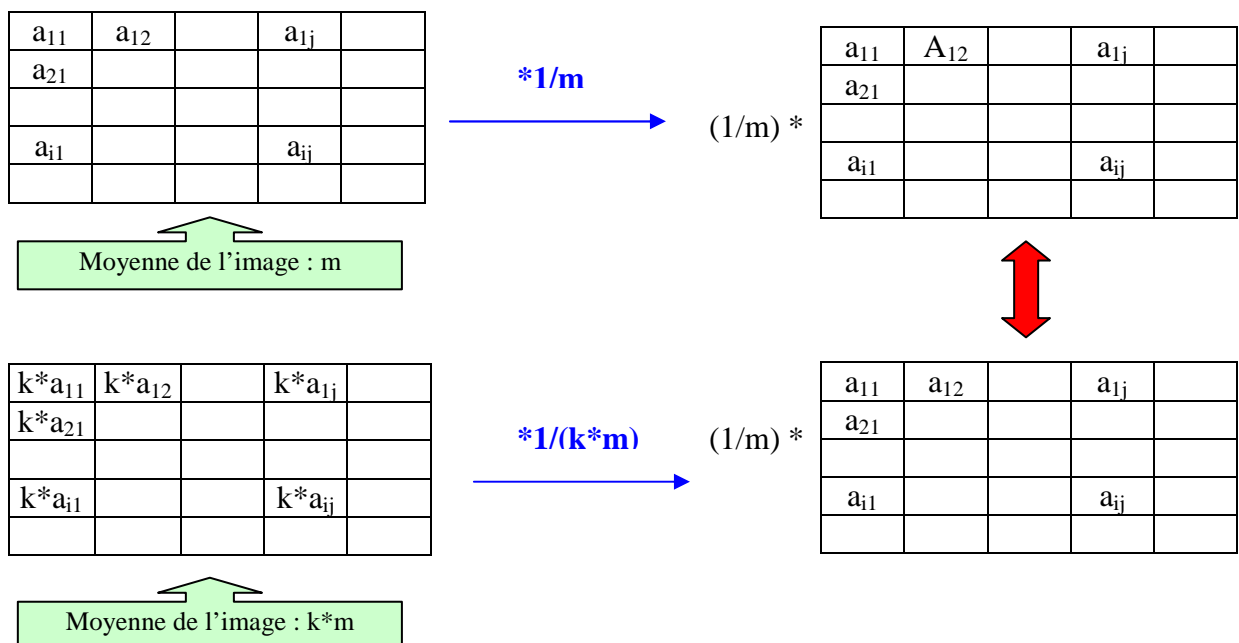
III.3. Validation du modèle d'analyse de texture

III.3.A. Influence de l'intensité d'une image

La méthode d'analyse de texture que nous avons appliquée est basée sur les paramètres de Haralick, calculés à partir de la matrice de cooccurrence d'une image. Ces paramètres dépendent de l'intensité du signal obtenu. Afin de comparer les résultats, il convient de s'affranchir des variations d'intensité c'est-à-dire de brillance.

Pour s'affranchir des variations de brillance visibles sur les régions d'intérêt, les images sont normalisées par rapport à la moyenne d'intensité. Pour chaque région d'intérêt, la valeur moyenne est calculée. Puis chaque valeur de pixel est divisée par cette moyenne. Pour calculer les matrices de cooccurrence, les valeurs d'un pixel doivent être des entiers, d'où la nécessité d'arrondir les valeurs (à l'entier le plus proche).

Pour valider ce modèle, les paramètres texturaux ont été calculés pour des images identiques d'intensités différentes (fibres d'une éponge de collagène de type I). Les valeurs de l'image de référence ont été multipliées de manière logicielle respectivement par $k = \{4; 2; 1,25; 0,75; 0,5 \text{ et } 0,25\}$.



Dans le cas d'une normalisation par rapport à l'intensité moyenne de l'image, en théorie, on retrouve la même image, d'où des paramètres texturaux identiques. On s'est alors affranchi des variations d'intensité. Pour nos conditions expérimentales, en multipliant les images par 2 et 4, on atteint des conditions de saturation (15% de pixels saturés – valeur =255 – pour l'image $2 \cdot I_{ref}$; 25% pour l'image $4 \cdot I_{ref}$). Nous avons choisi pour la suite de notre étude de normaliser les images par rapport à la moyenne (afin d'avoir plus d'informations au niveau des structures), et de considérer cette moyenne comme un paramètre supplémentaire d'analyse.

Le calcul des paramètres de Haralick sans normalisation par rapport à la moyenne montre des variations fortement dépendantes de l'intensité. En revanche, après normalisation les variations sont inférieures à 2,5% (sauf pour l'entropie) lorsque les images ne sont pas en condition de saturation ($k = \{4; 2; 1,25; 0,75; 0,5 \text{ et } 0,25\}$). Cette erreur est certainement due aux erreurs d'arrondis. Lorsque les images sont saturées, les paramètres sont erronés. L'observation des images montre une modification des structures (élargissement) qui confirme l'obtention de paramètres différents.

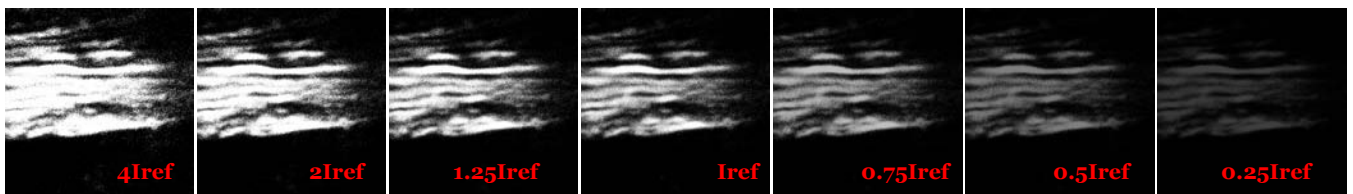


Figure 69 : Multiplication logicielle d'une image de référence I_{ref} par différentes valeurs $k = \{4; 2; 1,25; 0,75; 0,5; 0,25\}$. Représentation des conditions de saturation.

	Angular Second Moment	Contrast	Correlation	Variance	Inverse Difference Moment	Sum Average	Sum Variance	Sum Entropy	Entropy	Mean
4Iref/Iref	1,13	3,57	0,85	0,90	1,33	1,88	3,55	1,11	1,29	1,90
2Iref/Iref	1,03	2,13	0,94	0,94	1,18	1,51	2,29	1,04	1,16	1,52
1,25Iref/Iref	1,01	1,36	0,98	0,98	1,05	1,19	1,41	1,01	1,05	1,19
Iref	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,75Iref/Iref	1,00	0,56	1,00	1,03	1,01	0,75	0,57	1,02	1,03	0,75
0,5Iref/Iref	1,02	0,25	0,99	1,06	1,03	0,51	0,26	1,04	1,07	0,50
0,25Iref/Iref	1,08	0,06	0,95	1,09	1,10	0,26	0,07	1,08	1,15	0,25

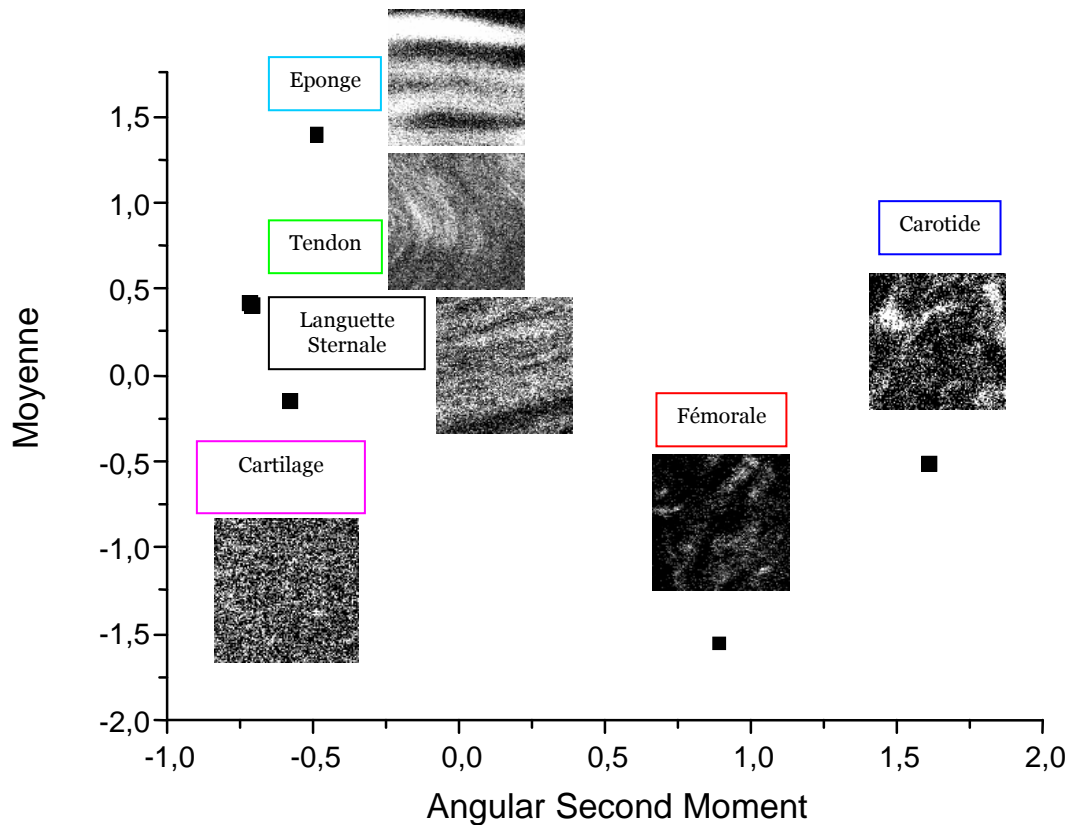
Tableau 12 : Paramètres avant normalisation par la moyenne de l'image (Orange : variations de $\pm 15\%$; bleu : variations $< 2\%$).

	Angular Second Moment	Contrast	Correlation	Variance	Inverse Difference Moment	Sum Average	Sum Variance	Sum Entropy	Entropy	Mean
4Iref/Iref	1,16	0,99	0,87	0,97	1,36	1,00	1,00	1,14	1,29	1,00
2Iref/Iref	1,05	0,92	0,95	0,98	1,20	1,00	1,00	1,07	1,16	1,00
1,25Iref/Iref	1,01	0,96	0,99	0,99	1,06	1,00	1,00	1,02	1,05	1,00
Iref	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,75Iref/Iref	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,02	1,03	1,00
0,5Iref/Iref	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,04	1,06	1,00
0,25Iref/Iref	1,02	0,99	0,98	1,00	1,02	1,00	1,00	1,07	1,14	1,00

Tableau 13 : Paramètres après normalisation par la moyenne de l'image (Orange : variations de $\pm 15\%$; bleu : variations $< 2\%$).

III.3.B. Comparaison de différents types d'échantillons avec le modèle d'analyse de texture + classification ACP

Afin de comprendre l'évolution des paramètres en fonction des structures imagées, nous avons appliqué l'algorithme de calcul basé sur les matrices de cooccurrence à différents types d'échantillons. Les images acquises représentent des tailles natives variables au niveau des échantillons mais sont toutes codées dans des matrices de 100*100 pixels². En effet, lorsque les différences sont visibles au niveau des images, il est plus aisé d'interpréter l'évolution des paramètres. Cette approche sera par la suite transposée à l'étude du cartilage, les différences au niveau des images SHG de la matrice extracellulaire étant dans ce cas beaucoup plus faibles, et difficilement quantifiables en réalisant une simple observation.



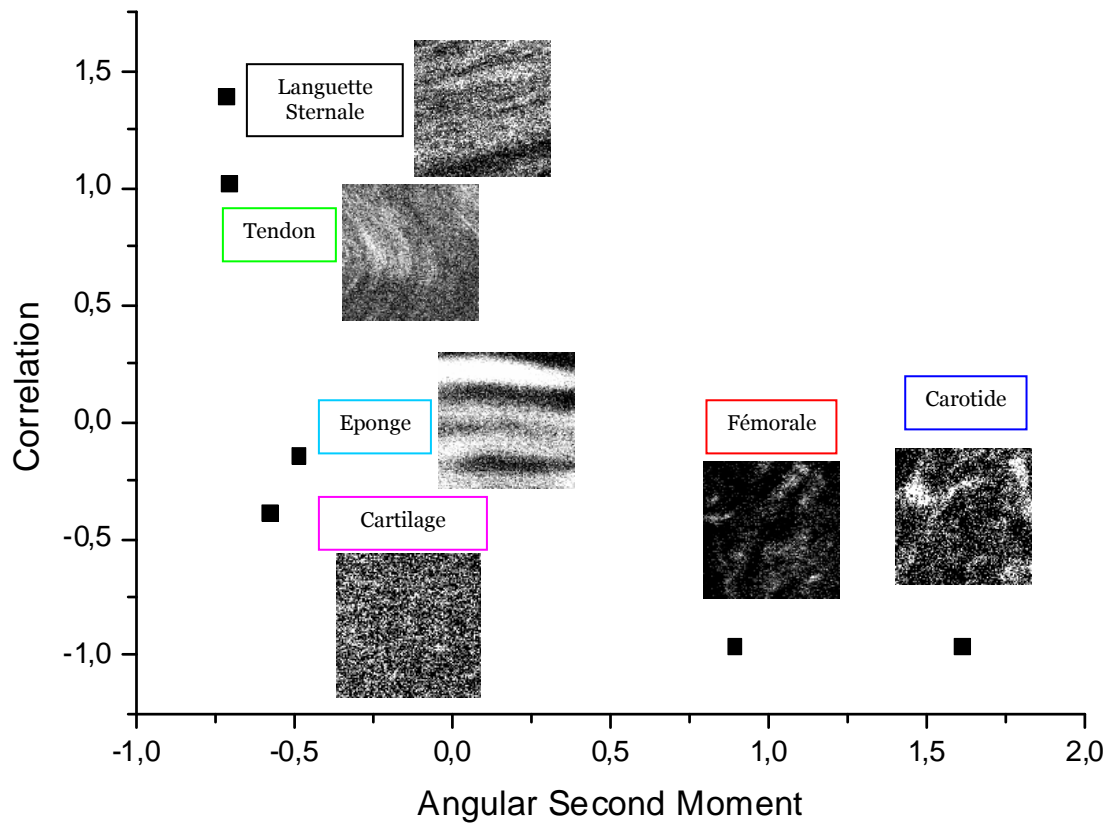
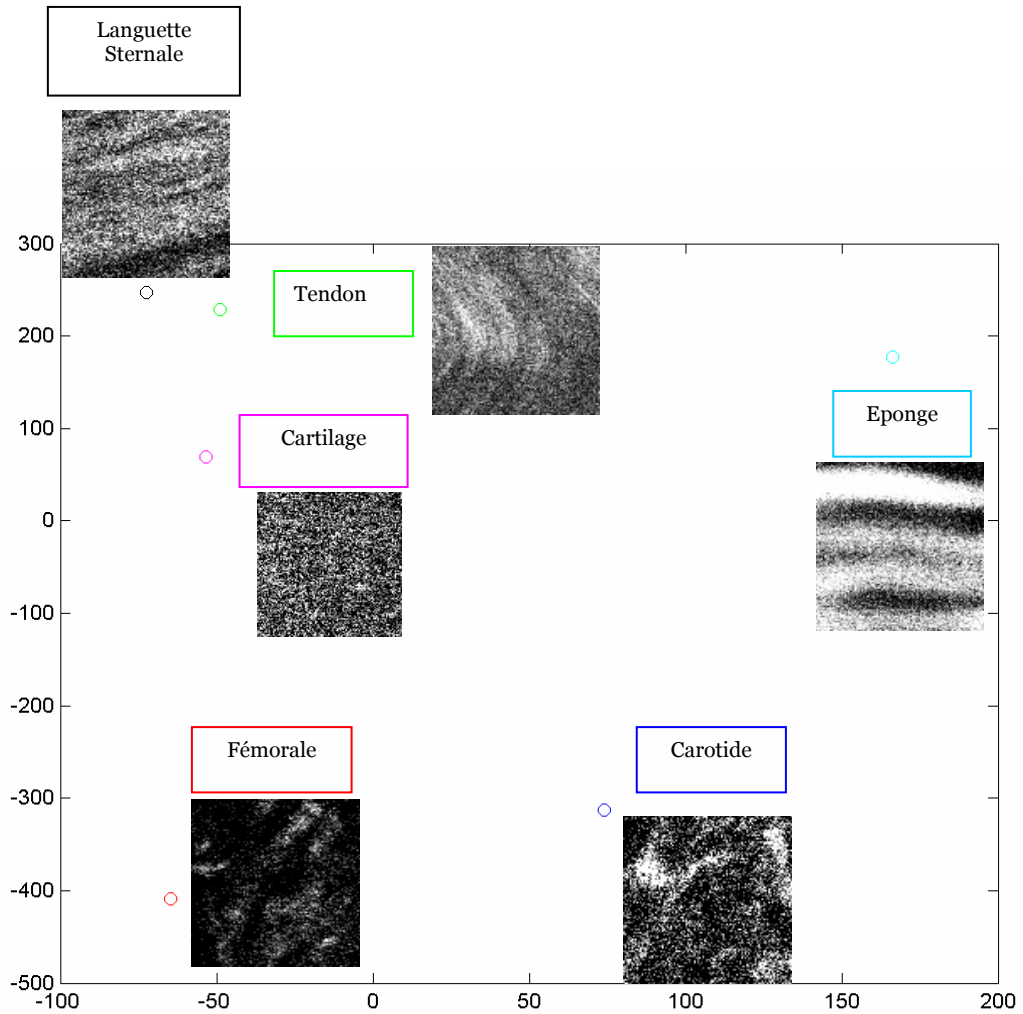


Figure 70 : Evolution des paramètres ‘Moyenne’ et ‘Correlation’ en fonction de l’ ‘ASM’. Paramètres de texture calculés pour des échantillons présentant des structures diverses : languette sternale (lapin) ; tendon (lapin) ; artères carotide et fémorale (lapin) ; cartilage (humain) ; éponge de collagène I. Images SHG de taille 100*100 pixels².



	1 ^{er} Axe Factoriel	2 nd Axe Factoriel
Angular Second Moment	0,20	-0,32
Contrast	-0,20	-0,28
Correlation	-0,34	0,29
Variance	0,42	0,31
Inverse Difference Moment	0,50	-0,30
Sum Average	0,14	0,34
Sum Variance	0,12	0,34
Sum Entropy	-0,14	0,33
Entropy	-0,20	0,34
Mean	0,53	0,30

Figure 71 : Diagramme ACP représentant les paramètres texturaux calculés à partir d'images SHG d'échantillons présentant des structures diverses : langue sternale (lapin) ; tendon (lapin) ; artères carotide et fémorale (lapin) ; cartilage (humain) ; éponge de collagène I. Le tableau indique la contribution de chaque paramètre pour la détermination des axes factoriels.

Analyse de texture sur différents échantillons	Ecart Type (%)	100*(max-min)/max
Angular Second Moment	137	99
Contrast	86	95
Correlation	102	99
Variance	23	53
Inverse Difference Moment	27	46
Sum Average	35	66
Sum Variance	58	90
Sum Entropy	9	24
Entropy	46	194
Moyenne	47	84

Tableau 14 : Ecart mesuré pour les paramètres texturaux calculés à partir d'images SHG d'échantillons présentant des structures diverses : languette sternale (lapin) ; tendon (lapin) ; artères carotide et fémorale (lapin) ; cartilage (humain) ; éponge de collagène I.

III.3.C. Conclusion

Cette partie nous a permis de valider la méthode d'analyse de texture basée sur les paramètres de Haralick. Les résultats obtenus montrent l'importance de normaliser les images par la moyenne pour confiner l'analyse aux tailles et organisations d'éléments de la texture. Par ailleurs, cette analyse nous a indiqué les erreurs lors du calcul des paramètres pour des images saturées, et nous incite donc à rester très vigilants par rapport aux conditions d'acquisition des images. De plus, l'intensité du signal étant un élément important, nous avons choisi de considérer la moyenne de signal sur l'image comme un paramètre supplémentaire.

Cette méthode d'analyse a été par la suite appliquée au niveau de la MEC du cartilage et du réseau de collagène de l'adventice de vaisseaux sanguins, dans le but de mettre en évidence des réorganisations ou dégradations matricielles.

III.4. Etude du cartilage

Le cartilage hyalin que l'on trouve au niveau des articulations est un tissu biologique non vascularisé et dépend pour sa nutrition du liquide dans lequel il baigne (liquide synovial). Pour qu'il puisse absorber les nutriments nécessaires à son maintien, il doit être soumis à un flux provoqué par des cycles de compression/décompression. Cependant, ce flux entrant et sortant provoque des modifications de la matrice cartilagineuse.

Dans cette étude, nous avons proposé d'étudier certaines modifications apparaissant au sein de la MEC du cartilage en mesurant le signal SHG provenant du réseau de collagène. Pour cela, nous avons utilisé une méthode d'analyse d'image SHG basée sur différents paramètres texturaux (Haralick) dans l'objectif de mettre en évidence des différences de motifs détectés pour des échantillons soumis ou non à contrainte enzymatique (collagénase) ou mécanique (compression).

En premier lieu, nous avons mis en évidence le contenu en fluorophores endogènes (autofluorescence) et en collagène (SHG) de la MEC du cartilage et de la matrice péricellulaire des chondrocytes. Nous avons distingué plusieurs zones en fonction de la profondeur qui présentent des arrangements moléculaires et cellulaires différents. Puis nous avons étudié l'influence de l'application de contraintes sur la MEC sur le réseau de collagène.

En second lieu, nous nous sommes intéressés au collagène VI présent au niveau de la matrice péricellulaire des chondrocytes. Cette molécule se révèle intéressante puisqu'elle peut témoigner d'une part de l'altération du cartilage : son expression est beaucoup plus élevée dans les cartilages arthrosiques que dans les échantillons sains et d'autre part, sa synthèse accompagne le phénomène de mécanotransduction, et peut permettre de valider la viabilité d'une construction tissulaire.

III.4.A. Structure du cartilage articulaire

III.4.A.1. Mise en évidence du contenu en PG et Collagène de la MEC du cartilage

La MEC du cartilage présente une forte autofluorescence {Martini, 2005 #334; Talbot, 2005 #335} sous excitation multiphoton et de récentes études ont cherché à déterminer la source de ce signal [179].

La combinaison de divers outils de détection microscopique nous a permis d'imager le contenu en PGs de la MEC, puisque ces protéines présentent une autofluorescence sous excitation MP. Le signal de fluorescence provient de la matrice péri-cellulaire des chondrocytes et de la matrice extracellulaire. Les spectres d'autofluorescence sont similaires dans ces deux zones. Ils s'étendent de 450 à 600 nm, avec un pic aux environs de 490 nm (Figure 72).

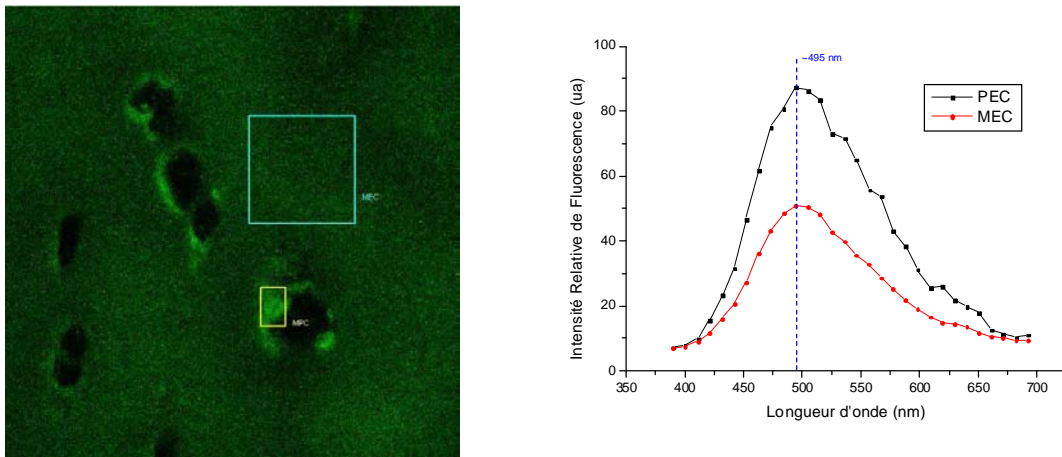


Figure 72 : Spectres d'autofluorescence mesurés sur un explant de cartilage. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA 0,7. Taille de l'image : 220*220 μ m². Régions d'intérêt sélectionnées dans la matrice péri-cellulaire et la matrice extracellulaire.

Le réseau de collagène a pu être observé au moyen de l'imagerie par Génération de Seconde Harmonique (SHG). La Figure 73 représente une image obtenue par mesure du signal SHG au niveau d'une loge de chondrocytes. Les lacunes occupées par les cellules se distinguent nettement de la MEC, puisqu'elles ne génèrent pas de signal SHG. Ces images confirment le bon ratio Signal/Bruit que nous avons pu obtenir.

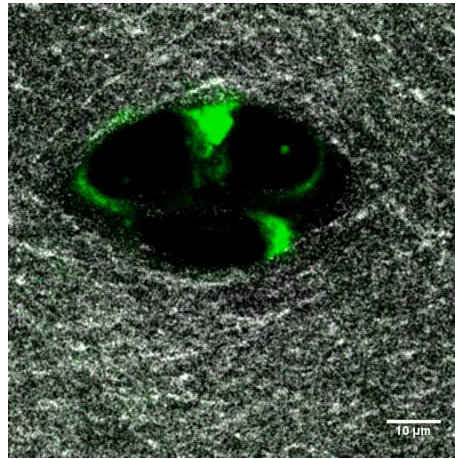


Figure 73 : Chondron dans le cartilage artériel. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Canal gris : Signal SHG - Fibres de collagène (Collection objectif x40, NA=0,8). Canal Vert : Autofluorescence – Protéoglycannes (500-600 nm).

III.4.A.1.1. Distinction des signaux d'autofluorescence et SHG

Avec une excitation MP à 800 nm, nous avons recueilli deux types de signaux. Le premier, celui de l'autofluorescence a été récupéré entre 500 et 600 nm dans le sens inverse au rayon incident (le signal repasse par la tête confocale). Le signal SHG a été mesuré dans le sens du rayon incident. Pour être certains que la mesure du signal 'vers l'avant' au moyen du filtre BP 400 nm, n'est pas influencé par l'autofluorescence, les signaux d'autofluorescence et SHG ont été mesurés simultanément au cours du temps. La fluorescence est soumise au phénomène de photoblanchiment qui entraîne une diminution de signal lorsque l'échantillon est scanné de manière continue. Au contraire, le signal SHG ne nécessite pas d'absorption de photons et n'est pas sensible à ce même phénomène. Il en résulte une stabilité sur 700 secondes de ce signal au cours du temps, comme le montre le graphique de la Figure 74.

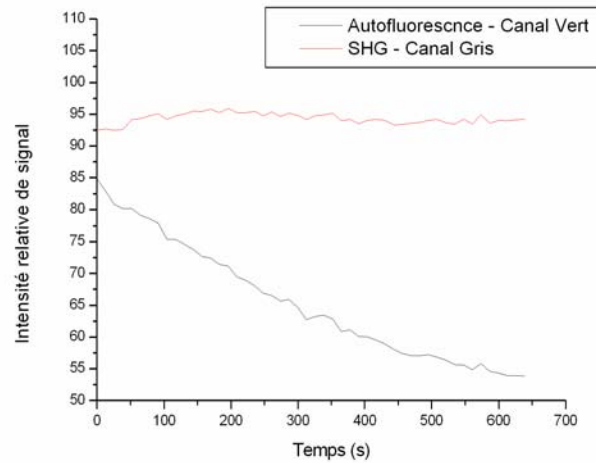
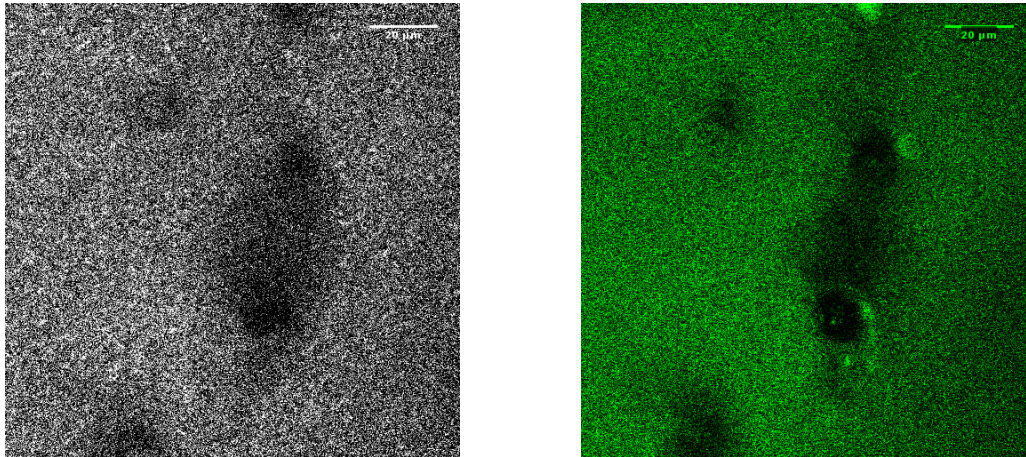


Figure 74 : Echantillon de cartilage scanné en continu à 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Perte du signal d'autofluorescence (500-600 nm) au cours du temps (photoblanchiment). Conservation du niveau de signal SHG (Collection objectif x40, NA=0,8).

III.4.A.1.2. Effet de la Collagénase

Pour avoir la certitude que le signal SHG émanant du cartilage provienne bien du collagène, des explants de cartilage ont été incubés avec de la Collagénase B. Cette enzyme mime l'action des Métalloprotéases et entraîne une dégradation du réseau de collagène qui constitue la MEC. Il en résulte une décroissance au cours du temps du signal SHG, comme il est visible sur la Figure 75, quelle que soit la zone de la MEC imagée (Surface, Milieu ou Profondeur - Figure 9 du § II.1.B). Nous pouvons en conclure que le signal mesuré est généré par le collagène.

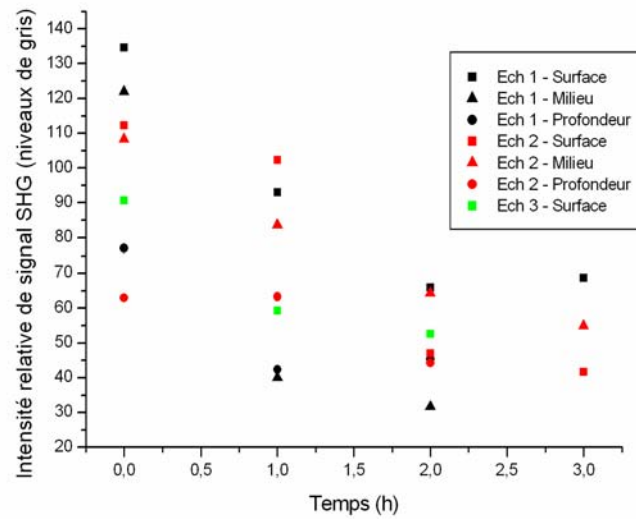


Figure 75 : Perte du signal SHG pour des échantillons traités avec de la Collagénase. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Objectif de collection du signal SHG x40, NA=0,8.

Afin de compléter ce résultat, nous avons calculé les valeurs des paramètres texturaux de Haralick pour les échantillons soumis à l'action de la Collagénase au cours du temps. Suite à l'action enzymatique, le signal SHG diminue et s'homogénéise ('ASM' élevé). Les facteurs de 'Moyenne', 'Contraste' et 'Correlation' diminuent. Les écarts mesurés au niveau des paramètres de texture sont résumés dans le Tableau 15.

La combinaison de toutes ces mesures suggère une disparition homogène des fibres de collagène, puisque plus le temps d'incubation de l'explant de cartilage avec la Collagénase est long, plus le signal mesuré s'apparente à un bruit de fond.

Analyse Collagénase	Ecart Type (%)	100*(max-min)/max
Angular Second Moment	35	68
Contrast	57	88
Correlation	17	100
Variance	1	39
Inverse Difference Moment	4	11
Sum Average	4	14
Sum Variance	9	26
Sum Entropy	4	12
Entropy	6	22
Moyenne	35	65

Tableau 15 : Ecart mesurés pour les paramètres texturaux calculés à partir d'images acquises pour un même échantillon soumis à l'action de la Collagénase. Mesures en surface pour un temps d'incubation de 0, 1, 2 puis 3 h.

L'évolution de ces paramètres sera par la suite comparée à l'évolution observée lorsque l'on mesure le signal pour des échantillons soumis à compression.

III.4.A.2. Arrangement des fibres de Collagène en fonction de la zone (profondeur) imagée

Dans le cartilage articulaire, différentes zones se distinguent par l'arrangement des différents composants [180]. Par mesure du signal SHG (Figure 76), nous avons pu observer des lacunes (chondrons) allongées et orientées parallèlement à la surface. En général, ces chondrons contiennent deux chondrocytes. Plus en profondeur (environ 300 μm sous la surface), les lacunes semblent plus larges, mais ne présentent plus d'orientation spécifique. Finalement, pour la couche la plus profonde que nous avons pu distinguer (environ 600 μm sous la surface), les lacunes sont allongées et s'orientent perpendiculairement à la surface. Souvent, elles se regroupent, et nous pouvons voir 4 chondrocytes dans la même lacune.

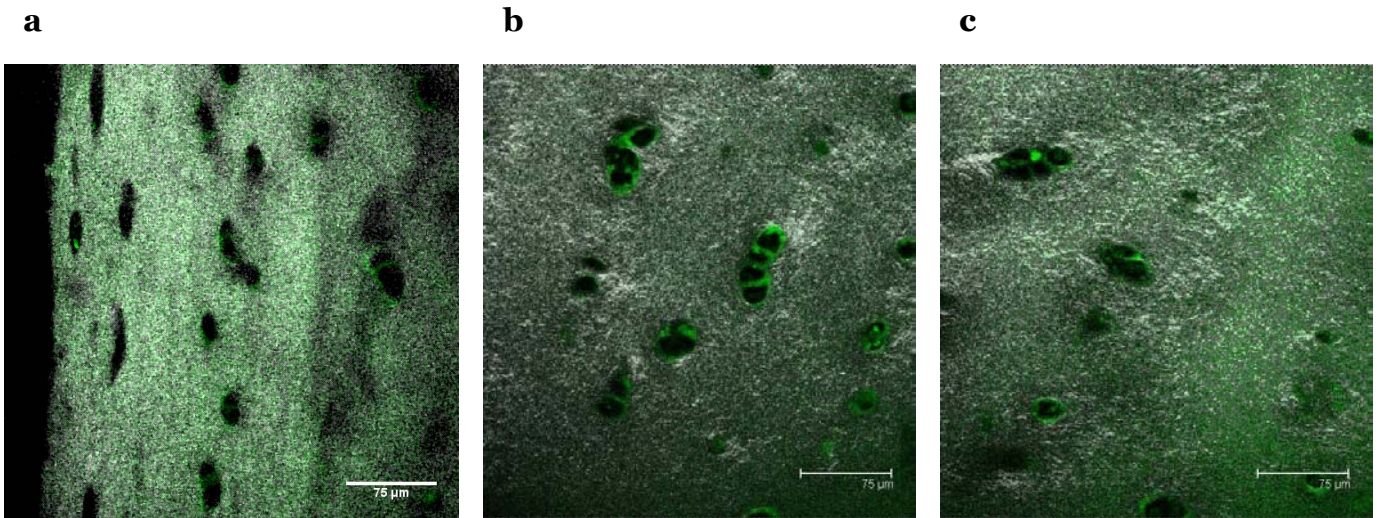


Figure 76 : Explants de cartilage (femme 68 ans). Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Images acquises (a) à la surface de l'échantillon, (b) 300 μm sous la surface, (c) 600 μm sous la surface. Canal Vert : Autofluorescence – Protéoglycannes (500-600 nm). Canal Gris : Signal SHG - Collagène (Collection objectif x40, NA=0,8).

Cette étape de distinction de différentes zones a été importante pour la suite de l'étude. En effet, l'arrangement différent du réseau collagénique en fonction de la profondeur entraîne de grandes variations pour nos résultats d'analyse de texture. En effet, en profondeur, le signal SHG est plus homogène ('ASM' élevé) et moins intense. Les zones de l'image présentant le même motif textural sont grandes ('IDM' élevé), témoignant de la répartition pseudo aléatoire des fibres de collagène. Parallèlement, le nombre de frontières ('Variance' et 'Contraste') tend à diminuer en surface et s'associe à la présence de petits éléments texturaux linéaires (faible 'IDM', 'Correlation' élevée).

Les paramètres évoluent de la même manière lorsqu'on se déplace en profondeur dans l'échantillon que lorsque celui-ci est soumis à l'action enzymatique de la Collagénase : plus on s'éloigne de la surface, plus la répartition des fibres semble pseudo-aléatoire, générant un signal qui ressemble à un 'bruit de fond'.

Le Tableau 16 résume les différences observées au niveau du calcul des différents paramètres texturaux de Haralick à partir d'images acquises à différentes profondeurs au sein d'un même échantillon.

Analyse en Profondeur	Ecart Type (%)	100*(max-min)/max
Angular Second Moment	96	98
Contrast	58	97
Correlation	71	720
Variance	41	80
Inverse Difference Moment	50	83
Sum Average	1	4
Sum Variance	1	9
Sum Entropy	10	46
Entropy	34	206
Moyenne	53	82

Tableau 16 : Ecarts mesurés pour les paramètres texturaux calculés à partir d'images acquises dans 5 différentes zones d'un même échantillon à raison de 5 images par zone.

Afin de comparer correctement les données obtenues en compression ou non, il convient d'acquérir des images au niveau des mêmes zones. Nous avons choisi d'en distinguer trois, qui seront par la suite appelées 'Surface', 'Milieu' (~300 μm sous la surface) et 'Profondeur' (~600 μm sous la surface).

III.4.B. Modification de la structure de la matrice extracellulaire lors de l'application d'une contrainte mécanique

La modification de la structure de la MEC du cartilage soumis à contrainte mécanique est comparable à celle observée lors de certaines pathologies (comme l'arthrose par exemple). Le but de cette étude est de caractériser la modification du réseau de collagène, au moyen d'une méthode d'analyse d'image basée sur différents paramètres texturaux.

III.4.B.1. Analyse de texture appliquée à l'étude de la MEC d'explants de cartilage comprimés ou non – Exemples détaillés

La Figure 77 représente le signal SHG mesuré pour un échantillon comprimé durant 7 h et le témoin correspondant. Les zones codées en rouge représentent les zones les plus riches en collagène émettant un très fort signal. Il est à noter ici, que nous parvenons à la limite de résolution du système optique. Le diamètre des fibres est sans doute surestimé, puisqu'il est en réalité inférieur à la taille du volume focal : les fibres de collagène de type II présente un diamètre de l'ordre de 50 nm, alors que l'aire du volume focal présente un rayon se rapprochant de 0,5 μm (cf § III.2.B).

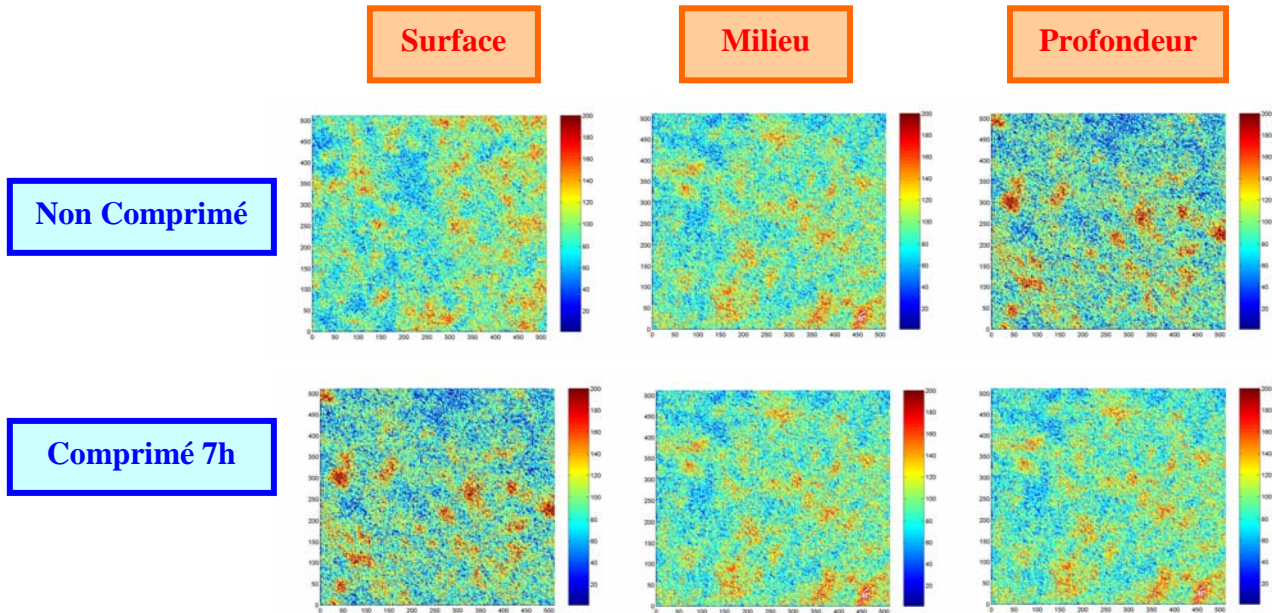


Figure 77 : Images SHG (Collection objectif x40, NA=0,8) pour des échantillons de cartilage non soumis à compression ou ayant supporté une contrainte mécanique de 1 MPa sinusoïdale (1/2 h ON, 1/2 h OFF) pendant 7 h. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Images acquises pour différentes régions de l'échantillon. Chaque image représente une zone de 87*87 μm^2 .

La Figure 78 illustre l'évolution de l' 'ASM' en fonction de la 'Correlation' pour deux échantillons (comprimés respectivement pendant 1 et 7 h) ainsi que pour leurs deux témoins correspondant. La comparaison doit s'effectuer pour des images acquises pour des zones identiques (c'est-à-dire à la surface de l'échantillon, au milieu ou en profondeur).

Le graphique montre clairement l'effet de la compression sur les deux paramètres de texture, à savoir l'augmentation de la valeur du paramètre de 'Correlation' accompagnée de la diminution du facteur d'homogénéité ('ASM'), et ce quelle que soit la région dans laquelle les images ont été acquises ('Surface', 'Milieu' ou 'Profondeur').

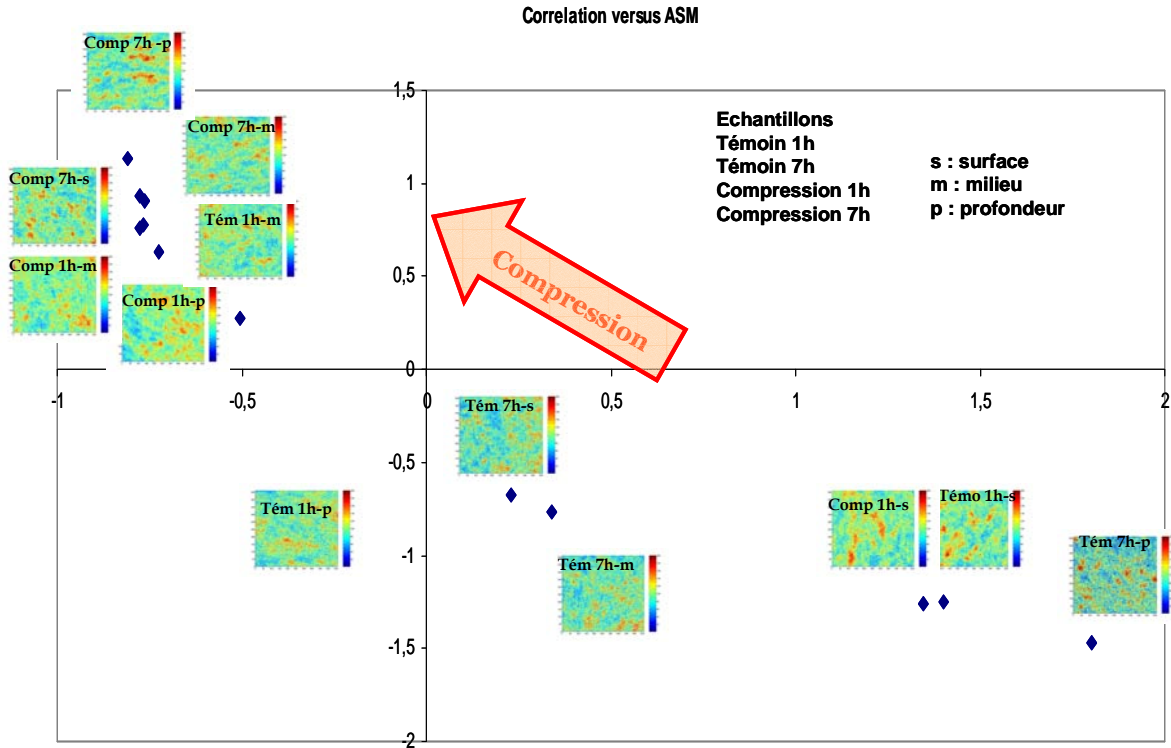


Figure 78 : Représentation de la 'Correlation' en fonction de l' 'ASM' calculée à partir d'images d'échantillons de cartilage non soumis à compression ou ayant supporté une contrainte mécanique de 1MPa sinusoïdale (1/2 h ON, 1/2 h OFF) pendant 1 ou 7 h. Images acquises pour différentes régions de l'échantillon. Chaque image représente une zone de 87*87 μm^2 . Données centrées réduites.

III.4.B.2. Effet d'une contrainte mécanique sur le réseau de collagène

Les images acquises pour des explants non comprimés présentent une texture qui diffère de celle d'images d'échantillons comprimés. En particulier, la valeur d' 'ASM' diminue accompagnée d'un facteur 'Correlation' plus élevé. Ces résultats tendent à prouver la présence de structures linéaires plus longues. Lorsque les fibrilles de collagène sont orientées pseudo aléatoirement, le signal SHG mesuré est faible et homogène. Au niveau des images, cela se traduit par peu de nombreuses et faibles variations locales de niveaux de gris.

Au contraire, lorsque les échantillons ont été soumis à compression, la densité de fibrilles augmente, conduisant à un signal SHG plus intense après excitation multiphoton. L'évolution de ces deux paramètres (diminution de l' 'ASM' + augmentation de la 'Correlation') suggère que les éléments générateurs de signal SHG sont plus proches les uns des autres, formant soit des agrégats de fibrilles, soit des nœuds. La faible valeur d' 'ASM' se traduit par un faible nombre de transitions de niveaux de gris.

La diminution du paramètre 'Contrast' suggérant une diminution du nombre de variations locales ainsi que l'augmentation du 'Sum Variance' appuient cette idée d'agrégation : les transitions entre niveaux de gris sont moins nombreuses, mais plus importantes. En effet, les nœuds ou agrégats de collagène émettent un signal très intense et se distinguent de zones où le collagène est moins dense ou est réparti de manière plus aléatoire. Cette interprétation confirmerait l'hypothèse émise par Broom sur la modification du réseau de Collagène [16,28].

Pour confirmer ces résultats, des images de microscopie électronique ont été acquises pour des échantillons soumis ou non à compression. La Figure 79 suggère un réseau collagénique plus dense lorsqu'une contrainte mécanique a été appliquée, ce qui tend à appuyer l'hypothèse émise suite à l'étude SHG..

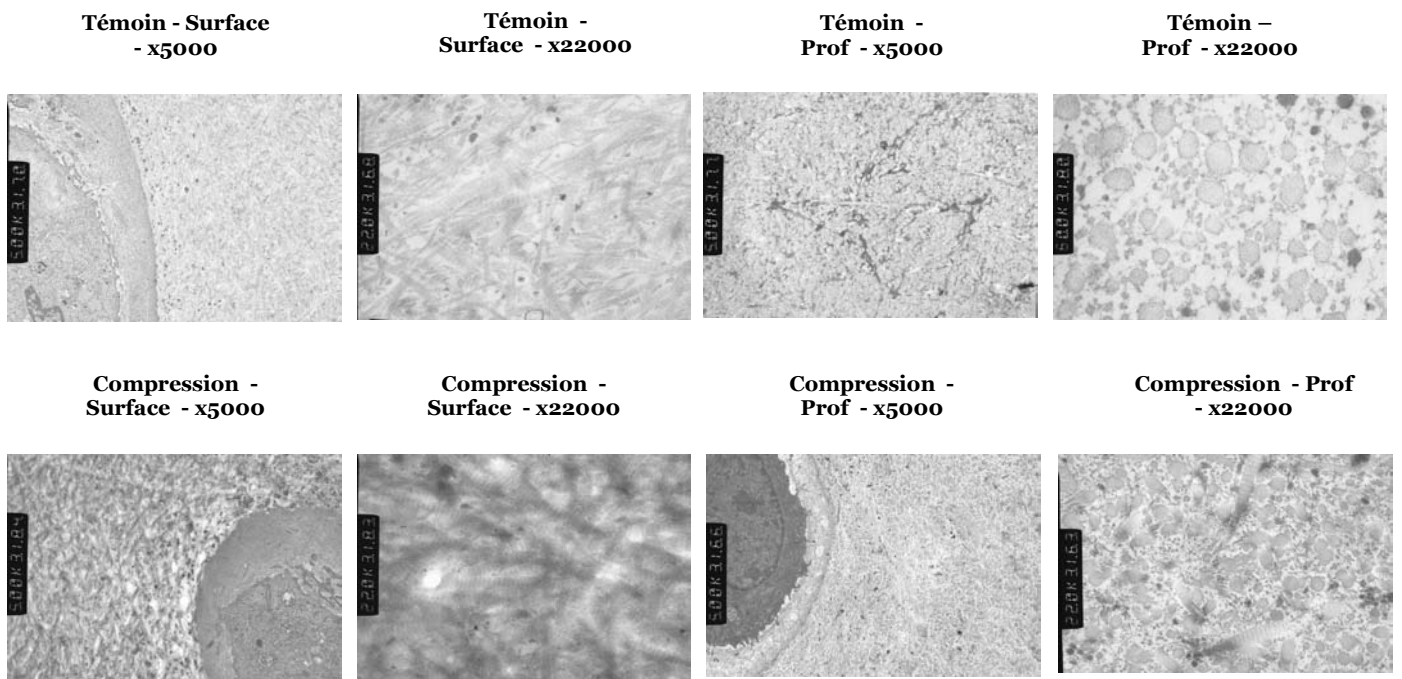


Figure 79 : Images MET d'explants de cartilage soumis ou non à contrainte mécanique.

Nous en avons déduit que le choix des paramètres d'homogénéité ('ASM') et de 'Correlation' est correct afin de caractériser les modifications de la MEC du cartilage (réorganisation du réseau collagénique).

III.4.B.3. Effet d'une contrainte mécanique de durée variable sur le réseau de collagène

Afin de compléter cette étude, nous avons mesuré l'évolution du signal SHG lorsque les échantillons étaient comprimés pendant des temps différents, croissants de 1 à 7 h (avec un pas de 2 heures). Comme les résultats précédents, les mêmes tendances sur l'évolution des paramètres ont pu être observées. En outre, une gradation se met en place : plus le temps de compression est long, plus les paramètres de texture d'image sont augmentés ('Correlation') ou diminués ('ASM'). Une seconde indication provient de l'intensité du signal SHG mesuré. Pour cette expérience, pour chaque durée, deux échantillons ont été prélevés dans la même zone : le premier n'a pas été comprimé et peut être considéré comme le témoin, le second a été soumis à une contrainte mécanique sinusoïdale de 1 MPa pendant des durées variables (1, 3, 5 et 7 h). De cette manière, on peut limiter les artefacts dus à une éventuelle inhomogénéité au sein de l'explant de cartilage complet.

La Figure 80 représente les rapports (Moyenne Echantillon témoin)/(Moyenne Echantillon Comprimé). Lors d'une compression pendant 1 h, le signal SHG apparaît environ 30% plus élevé que pour le témoin correspondant. Plus la durée d'application est longue, plus le signal mesuré croît pour atteindre une augmentation de 60% par rapport au témoin à 7 h de compression (Figure 80 a).

De même le paramètre 'ASM', témoin de l'homogénéité au sein de l'échantillon baisse lors de la compression. Plus la durée d'application de la contrainte est élevée, plus la diminution est marquée (Figure 80 b).

Pour résumer, lorsque les échantillons sont comprimés, le signal de SHG augmente en intensité (échantillon plus compact). Les images semblent moins homogènes, et présentent plus de différences de niveaux de gris, mais moins de transitions (moins de variations locales). La taille des éléments texturaux diminue, mais les structures linéaires semblent plus longues. Une explication possible est que les fibres s'agrègent, donnant naissance par endroits

à un signal SHG très intense par rapport au fond. Le signal du ‘fond’ (structure amorphe) correspond à une répartition aléatoire des fibrilles de collagène, et augmente en compression car l'échantillon devient plus compact.

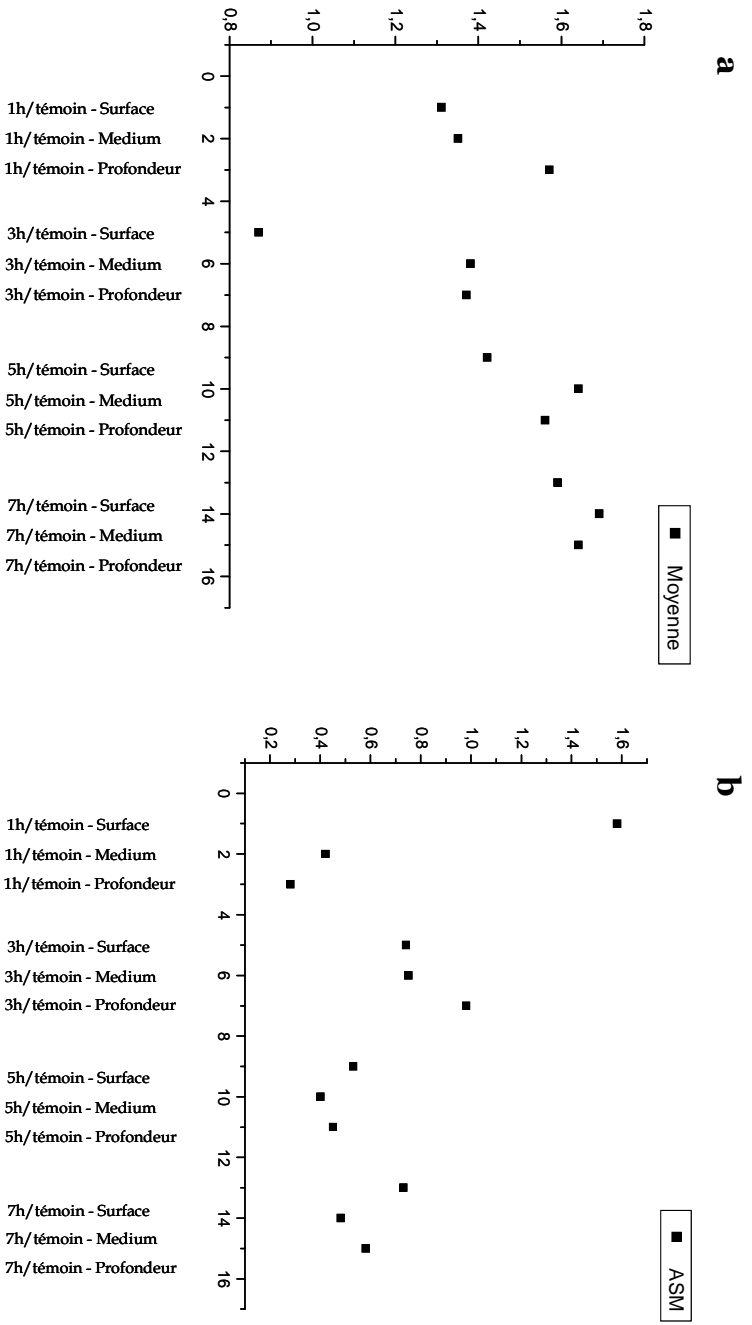


Figure 80 : Rapport Echantillon non comprimé/Echantillon comprimé de la moyenne d'intensité (a), et de l'ASM (b), Compression 1 MPa sinusoïdale, 1/2 h ON, 1/2 h OFF pendant respectivement 1, 3, 5 et 7 h.

Le Tableau 17 résume les écarts constatés au niveau des paramètres texturaux calculés pour les expériences ci-dessus, et pour chacune des zones étudiées. Les paramètres les plus sensibles à la compression sont l'ASM (homogénéité), le 'Contrast' (nombre de transitions locales), la 'Correlation' (structures linéaires) et la moyenne du signal mesuré.

Analyse Compression en fonction du temps - 'Surface'	Ecart Type (%)	100*(max-min)/max
Angular Second Moment	150	97
Contrast	45	81
Correlation	40	211
Variance	1	3
Inverse Difference Moment	11	33
Sum Average	4	13
Sum Variance	8	24
Sum Entropy	3	13
Entropy	8	34
Moyenne	34	64

Analyse Compression en fonction du temps - 'Milieu'	Ecart Type (%)	100*(max-min)/max
Angular Second Moment	145	97
Contrast	72	87
Correlation	48	340
Variance	2	7
Inverse Difference Moment	8	23
Sum Average	9	28
Sum Variance	17	49
Sum Entropy	2	6
Entropy	10	37
Moyenne	40	76

Analyse Compression en fonction du temps - 'Profondeur'	Ecart Type (%)	100*(max-min)/max
Angular Second Moment	112	96
Contrast	55	83
Correlation	45	238
Variance	2	7
Inverse Difference Moment	6	21
Sum Average	9	27
Sum Variance	16	45
Sum Entropy	2	8
Entropy	9	35
Moyenne	38	71

Tableau 17 : Ecart mesurés pour les paramètres texturaux calculés à partir d'images acquises pour des durées de compression variables (1, 3, 5 et 7 h) (a) 'Surface' (b) 'Milieu' (~300 µm sous la surface) et (c) 'Profondeur' (~600 µm sous la surface) à raison de 5 images par zone.

III.4.C. Comparaison des effets d'une contrainte enzymatique ou mécanique sur le réseau de collagène – Classification ACP

Nous avons ensuite comparé l'influence de la Collagénase (action enzymatique) et de la compression (action mécanique). Le Tableau 18 résume l'évolution des paramètres de texture que nous avons mesurés sur différents explants de cartilage. Lorsque l'on se déplace en profondeur, ou lorsque les échantillons ont été incubés avec de la Collagénase, on observe une diminution des paramètres 'IDM', 'Correlation', 'Sum Average', 'Sum Variance' et 'Moyenne' du signal. Cependant, l' 'ASM', le 'Contraste', et la 'Variance' augmentent avec une tendance inverse d'évolution lorsque les échantillons sont soumis à compression.

La Figure 81 représente l'évolution de la 'Correlation' et de la moyenne du signal SHG en fonction de l' 'ASM' pour des images de cartilage ayant supporté différentes contraintes : soit une incubation avec de la Collagénase pendant 1, 2 ou 3 h ; soit une contrainte mécanique de compression (1 MPA, 1 Hz) pendant 1, 3, 5 ou 7 h.

Les valeurs représentées correspondent au ratio r du paramètre textural calculé sur un échantillon soumis à contrainte sur le paramètre calculé à partir du témoin correspondant (explant prélevé dans la même zone). Cette manière de procéder nous a permis de limiter les effets qui auraient pu résulter d'une inhomogénéité au sein de l'échantillon complet (condyle d'une tête fémorale de patient).

La première indication visible sur les graphiques de la Figure 81 est l'augmentation de la moyenne du signal SHG lorsque les échantillons sont soumis à compression ($r > 1$) et une diminution suite à l'action de la Collagénase ($r < 1$). L'intensité du signal croît progressivement lorsque l'échantillon a subi une contrainte mécanique, jusqu'à être doublé lorsque la durée de compression atteint 7 h. Lors d'une incubation avec la Collagénase, la quantité de signal SHG mesurée diminue au cours du temps et se trouve divisée par 3 après 3 h d'incubation.

De la même manière, le paramètre d'homogénéité, l' 'ASM' diminue dans le cas de la compression ($r < 1$) et augmente jusqu'à se trouver doublé lors de l'action enzymatique ($r > 1$). La 'Correlation' est multipliée par 3 dans le cas d'une compression de 7 h et divisée par 2 suite à l'incubation de 3 h avec la Collagénase.

Cette comparaison nous permet de supposer un effet différent entraîné par l'application des différentes contraintes. Dans le cas d'une incubation avec la Collagénase, le signal SHG disparaît progressivement, suggérant une action enzymatique au niveau moléculaire du Collagène. L'action enzymatique permet de 'couper' ('cleavage') la molécule de collagène ([181]). La molécule ainsi dénaturée génère moins de signal SHG et le signal restant s'apparente à un fond homogène, avec une répartition aléatoire des fibres restantes. Les transitions entre niveaux de gris sont nombreuses mais peu marquées. L'évolution des paramètres est identique lorsqu'on mesure le signal au niveau de zones plus profondes du cartilage.

Au contraire, l'application d'une contrainte compressive entraîne une perte d'homogénéité au niveau de l'image. Des éléments texturaux plus longs s'isolent mieux du fond. Les transitions entre niveaux de gris sont moins importantes, mais plus marquées. En parallèle, on observe une augmentation du signal de 'fond'. Le réseau de collagène paraît globalement plus dense, plus compact avec par endroits une apparition d'agrégats de fibres émettant un signal très intense. Le réseau de Collagène ne serait dans ce cas pas dénaturé, mais remodelé.

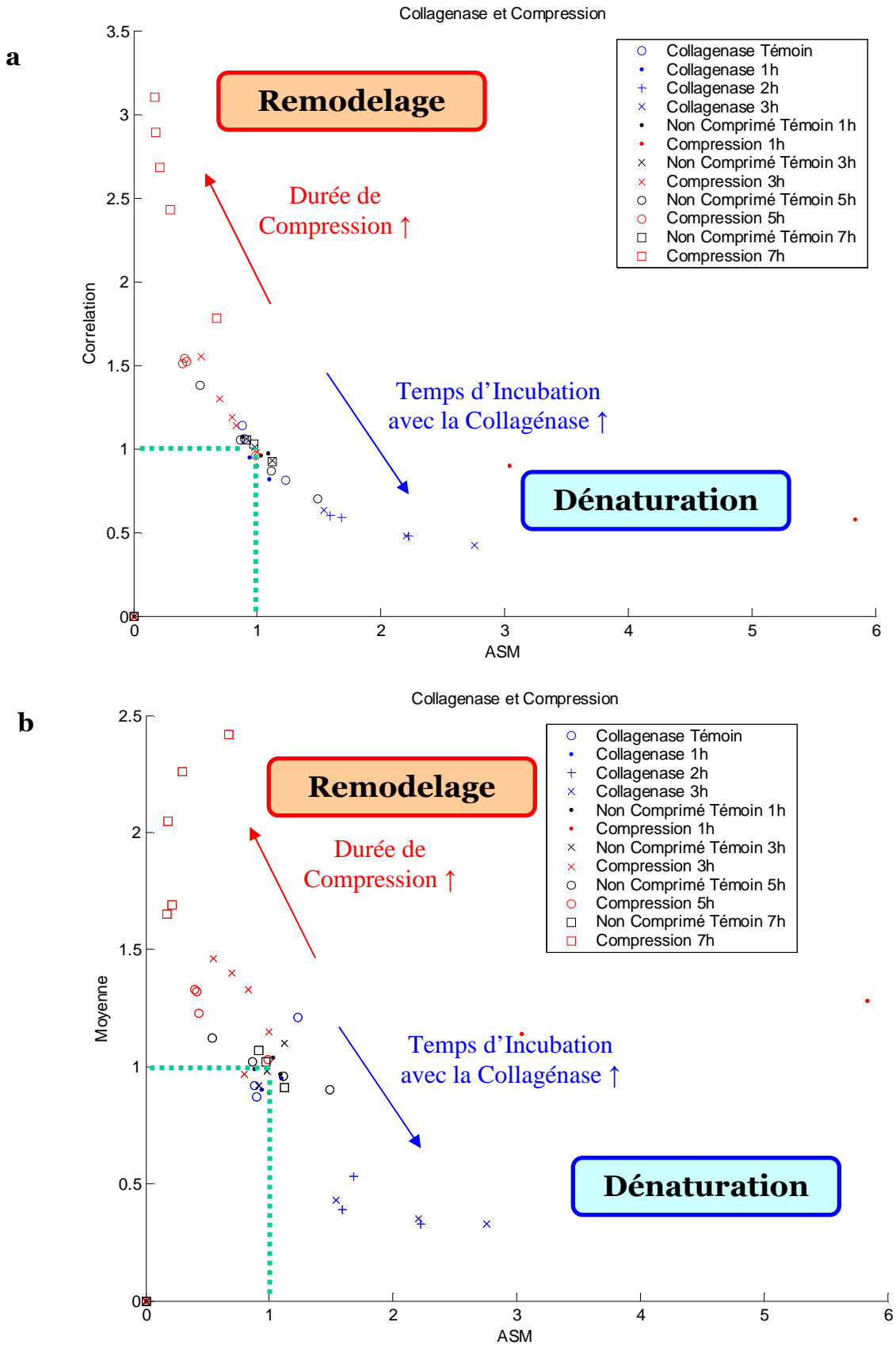


Figure 81 : Evolution des paramètres 'Correlation' (a) et 'Moyenne' (b) en fonction de l'ASM'. Paramètres de texture calculés pour des échantillons incubés avec de la Collagénase (1h, 2h et 3h), ou soumis à compression (1 MPa, 1 Hz, 1, 3, 5 ou 7 h). Chaque valeur correspond au ratio (Echantillon traité)/(Echantillon non traité).

	Compression	Interprétation	Profondeur	Collagénase	Interprétation
Angular Second Moment	↓	- de transitions entre niveaux de gris	↑	↑	nombreuses transitions entre niveaux de gris
Contrast	↓	- de variations locales	↑	↑	beaucoup de variations locales
Correlation	↑ en valeur absolue	Structures linéaires	↓ en valeur absolue	↓ en abs	peu de structures linéaires
Variance	↓	- de variations locales	↑	↑	beaucoup de variations locales
Inverse Difference Moment	↓	Plus petits éléments texturaux	↑	↓	larges éléments texturaux
Sum Average	↑	Intensité du signal plus élevée	↓	↓	intensité du signal plus faible
Sum Variance	↑	Variations locales plus marquées	↓	↓	variations locales - marquées
Sum Entropy	↓ -∞		↓ -∞		
Entropy	↑ 0	Organisation	↓ -∞	↓ -∞	répartition pseudo-aléatoire
Moyenne	↑	Intensité du signal plus élevée	↓	↓	perte de l'intensité du signal

Tableau 18 : Evolution des paramètres texturaux (Haralick) lorsque les échantillons sont soumis à compression mécanique (1 MPa, sinusoïdale, intermittente ½ ON, ½ h OFF) ; en profondeur ; après incubation avec de la Collagénase. Les zones grisées représentent les paramètres qui varient très peu (Ecart type <7%).

Comme le nombre de paramètres étudiés est important, nous avons utilisé une méthode statistique d'Analyse en Composantes Principales (ACP) afin de mieux discriminer les différentes populations (soumises ou non à contrainte enzymatique ou mécanique). L'objectif de cette méthode statistique est de projeter les données sur un espace 2D tout en tenant compte de tous les paramètres étudiés et en obtenant une dispersion optimale du nuage de points. Chaque axe du diagramme ACP représente une combinaison linéaire de tous les paramètres.

Ainsi, pour le diagramme de la Figure 82, l'axe des abscisses est principalement affecté par la valeur de l' 'ASM', la 'Correlation' et la 'Moyenne'. Les contributions des paramètres sont quasiment équivalentes pour la détermination de l'axe des ordonnées, avec une légère prépondérance pour la 'Correlation' et la 'Moyenne'.

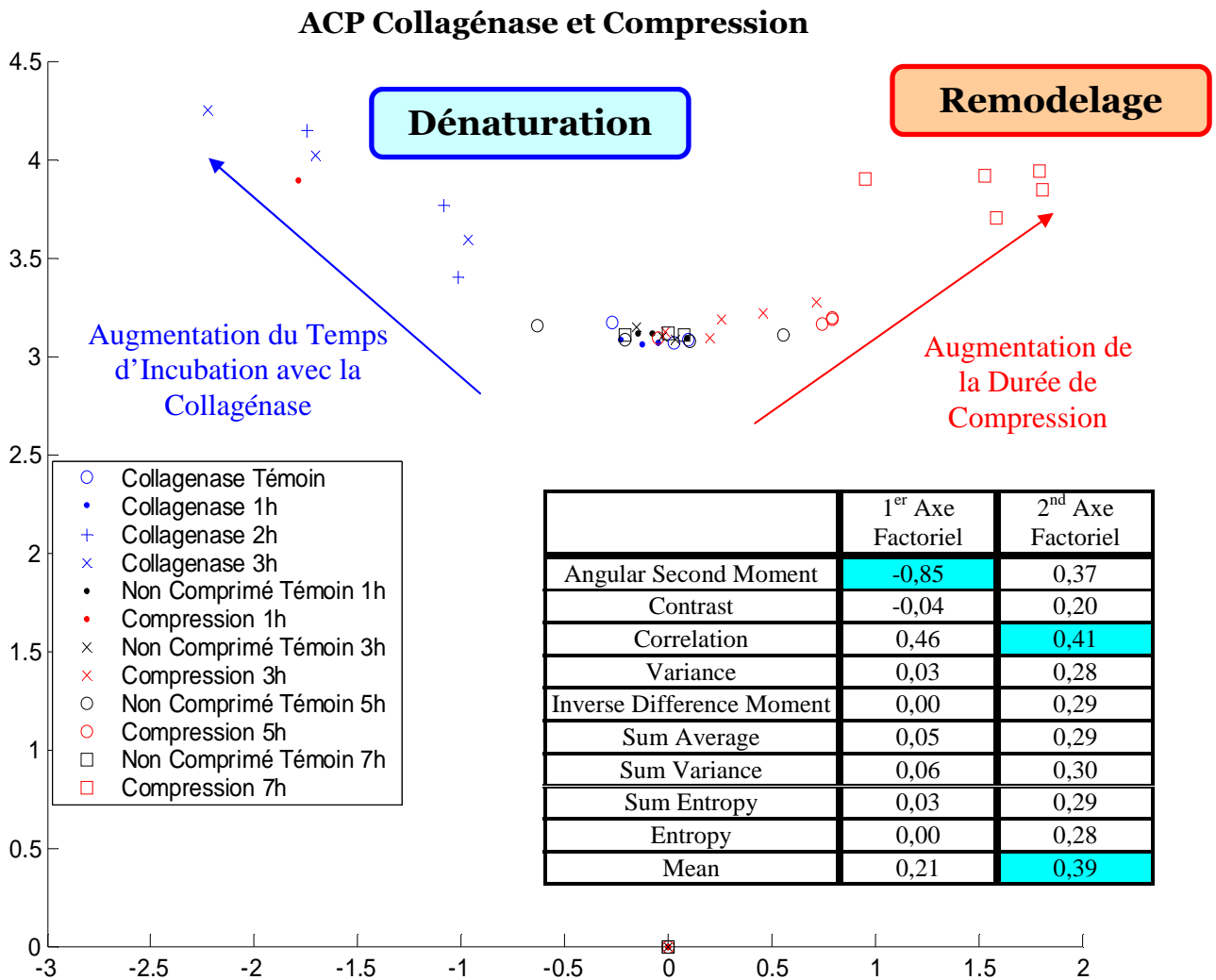


Figure 82 : Diagramme ACP représentant les paramètres texturaux calculés à partir d'images SHG. Echantillons soumis à l'action de la Collagénase (1, 2 ou 3 h) ou à contrainte de compression dynamique (1 MPa, 1 Hz, pendant 1, 3, 5 ou 7 h). Le tableau à droite indique la contribution de chaque paramètre pour la détermination des axes factoriels.

Les axes ainsi déterminés nécessitent une interprétation biologique basée sur l'évolution des paramètres de texture et leurs contributions respectives sur les deux axes factoriels.

L'augmentation de la durée de la compression entraîne un décalage du nuage de points vers le haut et la droite. Selon l'interprétation que nous avons proposée (Figure 83), cette zone du graphique correspond à des paramètres de 'Moyenne' et 'Correlation' les plus élevés (parmi nos mesures) et des valeurs d''ASM' faibles. Biologiquement, nous avons interprété ces constations comme une compaction de l'échantillon accompagnée d'une agrégation de fibres de collagène dans certaines zones.

L'incubation des échantillons avec la Collagénase entraîne un décalage du nuage de points vers la partie supérieure gauche du diagramme ACP caractérisée par une forte homogénéité ('ASM' élevé), un faible signal (Moyenne faible), et peu de structures linéaires. Le signal SHG tend à disparaître et à être réparti plus aléatoirement au niveau de la MEC.

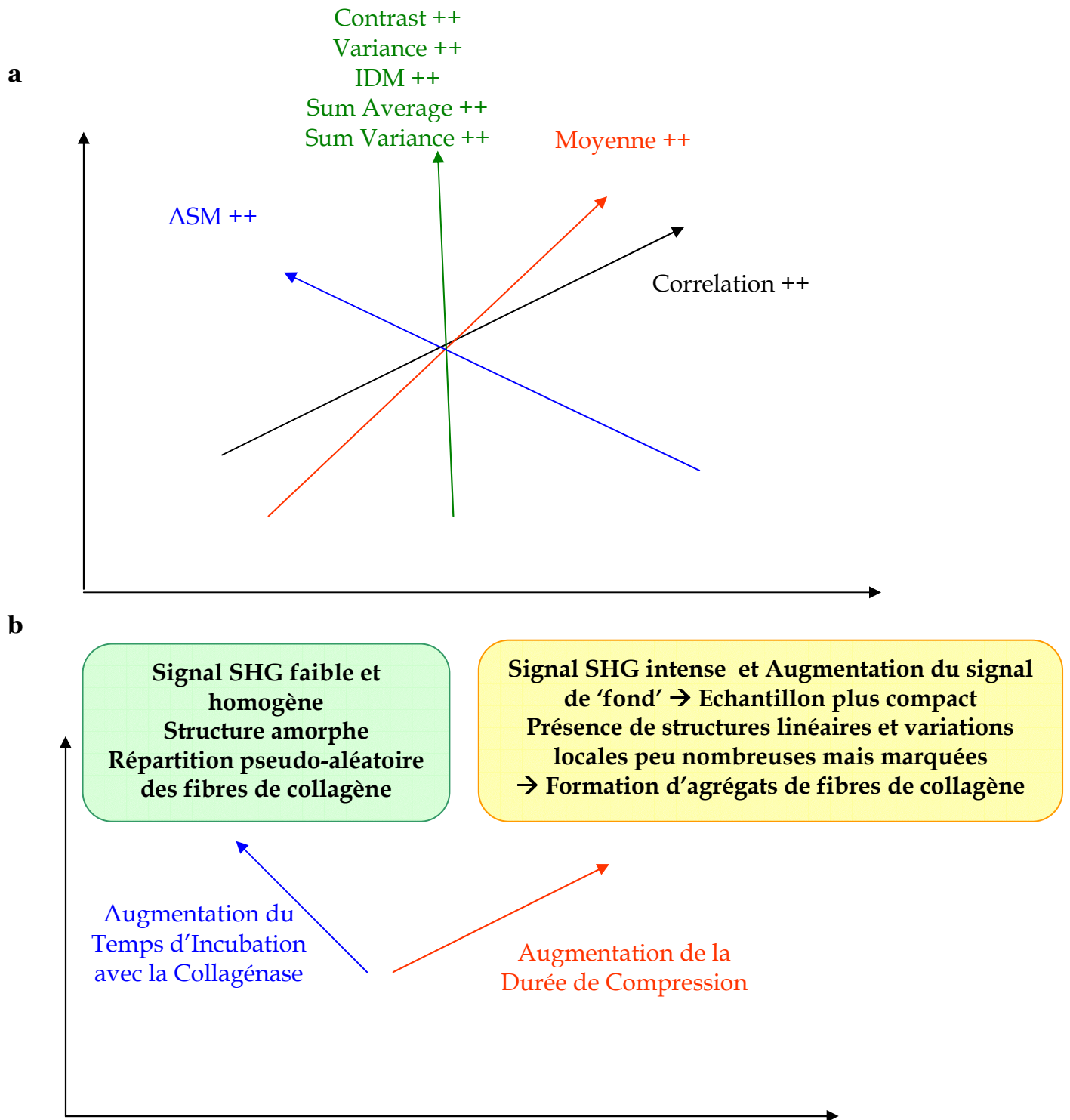


Figure 83 : Interprétation des axes du diagramme ACP de la Figure 82. (a) Evolution des différents paramètres de texture sur l'espace 2D engendré par la méthode ACP. (b) Interprétation biologique des axes du diagramme ACP.

Pour conclure, les deux paramètres choisis au départ ('ASM' et 'Correlation') expriment bien les variations de structure (remodelage ou dénaturation) des réseaux de collagène de la MEC du cartilage suite à l'application de contraintes environnementales enzymatiques (Collagénase) ou mécaniques (compression). La classification ACP permet de mieux encore discriminer les échantillons bien que les deux principaux axes factoriels s'appuient beaucoup sur ces deux paramètres.

III.4.D. Etude du Collagène VI de la matrice péricellulaire

Dans certaines loges de chondrocytes, nous avons pu observer un signal SHG intense. Or, différentes techniques de marquage ont déjà montré la présence de collagène VI au niveau de la matrice péricellulaire de chondrocytes.

Nous avons donc procédé à un marquage immunologique du Collagène VI par anticorps fluorescent et combiné l'imagerie de fluorescence avec l'imagerie SHG pour montrer que le signal mesuré provient effectivement du Collagène VI. Cette molécule représente un marqueur de dégradation du cartilage, puisqu'on le retrouverait en quantité plus importante dans les cartilages arthrosiques. Mais le collagène VI témoignerait également du phénomène de mécanotransduction et pourrait alors représenter un marqueur de validation de constructions tissulaires. L'imagerie par SHG est plus rapide et simple à mettre en œuvre que la technique de marquage par Anticorps invasive qui nécessite au préalable une digestion enzymatique de la MEC.

Nous avons suivi spectralement et par imagerie des durées de vie de fluorescence les différentes étapes du marquage du collagène VI de la matrice péricellulaire : t_0 : avant traitement ; t_1 : Incubation de 30 minutes avec la Hyaluronidase ; t_2 : Incubation de 30 minutes avec la Chondroitinase ; t_3 : Marquage Anticorps Anti-Collagène VI ; t_4 : Marquage Anticorps II Alexa 488. Les spectres d'autofluorescence et de l'Alexa 488 sont très proches et présentant un chevauchement important, le premier présentant un pic à 490 nm, le second à 525 nm. Au niveau de la matrice péricellulaire, on observe un décalage du spectre lors du marquage avec l'Alexa 488 au niveau de la matrice péricellulaire, mais non au niveau de la matrice extracellulaire (Figure 84). Cela prouve la présence de collagène VI dans la première zone.

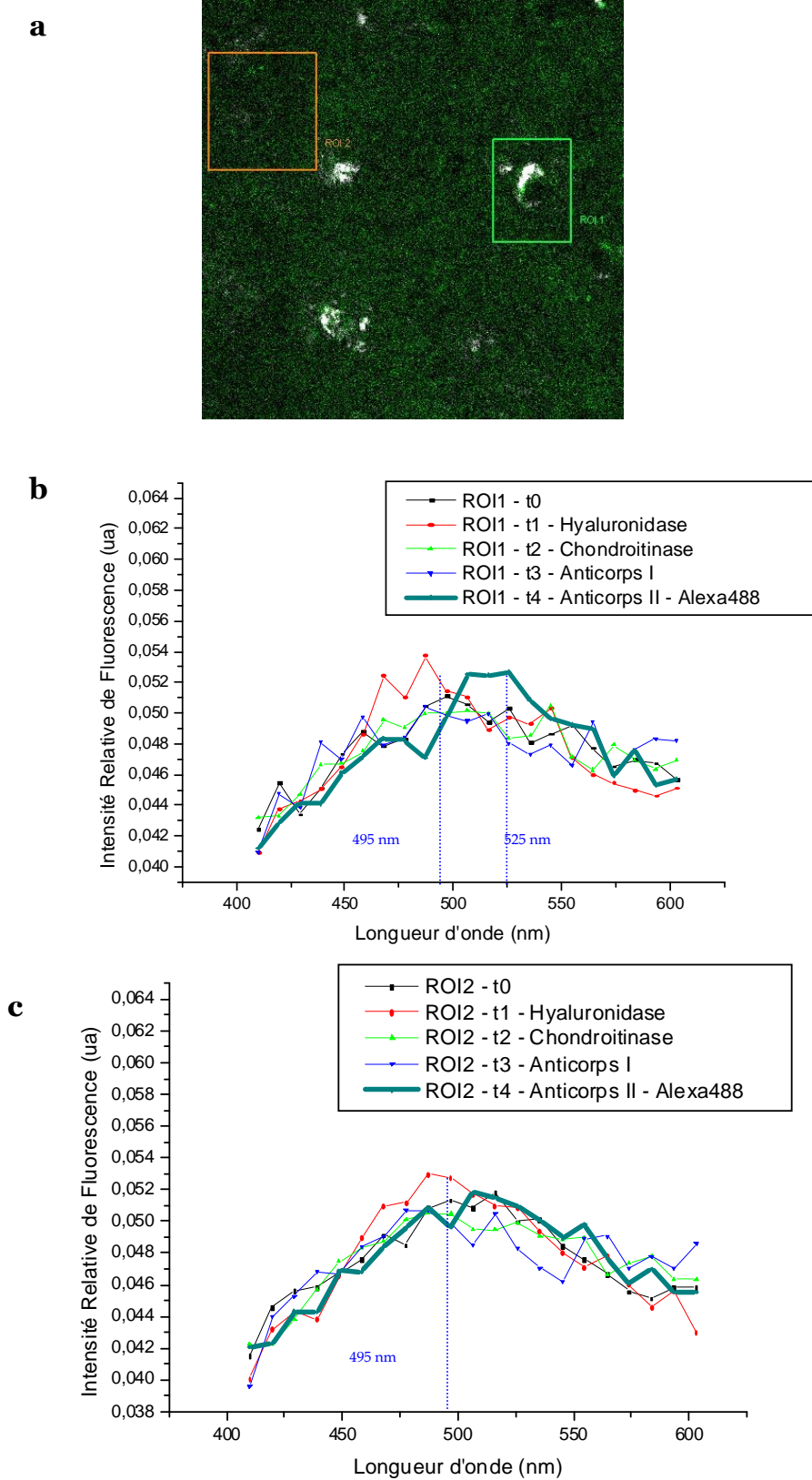


Figure 84 : Spectre de fluorescence mesuré pour une ROI1 (a,b) située au niveau de la matrice péricellulaire d'un chondrocyte et pour une ROI2 (a,c) sélectionnée dans la matrice extracellulaire pour les différentes étapes du marquage du Collagène VI par l'Alexa 488.

En reprenant plus en détail la première région d'intérêt après le marquage à l'Alexa 488, nous avons obtenu les résultats présentés sur la Figure 85. Le spectre du signal de fluorescence mesuré au niveau des loges est décalé vers 525 nm, que celles-ci émettent ou non un signal SHG détectable, attestant la présence de Collagène VI révélé par l'Alexa 488.

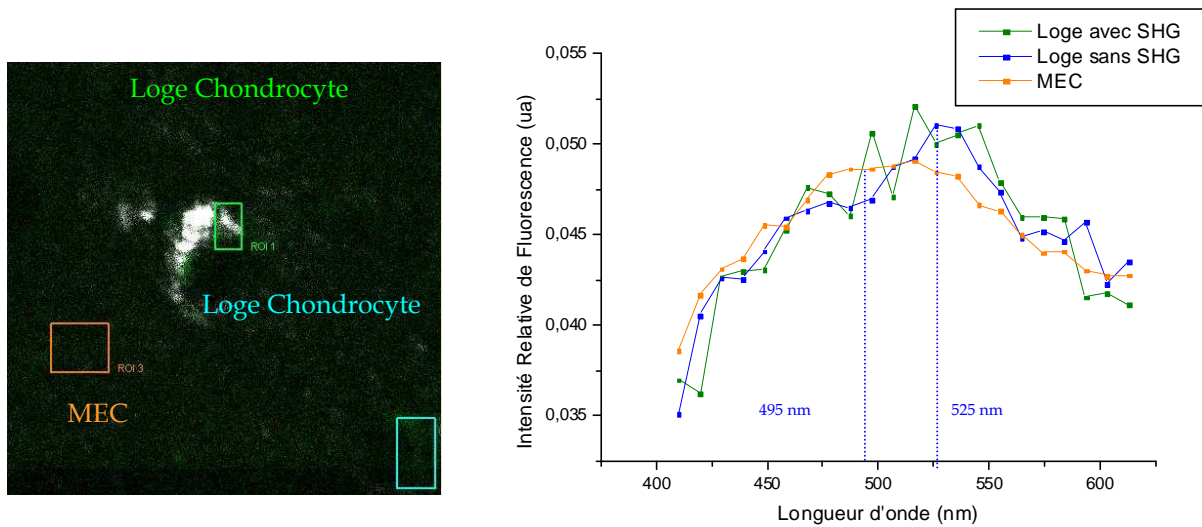


Figure 85 : Spectres de fluorescence mesurés pour différentes régions d'intérêt. ROI1 : Loge émettant un signal SHG ; ROI2 : Loge n'émettant pas de signal SHG ; ROI3 : MEC.

Afin de quantifier la corrélation existant entre les signaux SHG et de fluorescence mesurés au niveau d'une loge, nous avons réalisé des projections sur l'axe des abscisses d'une zone de taille $41 \times 38 \mu\text{m}^2$ (112×112 pixels²).

Pour chacun des signaux (SHG et fluorescence), nous avons tracé cinq profils (Figure 86 et Figure 87), correspondant chacun à une des étapes du marquage du Collagène VI avec l'Alexa 488 (avant le marquage, après 30 minutes d'incubation avec la Hyaluronidase, après 30 minutes d'incubation avec la Chondroitinase, après l'adjonction du premier Anticorps et après le marquage Alexa 488).

Nous pouvons constater que le signal de fluorescence est quasiment nul jusqu'à la dernière étape du marquage (ajout de l'Alexa 488). En revanche, nous pouvons observer un pic correspondant à la partie gauche de la loge dès l'ajout du fluorophore (Figure 86).

Le profil correspondant au signal SHG présente toujours la même allure, et le même ordre de grandeur d'intensité. Comme pour le signal de fluorescence, le pic observé correspondait au signal intense mesuré dans la partie gauche de la loge du chondrocyte (Figure 87).

En comparant ensuite les profils obtenus par projection des signaux acquis respectivement à partir des images SHG et de fluorescence après le marquage, nous constatons que l'allure des signaux est identique, avec les pics correspondants à la loge (Figure 88).

Nous avons mesuré les coefficients de corrélation entre les profils pris deux à deux. Le Tableau 19 regroupe l'ensemble des résultats et il montre bien que les signaux SHG sont fortement corrélés entre eux ($r > 0,89$ dans tous les cas). Les enzymes n'ont pas d'action par rapport à l'émission de ce signal : il reste constant au cours du temps.

Les profils correspondant aux signaux de fluorescence des différentes conditions (hyaluronidase, chondroitinase, fluorescence Alexa 488) ne sont pas corrélés entre eux : dans la matrice extracellulaire, le signal d'autofluorescence est très faible. Il s'apparente à un 'bruit de fond' homogène, mais correspond bien à un signal émis par la matrice puisque dans la lacune son niveau est nul. Par ailleurs, le tracé des spectres montre que ce signal ne correspond pas à une fuite de signal SHG dans le canal de collection de la fluorescence. Après la détection du Collagène VI avec l'Alexa 488, le profil du signal de fluorescence est fortement corrélé avec le profil SHG ($r \sim 0,7$), attestant d'une colocalisation de ces deux signaux.

Pour résumer ces résultats, le signal d'autofluorescence du cartilage est faible sous excitation MP à 800 nm. La détection du Collagène VI par l'Alexa 488 met en évidence la présence de cette molécule au niveau de la matrice péricellulaire. Le signal SHG émanant de la loge est présent avant le marquage et se superpose au signal de fluorescence suite au marquage. Cela prouve la présence de collagène VI révélée par le marquage spécifique Anticorps-Alexa 488, et la possibilité de détecter en SHG ce collagène VI.

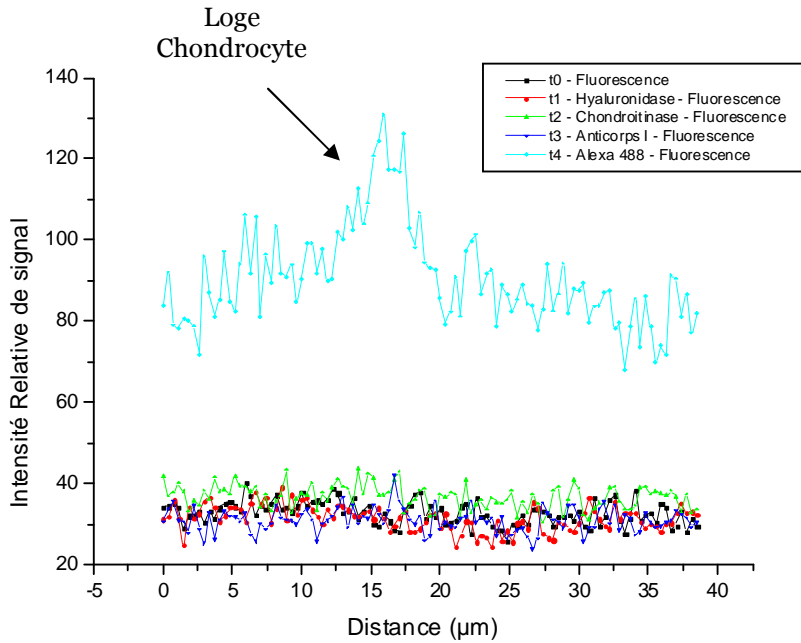


Figure 86 : Projections sur l'axe des abscisses des images correspondant au signal de fluorescence mesuré après les différentes étapes du marquage du Collagène VI par l'Alexa 488.

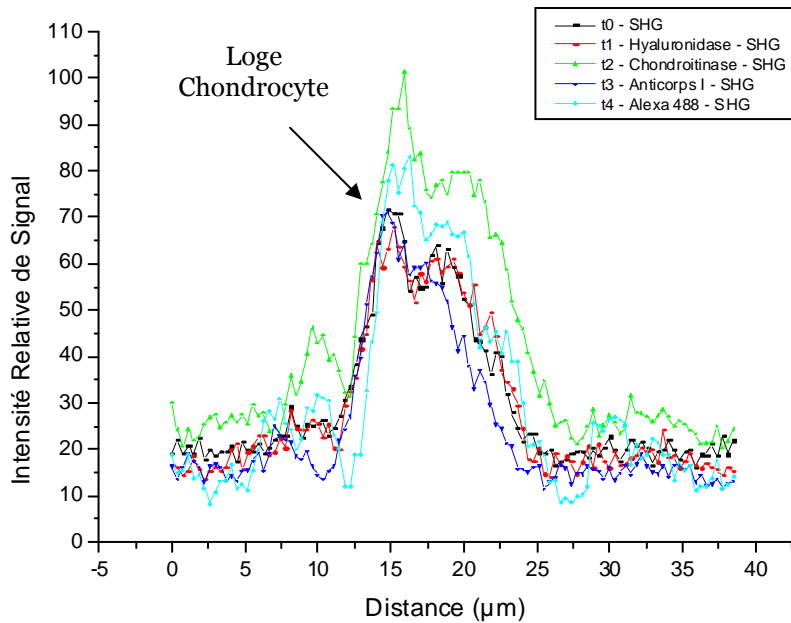


Figure 87 : Projections sur l'axe des abscisses des images correspondant au signal SHG mesuré après les différentes étapes du marquage du Collagène VI par l'Alexa 488.

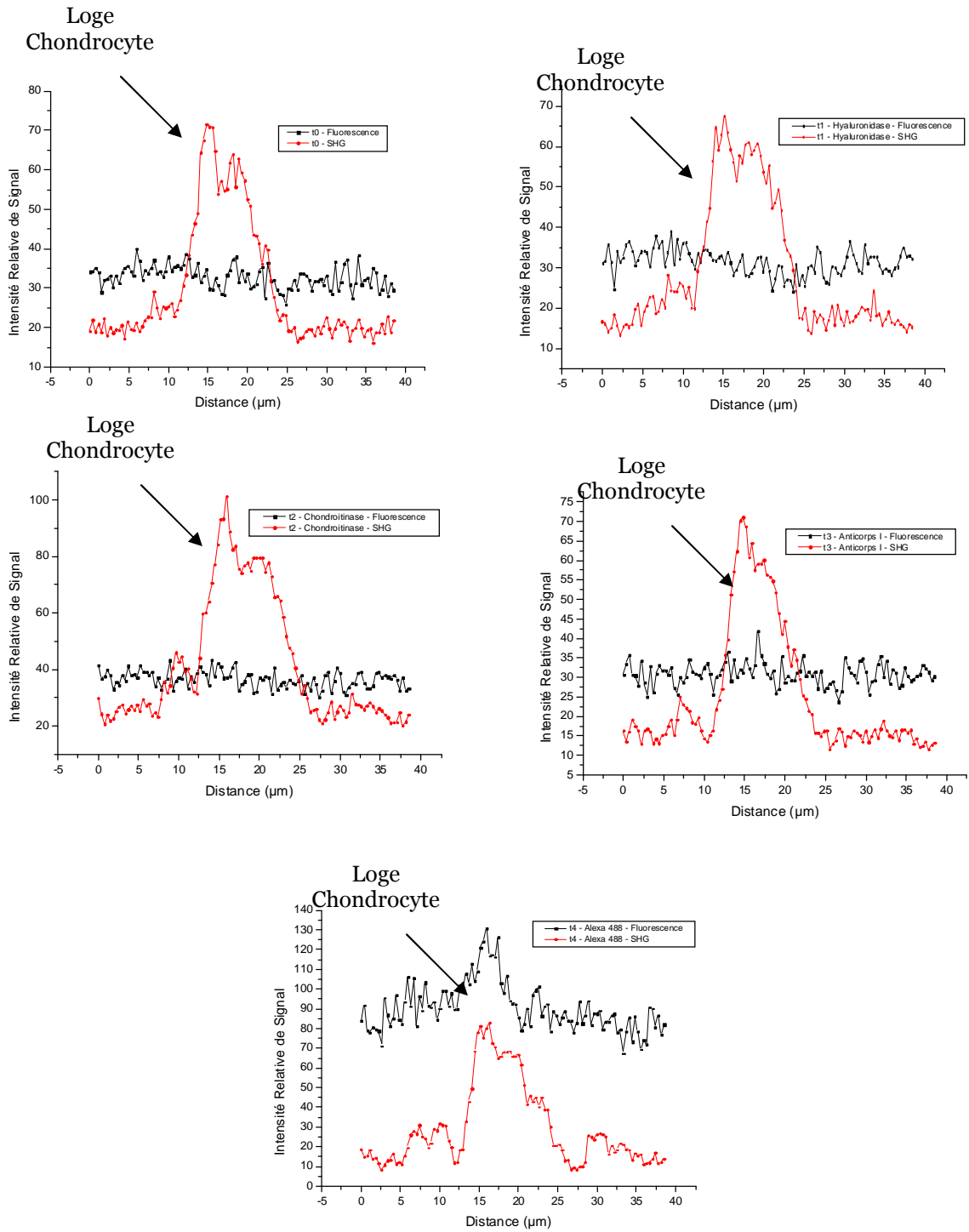


Figure 88 : Projections sur l'axe des abscisses des images correspondant aux signaux SHG et de fluorescence mesurés pour chaque étape du marquage du Collagène VI par l'Alexa 488.

	t0 Fluo	t0 SHG	t1 Hyaluronidase Fluo	t1 Hyaluronidase SHG	t2 Chondroitinase Fluo	t2 Chondroitinase SHG	t3 AnticorpsI Fluo	t3 AnticorpsI SHG	t4 Alexa488 Fluo	t4 Alexa488 SHG
t0 - fluo	1,00	0,03	0,24	0,05	0,12	-0,03	0,04	0,05	0,09	-0,05
t0 - SHG	0,03	1,00	-0,08	0,97	0,17	0,95	0,23	0,97	0,71	0,92
t1 Hyaluronidase - fluo	0,24	-0,08	1,00	-0,12	0,03	-0,17	-0,05	-0,05	0,06	-0,13
t1 Hyaluronidase - SHG	0,05	0,97	-0,12	1,00	0,17	0,96	0,22	0,94	0,68	0,92
t2 Chondroitinase - fluo	0,12	0,17	0,03	0,17	1,00	0,12	0,15	0,23	0,26	0,10
t2 Chondroitinase - SHG	-0,03	0,95	-0,17	0,96	0,12	1,00	0,21	0,89	0,68	0,94
t3 AnticorpsI - fluo	0,04	0,23	-0,05	0,22	0,15	0,21	1,00	0,24	0,31	0,20
t3 AnticorpsI - SHG	0,05	0,97	-0,05	0,94	0,23	0,89	0,24	1,00	0,74	0,89
t4 Alexa488 - fluo	0,09	0,71	0,06	0,68	0,26	0,68	0,31	0,74	1,00	0,68
t4 Alexa488 - SHG	-0,05	0,92	-0,13	0,92	0,10	0,94	0,20	0,89	0,68	1,00

Tableau 19 : Coefficients de corrélation entre les profils obtenus à partir des projections sur l'axe des abscisses des images correspondant aux signaux SHG et de fluorescence mesurés pour chaque étape du marquage du Collagène VI par l'Alexa 488.

La Figure 89 représente le cytogramme de corrélation entre les profils SHG mesurés pour la même loge de chondrocytes après les différents traitements enzymatiques qu'a subi l'échantillon pour la détection du collagène VI avec l'Alexa 488.

Tous les profils ont été tracés en fonction du profil témoin (sans traitement). On constate que les données s'ajustent bien avec la droite $f(x)=x$, autrement dit, les signaux mesurés sont quasiment identiques.

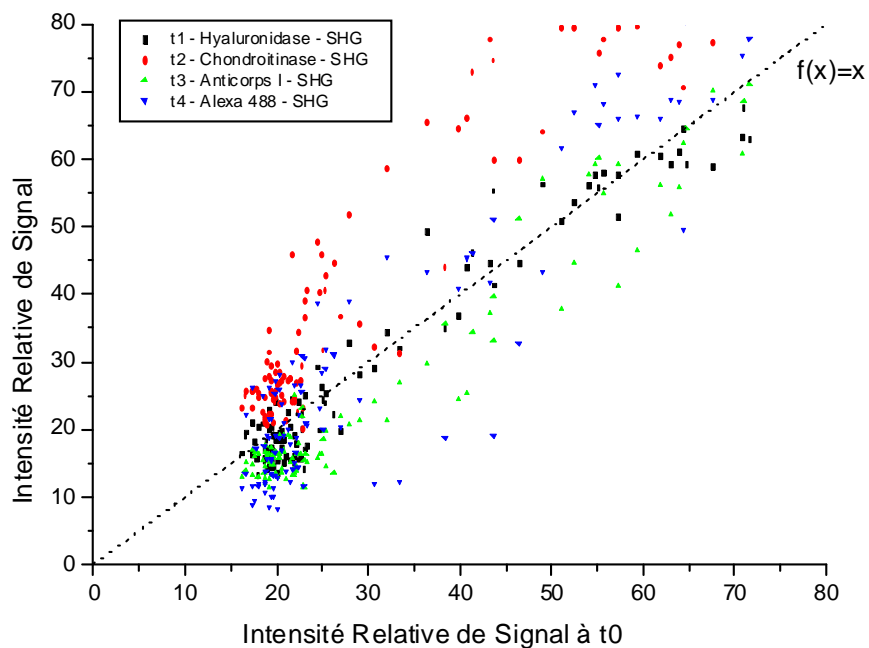


Figure 89 : Représentation de la corrélation pour des profils de projection d'images SHG mesurés après les différentes étapes du marquage avec l'Alexa 488 avec le profil tracé avant le marquage. L'ajustement avec la droite $f(x)=x$ montre que le signal SHG émanant de la loge des chondrocytes n'est pas affecté par l'action de la hyaluronidase et de la chondroitinase.

Pour constater la colocalisation des signaux de SHG et de fluorescence de l'Alexa 488 (révélation du Collagène VI) sur les images complètes, nous avons utilisé le logiciel Matlab. Pour chaque image (SHG et fluorescence, à chaque étape du marquage), l'application d'un filtre médian, puis d'une fonction de binarisation a permis d'obtenir une matrice de 512*512 pixels constituée de valeurs logiques (0 ou 1). Le seuil de binarisation appliqué (0,25), correspond au quart du signal maximal et permet d'éliminer le 'bruit de fond' ou la faible autofluorescence de la MEC. L'opérateur 'AND' nous a permis par la suite de repérer les zones où l'on pouvait mesurer à la fois un signal SHG et un signal de fluorescence (Figure 90). Après l'action des enzymes (Hyaluronidase et Chondroitinase) et le marquage avec l'Anticorps primaire, quelques pixels seulement correspondent à une présence simultanée de signaux SHG et de fluorescence. Après le marquage avec l'Alexa 488, il apparaît une forte colocalisation de ces deux signaux.

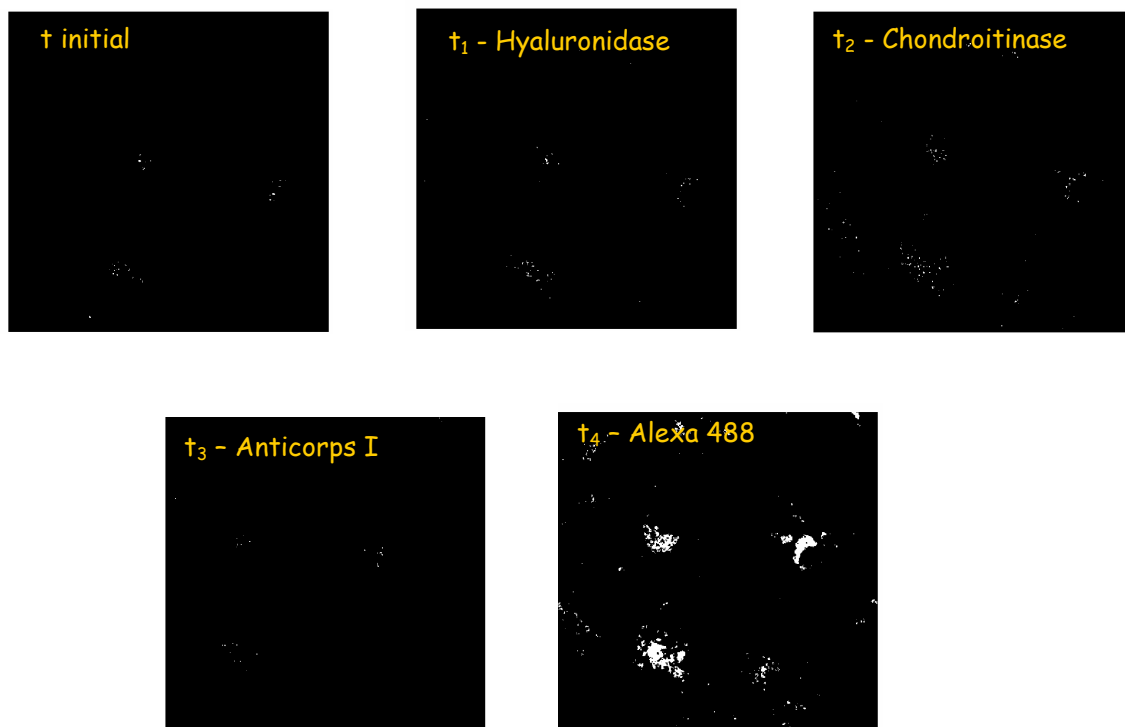


Figure 90 : Colocalisation des signaux de fluorescence et SHG aux différentes étapes du marquage du Collagène VI par l'Alexa 488. Binarisation des images de SHG et de Fluorescence, puis application de l'opérateur 'AND'.

De plus, nous avons comparé les temps de vie de fluorescence collectée au niveau de ces trois différentes zones (loge avec ou sans SHG et MEC) pour les différentes étapes du marquage.

- la première correspondant à une loge de chondrocyte dans laquelle un signal SHG est mesurable ;
- la seconde où l'on ne mesure pas de signal SHG ;
- la troisième sélectionnée dans la MEC.

Les courbes de déclin ont été ajustées via le logiciel SPCImage selon un modèle biexponentiel ($F(t) = a_1 \cdot \exp(-t/\tau_1) + a_2 \cdot \exp(-t/\tau_2)$).

Nous avons constaté que lorsqu'un signal SHG et un signal de fluorescence sont simultanément présents dans la matrice péri-cellulaire, la constante de déclin moyenne ($\tau_m = a_1 \cdot \tau_1 + a_2 \cdot \tau_2$) est beaucoup plus faible que dans les zones où l'on n'a pas pu mesurer de signal SHG. Ce résultat est en partie expliqué par l'apparition d'une composante τ_1 faible (<200 ps) en proportion importante (valeur a_1 atteignant 80%) et nous laisse supposer qu'une faible partie du signal SHG est émise 'vers l'arrière' et détectée par le PM utilisé dans le cadre d'acquisition FLIM. En revanche, cette partie du signal est trop faible pour être mesurée avec les détecteurs classiquement utilisés en mode confocal.

Pour la zone péri-cellulaire n'émettant pas de signal SHG, l'ajustement biexponentiel des courbes de déclin présente également une composante courte ($\tau_1 < 400$ ps), mais d'une influence plus modérée ($a_1 < 40\%$). La superposition des courbes de déclin provenant des 3 ROIs différentes montre clairement l'influence de la première composante d'ajustement (Figure 91).

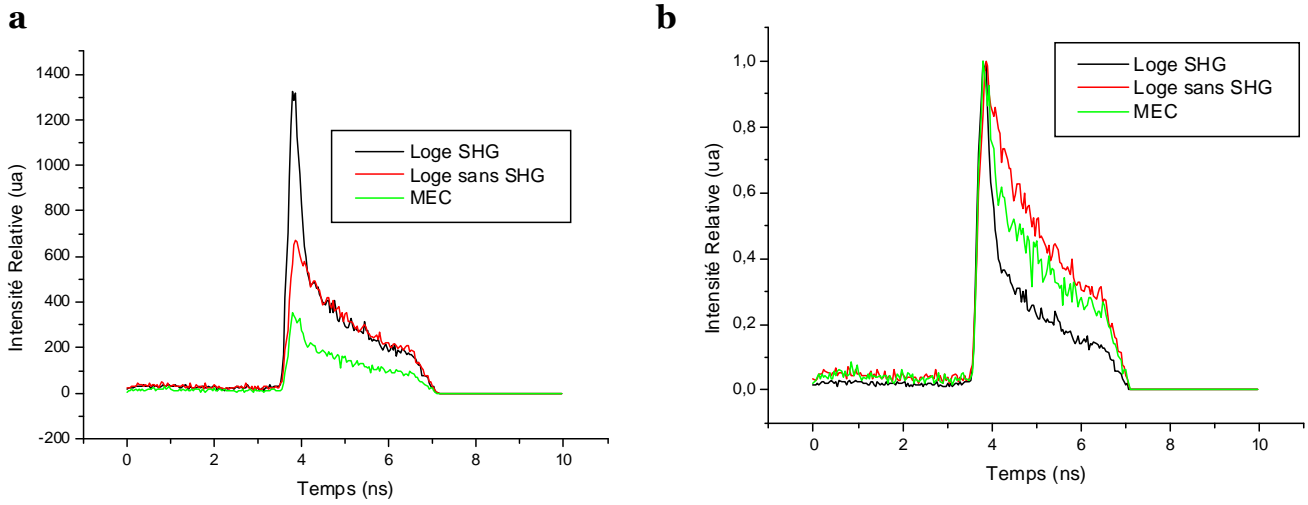


Figure 91 : Courbes de déclin de fluorescence provenant de 3 ROIs différente : Zone péri-cellulaire émettant simultanément un signal de fluorescence et un signal SHG ; Zone péri-cellulaire émettant un signal de fluorescence ; MEC. (a) Déclins non normalisés. (b) Déclins normalisés tels que le maximum soit égal à 1.

Ainsi la représentation de la durée de vie moyenne de fluorescence montre clairement 3 populations différentes. Les différents codages couleur représentés sur la Figure 92 confirment le poids important de la première composante d'ajustement dans le cas d'une mesure simultanée de signaux de fluorescence et SHG.

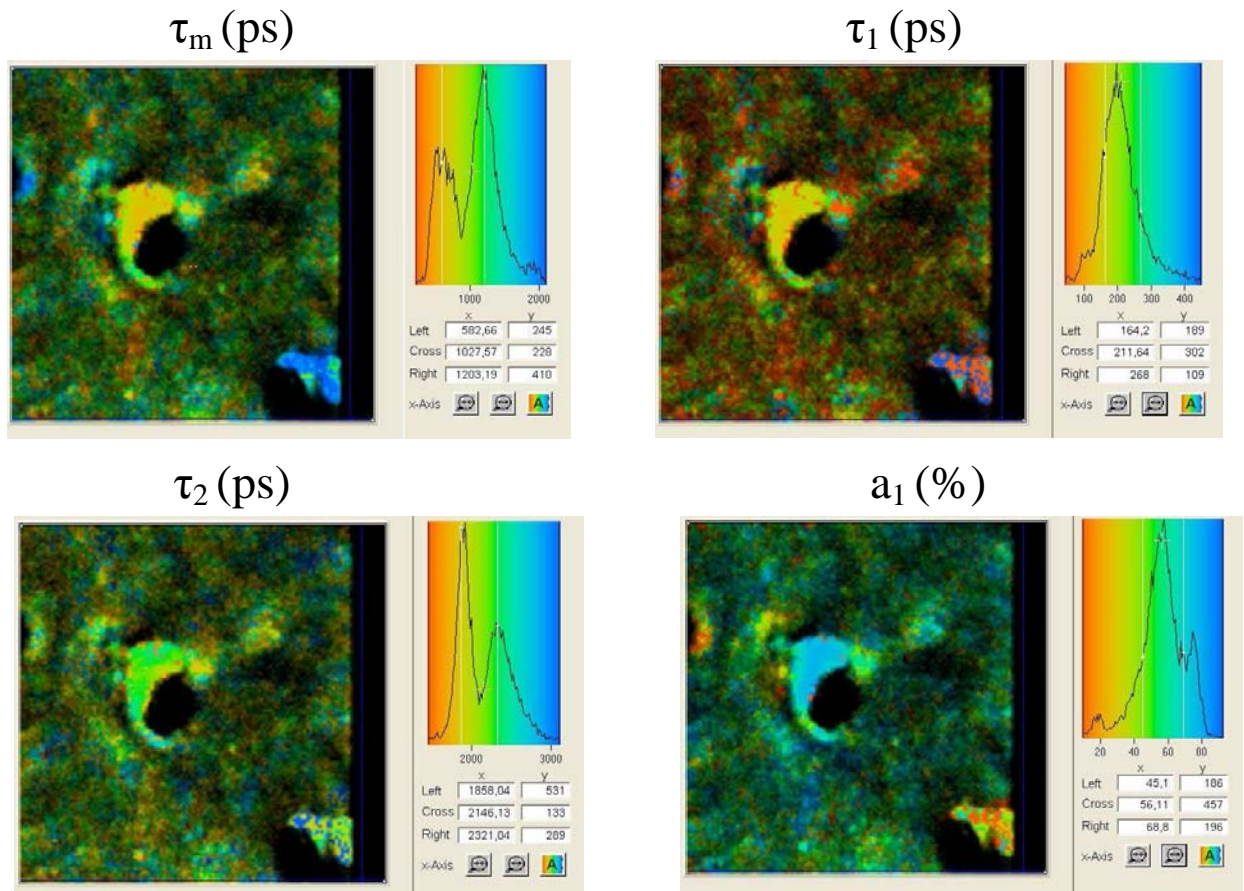


Figure 92 : Explant de cartilage. Excitation MP 800 nm (objectif x20, NA=0,7). FLIM : Images codées selon les différentes variables de l'ajustement biexponentiel des courbes de déclin de fluorescence (τ_m (ps) ; τ_1 (ps) ; τ_2 (ps) ; a_1 (%)). Histogrammes représentant la distribution de ces paramètres sur l'image complète.

Nous avons suivi l'évolution des constantes de déclin de fluorescence suivant les différentes étapes du marquage avec l'Alexa 488, qui a nécessité l'incubation avec la Hyaluronidase, puis la Chondroitinase, le marquage avec un anticorps primaire, puis enfin le couplage de cet anticorps avec l'Alexa 488.

Après le marquage du collagène VI avec l'Alexa 488, un pic apparaît sur l'histogramme de répartition des durées de vie de fluorescence sur l'image complète. Ce pic permet d'isoler une population correspondant à des molécules émettant une fluorescence plus longue ($\tau_m \sim 1,8$ ns), en l'occurrence l'Alexa 488.

Nous avons comparé les histogrammes de répartition des τ_m mesurés pour différentes ROIs aux différentes étapes du marquage. Afin de mieux comparer les résultats, et puisque les ROIs n'ont pas la même aire, les histogrammes ont été normalisés (division par rapport à la somme des valeurs). Pour cette analyse, nous avons déterminé 5 ROIs différentes : ROI1 : Image complète ; ROI2 : 1 Loge avec SHG + 1 loge sans SHG ; ROI3 : 1 loge avec SHG ; ROI4 : 1 loge sans SHG ; ROI5 : MEC.

Après le marquage avec l'Alexa 488, le pic correspondant au temps de vie moyen le plus élevé (~1,8 ns) apparaît dans les 5 ROIs, suggérant la présence d'Alexa 488, révélant le Collagène VI, dans l'ensemble de la matrice cartilagineuse (péricellulaire ou extracellulaire). Cependant, la proportion est beaucoup plus importante pour la ROI4 (loge sans SHG).

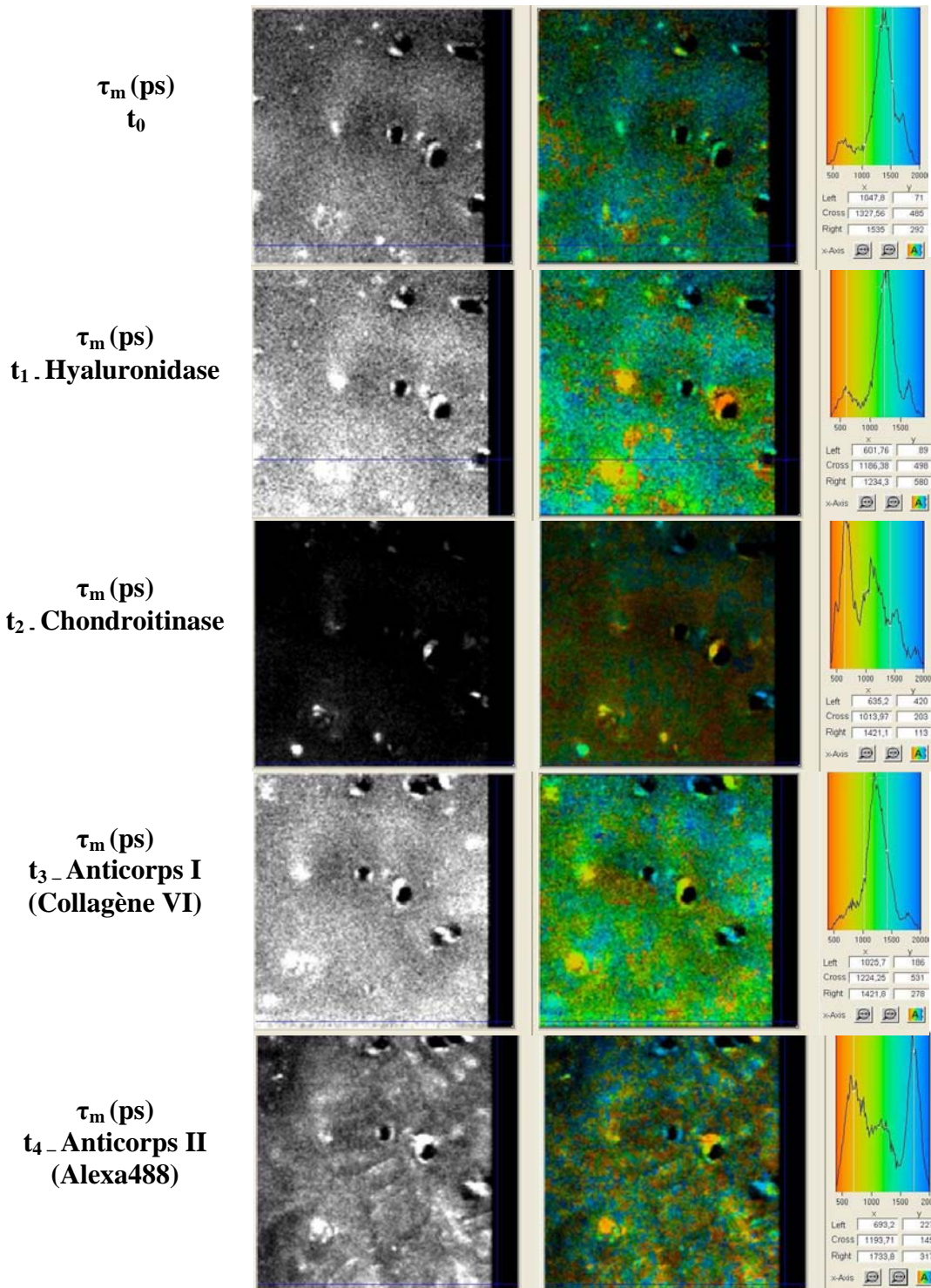


Figure 93 : Explant de cartilage. Excitation MP 800 nm (objectif x20, NA=0,7). FLIM : Images codées selon τ_m (ps). Histogrammes représentant la distribution de τ_m sur l'image complète.

Afin d'améliorer la détection en mode spectral du signal provenant de l'Alexa 488 qui nous a servi à localiser le collagène VI de la matrice péri-cellulaire, nous avons utilisé une détection dite 'non descannée'. Le signal de fluorescence mesuré est plus intense, puisque le trajet optique est plus direct sans perte suite au retour par la tête confocale du microscope.

La mise en œuvre de ce type de détection nécessite l'utilisation de filtres. Pour les acquisitions d'images représentées sur la Figure 94, nous avons utilisé un dichroïque et un filtre qui nous a permis de recueillir le signal émis à une longueur d'onde de 400 ± 15 nm. Autrement dit, ces images permettent de comparer les signaux SHG émis dans le sens du rayon incident d'excitation, et dans le sens inverse. Pour ces images, nous n'avons pas pu mesurer de signal émis pour une bande spectrale supérieure à 515 nm.

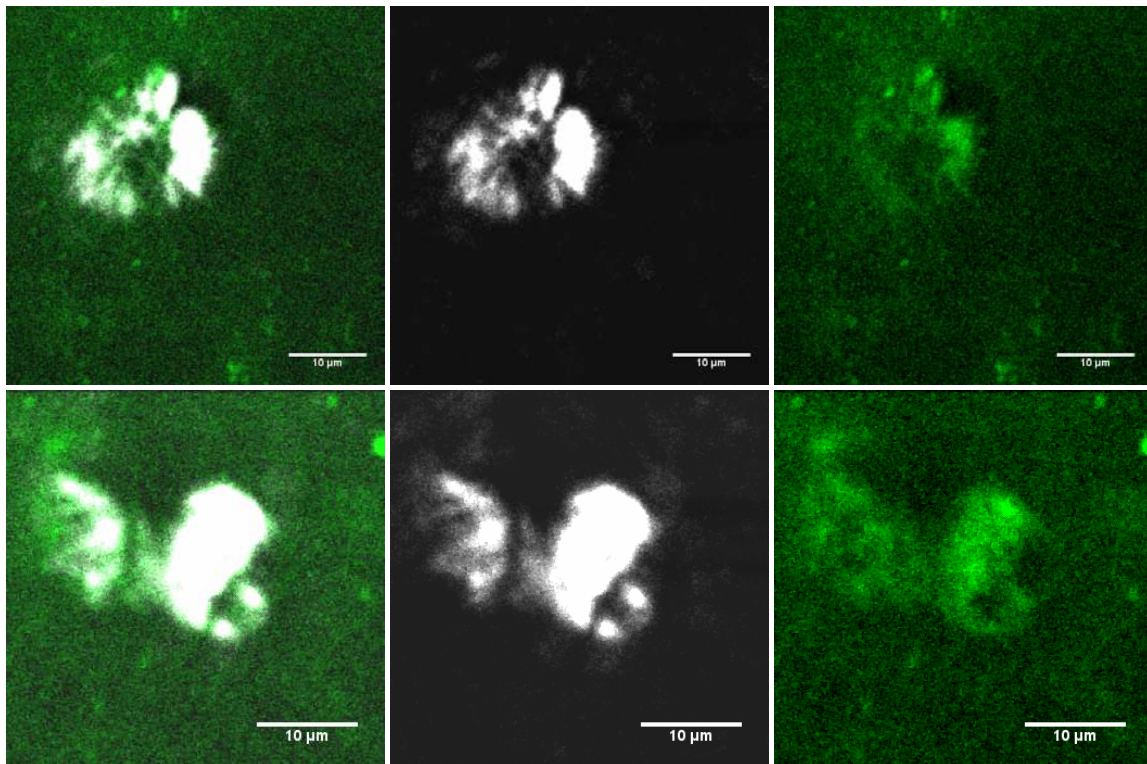


Figure 94 : Signal SHG émanant de la loge de chondrocytes. Excitation MP 800 nm (objectif x20, NA=0,7). Collection du signal SHG dans le sens du rayon incident : objectif x40, NA=0,8, codage en niveaux de gris. Collection du signal SHG en mode NDD dans le sens inverse au rayon incident, codage vert.

En mode détection NDD, nous avons pu mesurer la partie du signal SHG provenant de la matrice péricellulaire des chondrocytes. Ce résultat confirme qu'une partie du signal SHG est émis dans le sens inverse de propagation du rayon incident d'excitation. Etant donné qu'en mode d'imagerie FLIM, le signal mesuré est celui émis vers l'arrière, ce signal pourrait interférer sur la mesure des déclin de fluorescence, incitant à l'utilisation de filtres appropriés pour rejeter ce signal, ou au contraire le mettre en évidence.

III.4.E. Conclusion

La MEC cartilagineuse est constituée principalement de Collagène et de protéoglycannes. Nous avons montré la faisabilité de préciser la distribution en imagerie, sans marquage fluorescent spécifique du collagène, les fibres de collagène en associant une excitation de type multiphoton avec la détection de signal SHG. Cette approche pourrait être mise à profit en bioingénierie pour suivre la synthèse de collagène matriciel dans des constructions tissulaires et ainsi valider leur biofonctionnalité.

Une récente étude a montré l'intérêt de la microscopie par SHG afin de quantifier les dégradations intervenant au niveau de la MEC du cartilage [182]. La méthode employée pour ce travail est basée principalement sur l'intensité du signal recueilli en fonction de différentes conditions de préservation des échantillons.

Une méthode d'analyse d'images basée sur des paramètres de texture (Haralick) a été mise en œuvre afin d'analyser les modifications de la MEC intervenant suite à l'application de contraintes mécaniques (compression) ou biochimiques (Collagénase B). Cette approche semble pertinente, puisque les phénomènes liés à l'application d'une compression miment en partie ceux qui peuvent accompagner des pathologies dégénératives comme l'arthrose. Nous avons pu constater que les phénomènes intervenant lors de l'application d'une contrainte mécanique ou enzymatique n'engendrent pas le même type de modification du réseau collagénique. Dans le premier cas (compression), le réseau est restructuré (remodelé), avec un rapprochement des fibres voisines, la formation de nœuds ou agrégats et la formation d'un réseau plus compact. Au contraire, l'incubation avec de la Collagénase B permet de digérer le contenu en collagène de la MEC : l'action enzymatique au niveau des molécules de collagène entraîne des modifications de leurs propriétés non linéaires et donc de leur capacité à générer

un signal de seconde harmonique. Dans ce cas, nous n'observons pas une réorganisation du réseau de collagène, mais une dénaturation ou dégradation.

Par ailleurs, nous nous sommes intéressés plus précisément à l'environnement péricellulaire des chondrocytes en vue d'un diagnostic basé sur le collagène VI. Cette molécule présente un intérêt diagnostique puisque sa concentration augmente lors de pathologies comme l'arthrose (rôle protecteur). Mais sa présence témoigne aussi de la biofonctionnalité d'un biotissu, puisque le collagène VI est synthétisé lors de la mécanotransduction. Le contenu en collagène VI de l'espace péricellulaire a déjà pu être mis en évidence dans des travaux antérieurs, basés sur des techniques d'immunofluorescence. Au moyen de l'imagerie par SHG, nous avons observé, pour certains échantillons, une concentration importante de molécules émettrices que nous supposons être du collagène de type VI, hypothèse confortée par un marquage fluorescent corrélé.

L'imagerie du signal SHG couplée à une excitation de type multiphoton et associée à différentes méthodes d'analyse d'images permet d'apprécier les réorganisation, dénaturation ou dégradation du collagène matriciel du cartilage. Cette approche pourrait être utilisée à visée diagnostique pour qualifier les modifications apparaissant au niveau de matrice collagénique, ou pour suivre l'action d'un médicament sur le remodelage matriciel.

En bioingénierie, principalement en ingénierie du cartilage, la synthèse de collagène par les chondrocytes ensemencés sur différents types de support (billes d'alginate, éponges de collagène...) pourrait être suivie.

.Cependant, comme la méthode n'est pas spécifique au type moléculaire, la localisation (MEC ou PEC) permet de préciser le type de collagène.

III.5. Etude du matériel vasculaire

Les vaisseaux sanguins sont constitués de trois tuniques principales (intima média, adventice) dont la matrice extracellulaire contient majoritairement de l'élastine et du collagène. La proportion de ces constituants matriciels joue un rôle biomécanique important puisqu'elle détermine les propriétés visco-élastiques des vaisseaux et sa modification ou son altération peut amener à des pathologies vasculaires, du type athérosclérose.

Suite à une excitation multiphoton à 800 nm, l'élastine émet un intense signal d'autofluorescence. De ce fait, le réseau d'élastine constituant la média a pu être observé sans marqueur fluorescent spécifique, sur la base de sa fluorescence intrinsèque. L'association de la mesure de fluorescence couplée à la mesure du signal SHG permet d'obtenir des informations complémentaires sur la structure de la paroi vasculaire. En effet, le collagène principalement présent au niveau de l'adventice donne naissance à un fort rayonnement SHG, collecté en mode 'Lumière transmise' (signal 'forward').

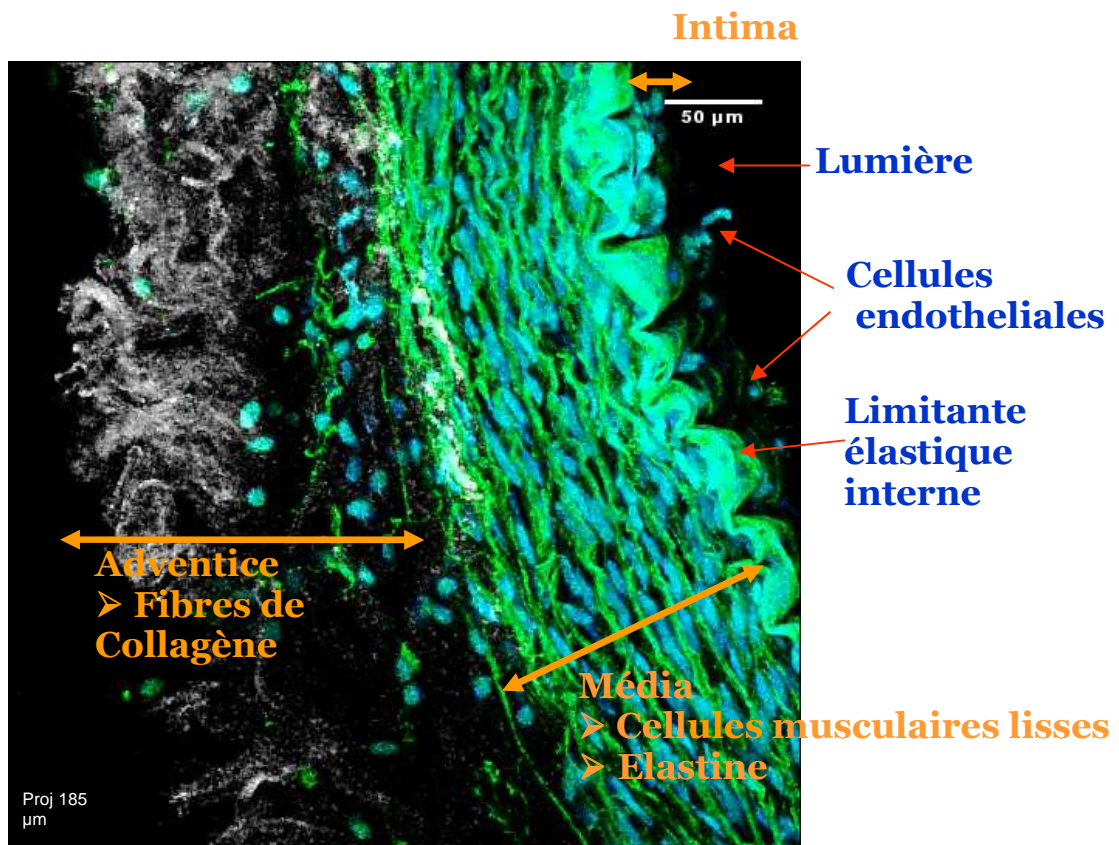


Figure 95 : Carotide de Lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Niveaux de Gris : Signal SHG – Collagène (Collection objectif x40, NA=0,8). Canal Vert : Autofluorescence (550-600 nm) – Elastine. Canal Bleu : Fluorescence du Hoechst (400-430 nm) – noyaux de cellules vasculaires.

III.5.A. L'utilisation de sondes fluorescentes pour imager des structures d'intérêt au niveau de la paroi artérielle

III.5.A.1. Intérêt des QDots

Ces nanocristaux semi-conducteurs (non organiques) présentent des propriétés d'émission de fluorescence qui peuvent être mises à profit pour l'imagerie en mode spectral ou basée sur la mesure des durées de vie de fluorescence.

L'émission de fluorescence de différents QDots a été mesurée pour une excitation multiphoton à 810 nm. Les spectres ont été acquis pour chaque QDot pris séparément. Le paramètre du Cavity Dumper étant réglé pour un DR = 20, la fréquence de tir des impulsions est de 2,72 MHz, la puissance moyenne du faisceau mesurée de 171 mW, ce qui correspond à une énergie par pulse de 65 nJ.

Comme on peut l'observer sur la Figure 96, les spectres d'émission des QDots sont étroits, ce qui permet leur utilisation dans le cadre de multimarquage.

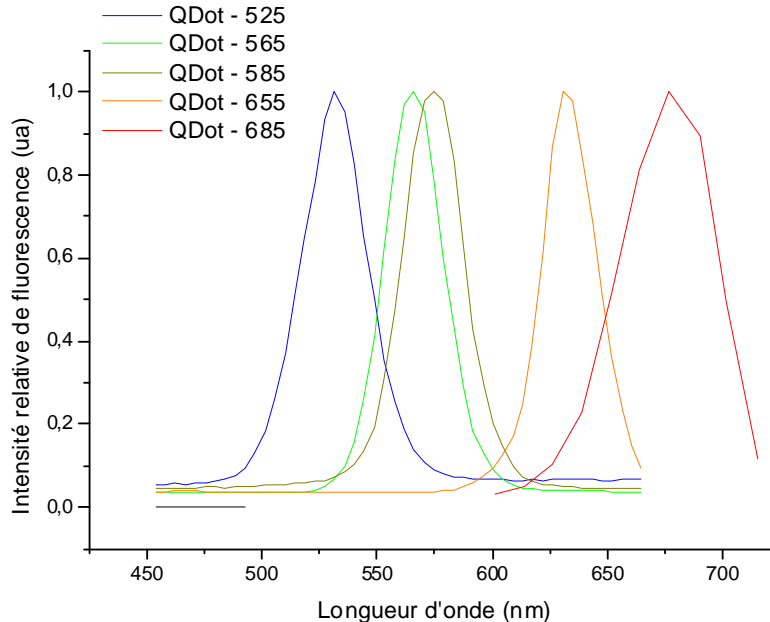


Figure 96 : Spectres d'émission de Quantum Dots (525 – 565 – 585 – 655 – 685) suivant une excitation multiphoton à 810 nm.

Pour préciser les paramètres, les spectres d'émission, supposés gaussiens, ont été ajustés suivant la loi ci-dessous :

$$I = I_{\max} * \exp - \left[\frac{x-P}{\sqrt{2} * W} \right]^2$$

P : Position en x du centre de la gaussienne
W : Largeur de la Gaussienne à mi-hauteur
I_{max} : Intensité (Hauteur) de la Gaussienne
X : Longueur d'onde

Nous avons procédé à un ajustement des spectres mesurés. Les paramètres retranscrits dans le Tableau 20 (Solveur Excel) indiquent une largeur à mi-hauteur du spectre d'émission inférieure à 15 nm pour 4 des QDots testés, cohérents avec les données du fabricant.

QDot	I _{max}	W (nm)	P (nm)	Ecart Pic attendu - Pic réel (nm)
525	60	14	532	7
565	76	15	565	0
585	62	15	589	4
655	83	12	653	2
685	200	22	679	6

Tableau 20 : Paramètres d'ajustement des spectres d'émission de différents QDots (supposés gaussiens). I_{max} : intensité maximale de la gaussienne. W : largeur à mi-hauteur de la Gaussienne. P : position du centre de la Gaussienne.

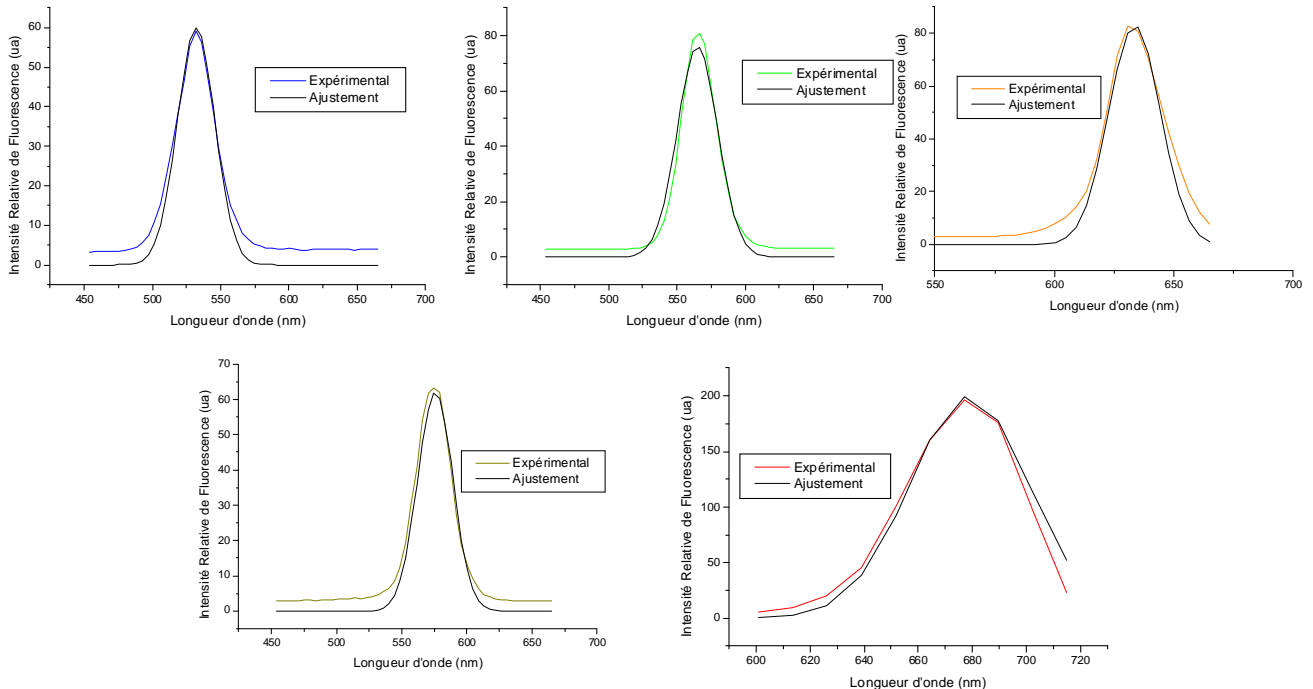


Figure 97 : Spectres d'émission pour différents Quantum Dots (525 – 565 – 585 – 655 – 685) suivant une excitation multiphoton à 810 nm et représentation des spectres obtenus par ajustement gaussien.

Une autre caractéristique des Quantum Dots est leur long temps de déclin de fluorescence, ce qui en fait des molécules de choix pour l'imagerie FLIM, puisqu'elles peuvent aisément être distinguées de fluorophores plus classiques dont la durée de vie se situe aux environs de 5 ns.

	Tau 1 (ps)	Khi 2	Nombre de Photons
Moyenne	9486,15	2,10	4,67E+03
Ecart-Type	735,36	0,76	2,50E+03
Ecart-Type (%)	7,75	36,07	53,66

Tableau 21 : Temps de Vie de Fluorescence calculé pour un ajustement monoexponentiel pour le QDot-565. Excitation MP à 800 nm. Statistiques réalisées pour une image 128*128 pixels². Energie par pulse d'excitation MP à 810 nm : 65 nJ.

	Tau 1 (ps)	Khi 2	Nombre de Photons
Moyenne	1816,75	3,38	1,79E+04
Ecart-Type	50,44	1,94	3,80E+03
Ecart-Type (%)	2,78	57,22	21,25

Tableau 22 : Temps de Vie de Fluorescence calculé pour un ajustement monoexponentiel pour la Rhodamine B. Excitation MP 800 nm. Statistiques réalisées pour une image 128*128 pixels². Energie par pulse d'excitation MP 810 nm : 65 nJ.

Le temps de déclin de fluorescence pour le QDot-565 est en moyenne de 9,5 ns, tandis que la constante de déclin de la Rhodamine B est de 1,8 ns lorsque ces molécules sont imagées en mode FLIM de manière séparée (Tableau 21 et Tableau 22).

Les ajustements ont été réalisés suivant un modèle monoexponentiel.

Lorsque les deux molécules sont présentes de manière simultanée, les courbes de déclin nécessitent un ajustement suivant un modèle biexponentiel. On mesure alors deux constantes de durées de vie de fluorescence, la plus courte correspondant probablement à la Rhodamine B (~2,1 ns), la seconde faisant référence aux QDots (11,1 ns). Le Tableau 23 ainsi que la Figure 98 montrent les temps de vie mesurés et les courbes de déclin obtenues.

	Tau 1 (ps)	Tau 2 (ps)	Q1 (%)	Q2 (%)	Khi 2	Nombre de Photons
Moyenne	2132,31	11100,63	22,47	77,53	4,69	4,90E+04
Ecart-Type	395,04	1111,03	6,02	6,02	6,58	2,39E+04
Ecart-Type (%)	18,53	10,01	26,80	7,77	140,09	48,87

Tableau 23 : Temps de Vie de Fluorescence calculé pour un ajustement biexponentiel pour une solution contenant un mélange de QDot-565 et de Rhodamine B. Excitation MP 800 nm. Statistiques réalisées pour une image 128*128 pixels².

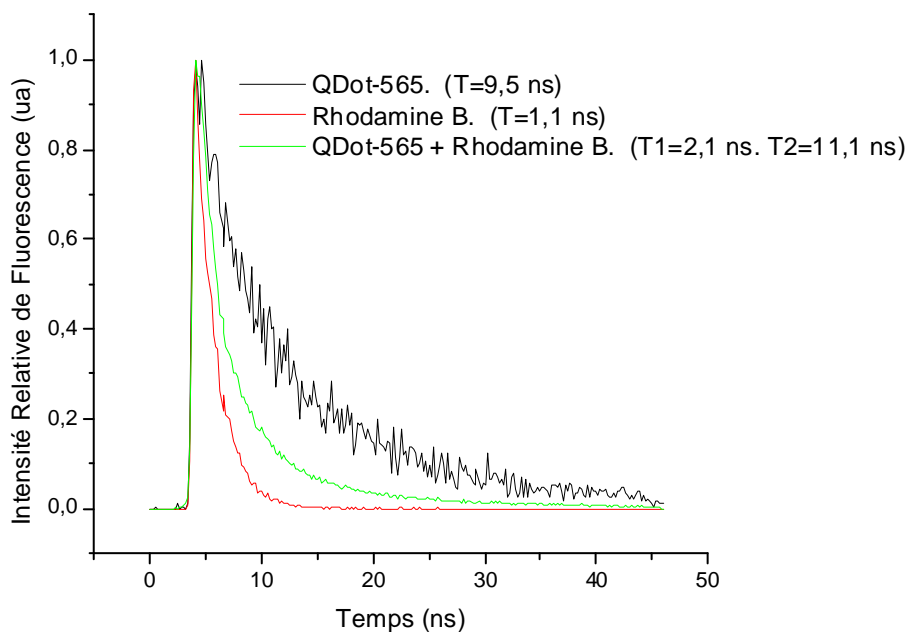


Figure 98 : Courbes de déclin de fluorescence mesurées pour le QDot-565 seul et la RhodamineB seule. Constante de déclin calculée pour un ajustement monoexponentiel. Courbes de déclin de fluorescence mesurées pour une solution contenant QDot-565 + Rhodamine. Constante de déclin calculée pour un ajustement biexponentiel. Normalisation des courbes : max = 1.

III.5.A.2. Marquage du cytosquelette et des noyaux cellulaires des cellules musculaires lisses

Nous avons utilisé les QDots-585-Streptavidine en mettant à profit la forte affinité existant entre la streptavidine et la biotine. Le marqueur primaire (molécule de phalloïdine biotinylée) permet de localiser le cytosquelette et le QDot-565 couplé à la Streptavidine émet

un signal de fluorescence (centré sur 585 nm) lorsqu'il est excité en mode Multiphoton à 800 nm.

Pour discriminer ce double marquage du noyau et du cytosquelette, l'imagerie FLIM repose sur la détermination de leur durée de vie de fluorescence moyenne. Les mesures (Figure 99) montrent une durée de vie moyenne de 4 ns pour le Hoechst et d'environ 6 ns pour les QDots. L'analyse spectrale fait apparaître deux pics d'émission. Le plus intense centré sur 585 nm correspond au signal de fluorescence du QDot, tandis que le second, beaucoup plus large compris entre 400 et 550 nm témoigne de la fluorescence du Hoechst. On note ici le fort rendement de fluorescence du QDot par rapport au Hoechst.

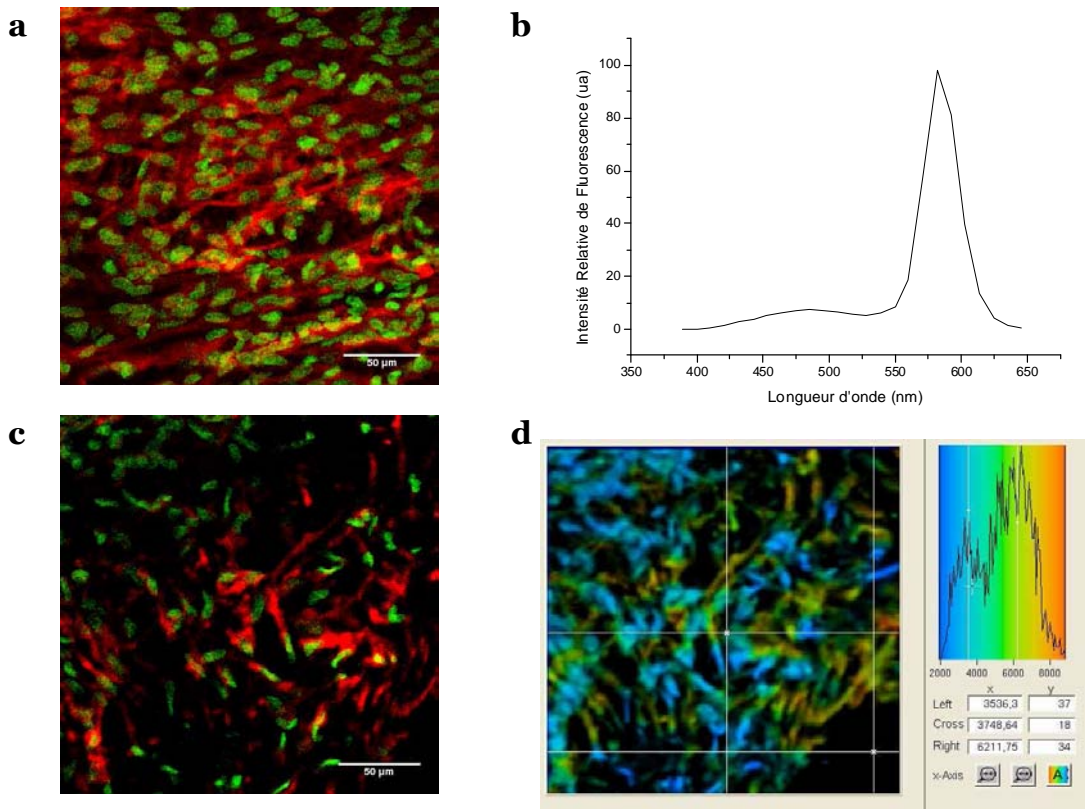


Figure 99 : Artères fémorale de lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x40 , NA =0.8 .Cytosquelette (Phalloïdine biotinylée liée à QDot-565-Streptavidine ; Canal Rouge : 500-650 nm). Noyaux cellulaires (Hoechst ; Canal Vert 350-480 nm). (b) Spectre d'émission de fluorescence sur l'image (a) complète. (d) Image des durées de Vie de fluorescence (Ajustement biexponentiel - Représentation de la durée de Vie moyenne) et histogramme de répartition pour la région délimitée par les curseurs blancs. L'image (d) représente la même image de l'échantillon que l'image codée en fluorescence (c).

Une artère dont seul le cytosquelette a été marqué au moyen des QDots a été imagée en mode spectral et FLIM (Figure 100). Comme précédemment, la durée de vie moyenne des Qdots se situe aux alentours de 8 ns, et leur pic d'émission de fluorescence à 585 nm.

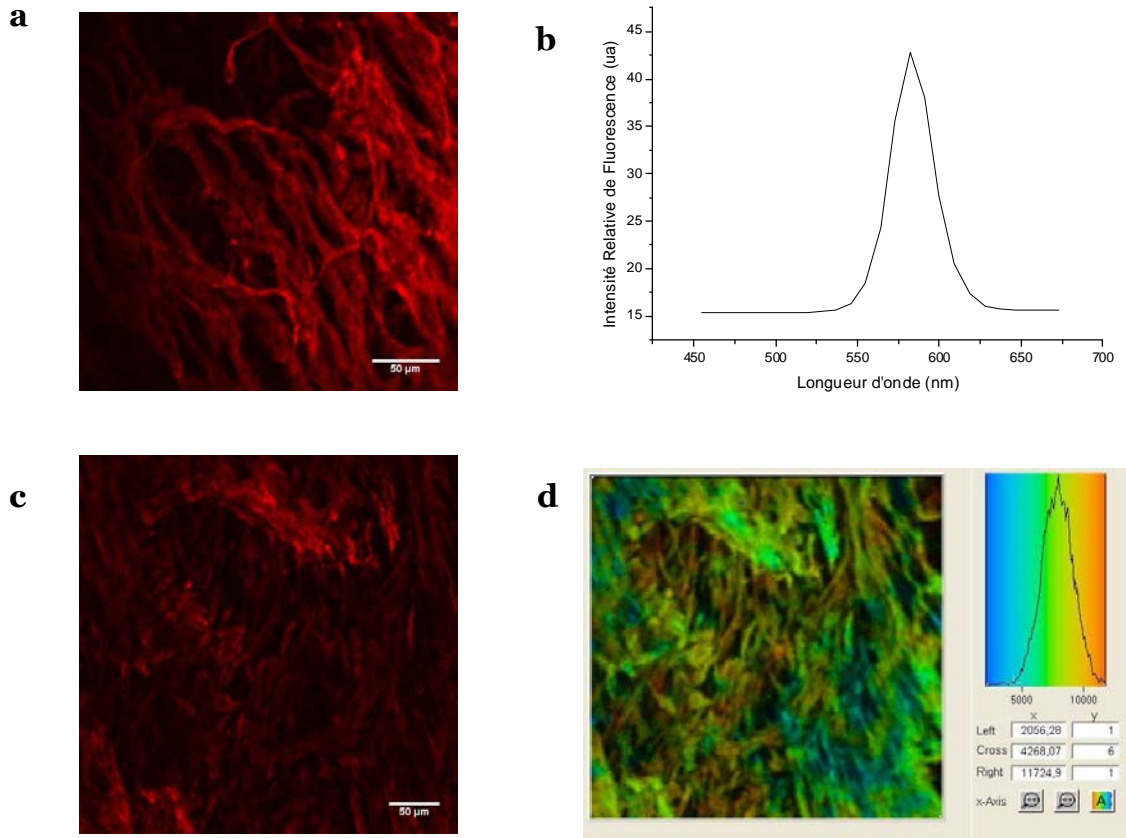


Figure 100 : Artère fémorale de lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x40, NA=0.8. Cytosquelette (Phalloïdine biotinyllée liée à QDot565-Streptavidine ; Canal Rouge : 500-650 nm). (b) Spectre d'émission de fluorescence sur l'image (a) complète. (d) Image des durées de Vie de fluorescence (Ajustement biexponentiel - Représentation de la durée de Vie moyenne) et histogramme de répartition pour la région délimitée par les curseurs blancs. L'image (d) représente la même image de l'échantillon que l'image codée en fluorescence (c).

Les QDots représentent de nombreux avantages aussi bien en imagerie spectrale qu'en imagerie de durée de vie de fluorescence. En effet, ils sont excitables en mode multiphoton, présentent un spectre d'émission très étroit associé à un fort rendement quantique, ce qui permet de les discriminer aisément d'autres fluorophores et de remarquablement améliorer les possibilités d'imagerie multi-couleurs. De plus, leur durée de vie de fluorescence peut être qualifiée de 'longue' si on la compare à celle d'autres molécules fluorescentes plus classiques (intrinsèques ou marqueurs utilisés classiquement). Ces propriétés ont font des molécules

potentiellement intéressantes pour l'imagerie de structures biologiques, d'autant que des efforts récents visent à améliorer leur biocompatibilité [183].

III.5.B. Le réseau de Collagène dans l'adventice

III.5.B.1. Action de la Collagénase de type I sur l'adventice d'une carotide de lapin

L'adventice des vaisseaux contient essentiellement du collagène qui génère un signal SHG intense. Nous avons vérifié la spécificité du signal SHG en suivant l'action enzymatique de la Collagénase de type I sur une carotide de lapin. Nous avons observé une perte progressive du signal SHG en fonction de la durée d'incubation avec l'enzyme. La Figure 101 représente les images acquises pour différents temps d'incubation (0 ; 45 ; 95 min). La Figure 102 représente des projections selon l'axe des ordonnées du signal SHG pour ces différents temps. La diminution du signal SHG est rapide au départ, puis tend à ralentir (Figure 104). Par ailleurs, la perte du même signal semble plus prononcée au niveau de l'adventice, la plus externe du vaisseau (Figure 105).

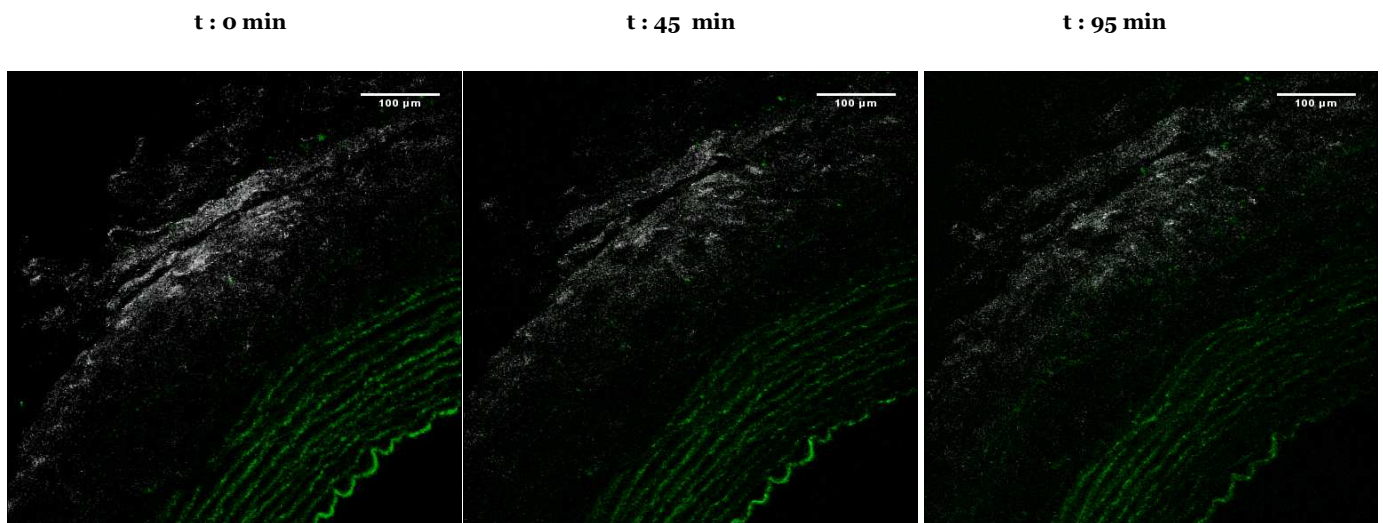


Figure 101 : Action de la Collagénase de type I sur une carotide de Lapin en fonction du temps d'incubation. Excitation MP 800nm, objectif x20, NA=0,7. Niveaux de Gris : Signal SHG – Collagène (Collection objectif x40, NA=0,8). Canal Vert : Autofluorescence (400-500 nm) – Elastine. Projection sur 53 µm (26 plans avec un pas ~2 µm).

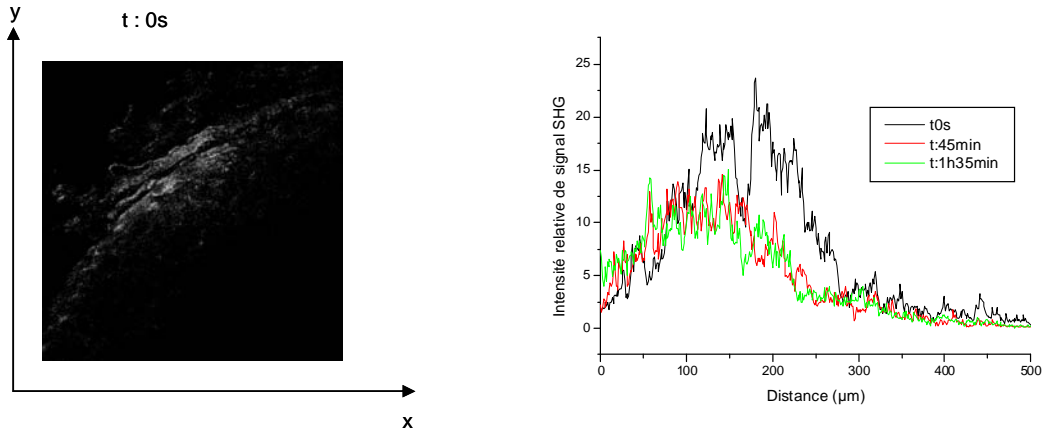


Figure 102 : Action de la Collagénase de type I sur une carotide de Lapin en fonction du temps d'incubation. Excitation MP 800nm, objectif x20, NA=0,7. Niveaux de Gris : Signal SHG – Collagène (Collection objectif x40, NA=0,8). Projection sur l'axe des ordonnées du signal SHG mesuré au niveau de la même région d'intérêt ($t=0 s$, $t=45 min$, $t=95 min$). Projection (en z) sur 53 μm (26 plans avec un pas $\sim 2 \mu m$).

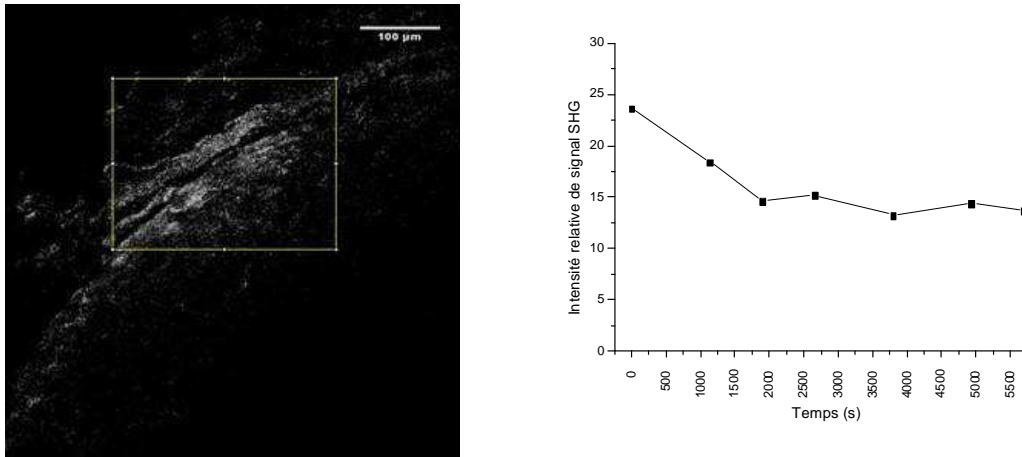


Figure 103 : Action de la Collagénase de type I sur une carotide de Lapin en fonction du temps d'incubation. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Evolution de l'intensité moyenne du signal SHG (Collection objectif x40, NA=0,8) sur une région d'intérêt en fonction du temps d'incubation. Projection sur 53 μm (26 plans avec un pas $\sim 2 \mu m$).

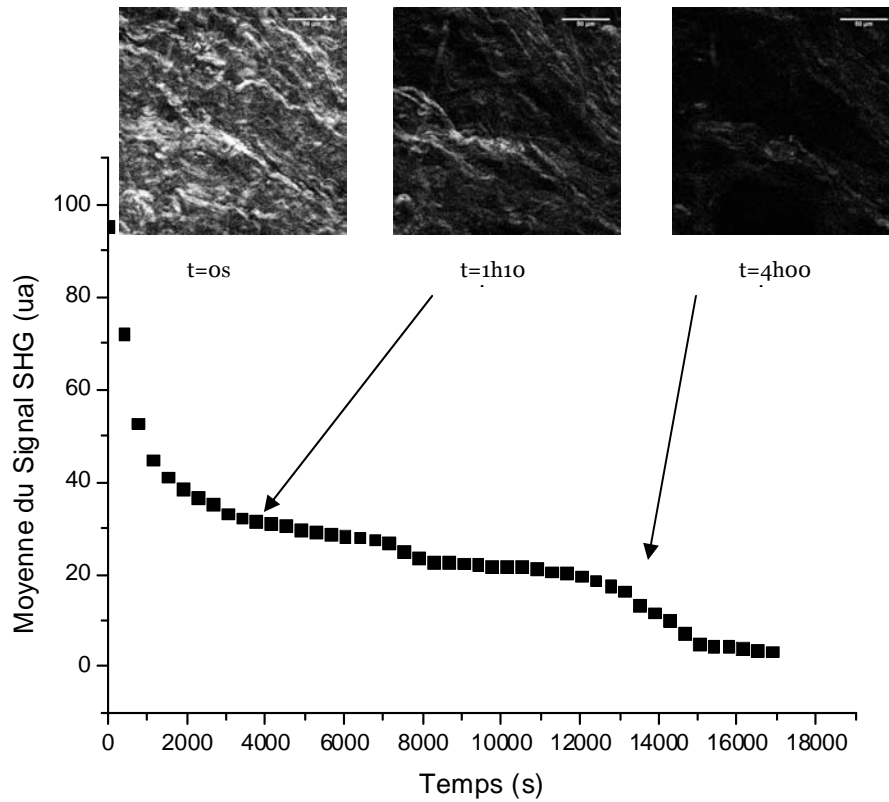


Figure 104 : Action de la Collagénase de type I sur une carotide de Lapin en fonction du temps d'incubation. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Evolution de l'intensité moyenne du signal SHG (Collection objectif x40, NA=0,8) sur une région d'intérêt en fonction du temps d'incubation.

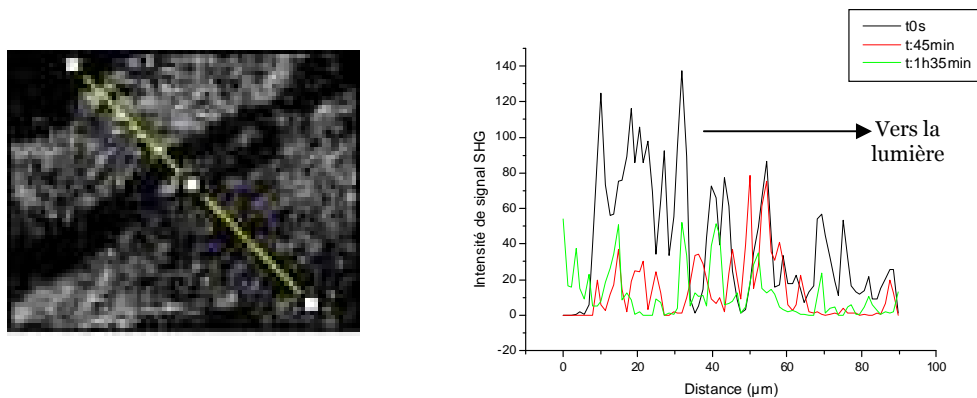


Figure 105 : Action de la Collagénase de type I sur une carotide de Lapin en fonction du temps d'incubation. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Profil de signal SHG (Collection objectif x40, NA=0,8) au niveau de l'adventice de la paroi artérielle pour différents temps d'incubation. Projection sur 53 μm (26 plans avec un pas ~2 μm). D=0 μm correspond à la partie externe de la paroi.

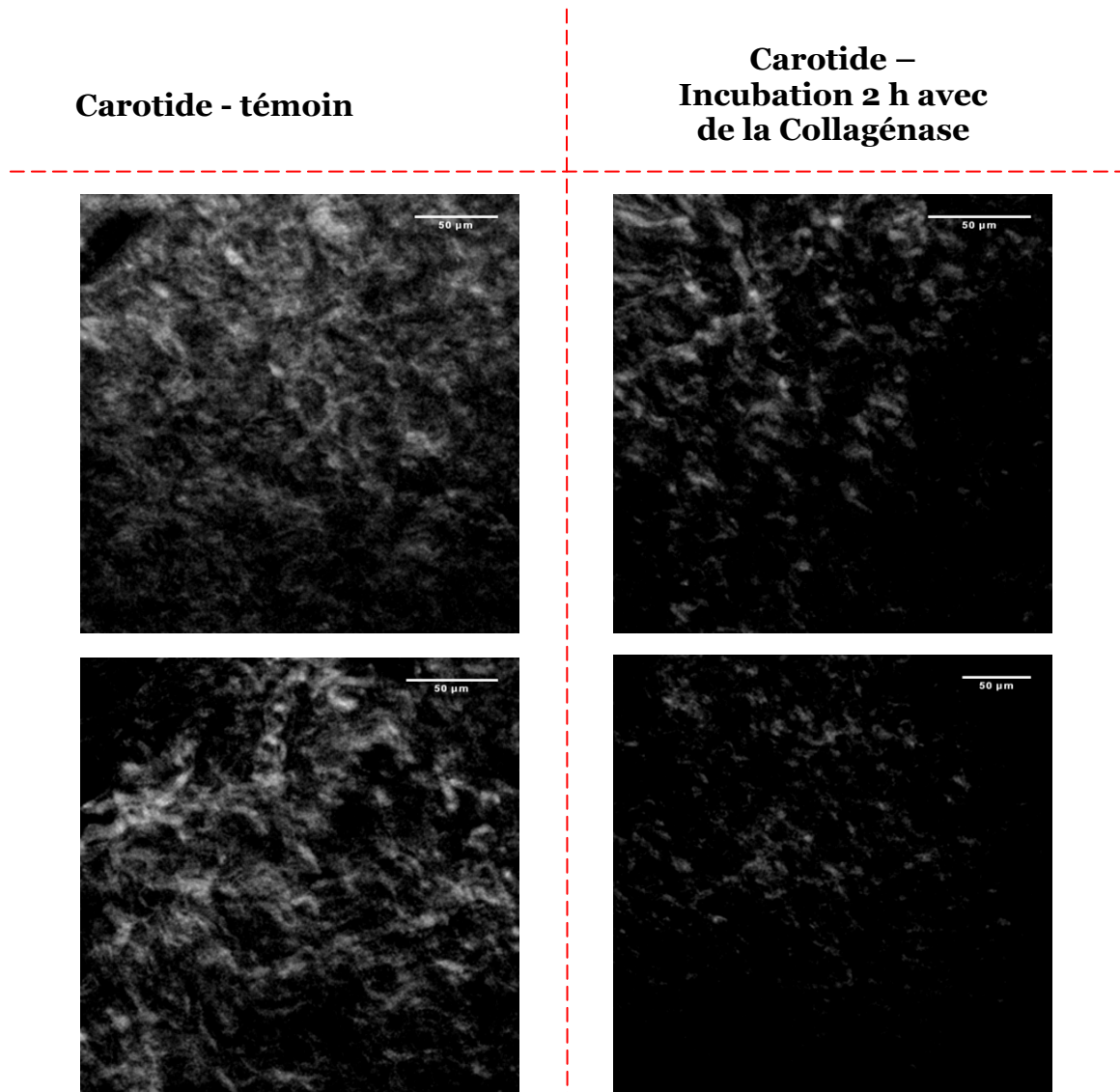


Figure 106 : Carotide de Lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Niveaux de Gris : Signal SHG – Collagène (Collection objectif x40, NA=0,8). Incubation avec de la Collagénase pendant 2 h. Projection sur ~30 µm (15 plans – pas de 2 µm).

Afin de comparer l'action de la Collagénase sur différents types d'organisation matricielle des réseaux de collagène (cartilage – vaisseaux), nous avons comparé l'évolution des paramètres de texture des images SHG. Pour cela, nous avons sélectionné une région d'intérêt dans la paroi adventitielle et appliqué l'algorithme de calcul sur les images SHG acquises à différents temps d'incubation avec l'enzyme. Ainsi, pour le vaisseau, les analyses ont été effectuées sur des zones de 80*65 pixels² (taille du pixel : 732*732 nm², soit taille des vignettes : 58 µm*47 µm), représentées sur la Figure 107.

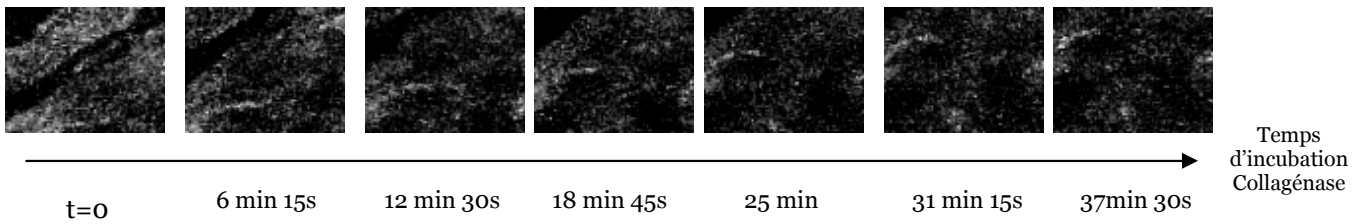


Figure 107 : Fibres de Collagène de la paroi adventitielle d’une carotide de lapin. Mesure su signal SHG (Collection objectif x40, NA=0,8 ; Excitation MP 800 nm) après différents temps d’incubation avec de la Collagénase.

Nous avons constaté que les paramètres de texture évoluent dans le même sens que ceux calculés à partir d’images de MEC de cartilage lorsque les échantillons sont soumis à l’action enzymatique de la Collagénase. L’évolution se traduit par une perte progressive de signal SHG (↓ ‘Moyenne’ et ‘Sum Average’), une augmentation de l’homogénéité de l’image (↑ ‘ASM’), de nombreuses variations de niveaux de gris, mais peu marquées (↓ ‘Sum Variance’ et ↑ ‘Contrast’), conduisant à une texture s’apparentant à un bruit de fond. Le Tableau 24 résume l’évolution des différents paramètres calculés à partir des images de la Figure 107.

Analyse Collagénase	Collagénase	Interprétation	Ecart Type (%)	100*(max-min)/max
Angular Second Moment	↑	nombreuses transitions entre niveaux de gris	39	61
Contrast	↑	beaucoup de variations locales	25	59
Correlation	↓ en abs	peu de structures linéaires	36	59
Variance	↑	beaucoup de variations locales	3	7
Inverse Difference Moment	↑	larges éléments texturaux	7	15
Sum Average	↓	intensité du signal plus faible	6	18
Sum Variance	↓	variations locales - marquées	13	33
Sum Entropy	↓ -∞		6	17
Entropy	↓ -∞	répartition pseudo-aléatoire	18	71
Moyenne	↓	perte de l'intensité du signal	36	58

Tableau 24 : Evolution des paramètres texturaux (Haralick) lorsque les échantillons (carotide de lapin) ont été soumis à l’action de la Collagénase. Les zones grisées représentent les paramètres qui varient très peu (Ecart type <7%).

L'action de la collagénase de type I sur le réseau de collagène de l'adventice d'une carotide de lapin entraîne une dénaturation du réseau similaire à celle observée lors du traitement enzymatique de cartilage humain par de la collagénase B. L'évolution des paramètres de texture est identique dans les deux cas.

III.5.B.2. Effet de la fixation avec du PAF 5% et de la Cryopréservation sur les réseaux de Collagène et d'Elastine

Nous avons ensuite observé le réseau de collagène de l'adventice d'une carotide et d'une artère fémorale fraîche, puis après fixation dans du PAF 5% et après cryopréservation dans de l'azote liquide (-180°C). Sur les images présentées dans cette partie, le signal codé en niveaux de gris correspond au signal SHG émanant des fibres de collagène. Le signal codé en vert provient de l'élastine qui présente une forte autofluorescence et un spectre d'émission très large après avoir été excitée en mode multiphoton (Figure 108).

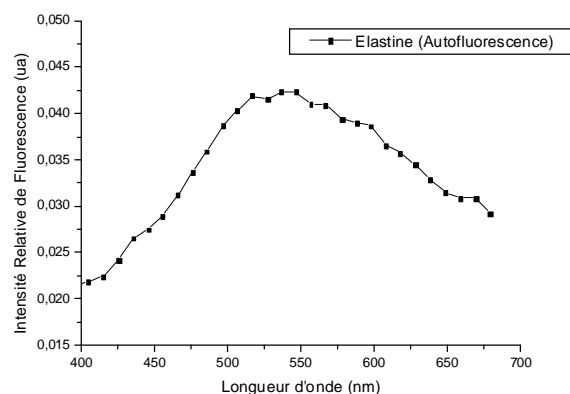


Figure 108 : Spectre d'autofluorescence de l'élastine composant la média d'une carotide de lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7.

Nous avons pu constater que la fixation avec du PAF 5% n'altère pas la réponse SHG et probablement pas la structure du réseau de collagène, ni celle du réseau d'élastine (Figure 109). Au contraire, après cryopréservation pendant plus de 6 mois (azote liquide -180°C), le signal SHG provenant des molécules de collagène semble plus diffus, tandis que les fibres élastiques apparaissent intactes. Le fait de congeler les vaisseaux affecterait la structure du réseau de collagène, mais ne détruirait pas le réseau d'élastine.

Cependant, ces expériences doivent être répétées afin d'obtenir une conclusion fiable. En effet, la préparation des échantillons dépend de paramètres complexes, comme par exemple l'expérience du manipulateur ou les temps entre les prélèvements et le conditionnement des échantillons.

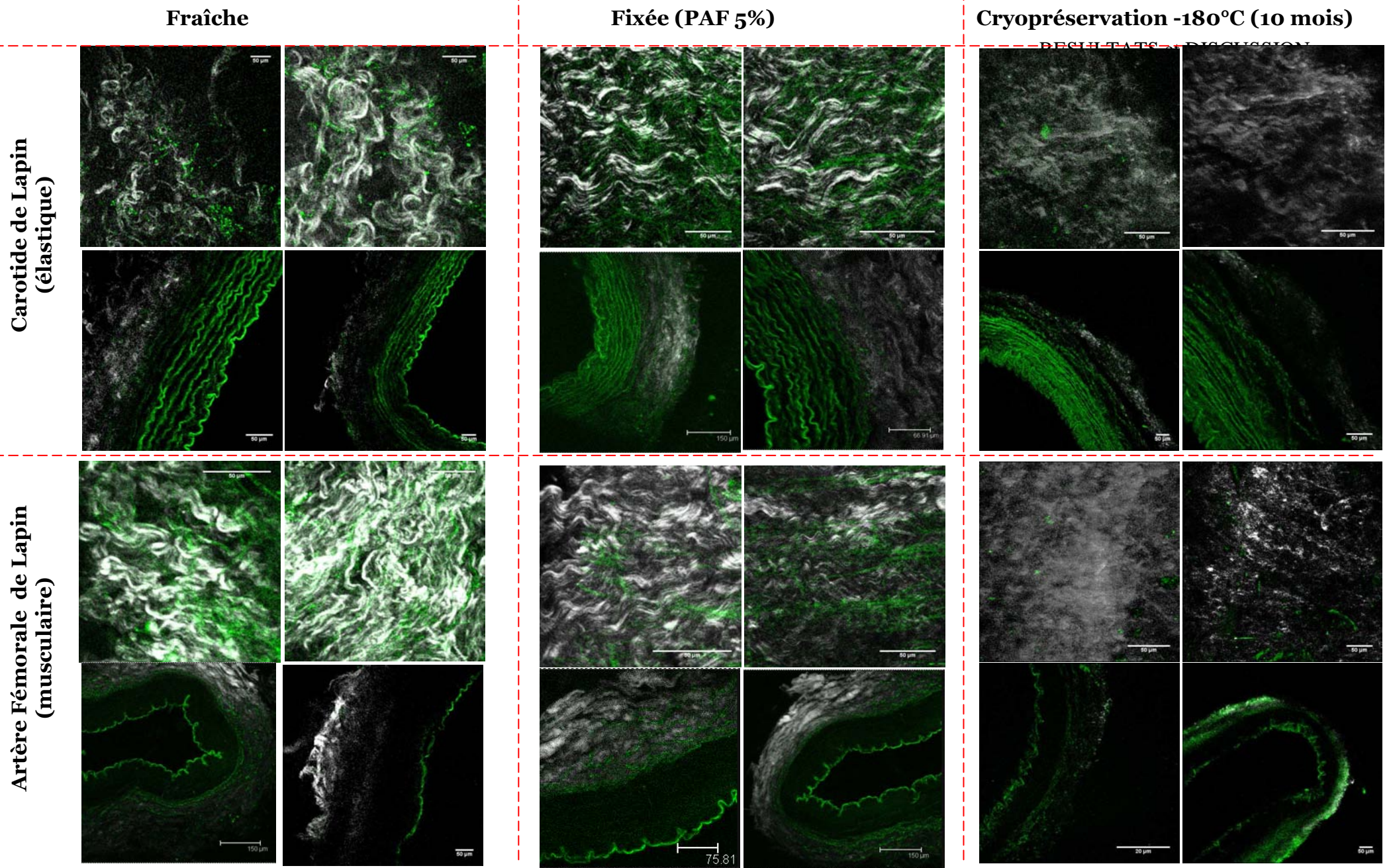


Figure 109 : Effet du mode de conservation sur la réponse SHG du Collagène et la fluorescence intrinsèque de l'élastine pour la carotide et l'artère fémorale de lapin fraîche, fixée ou cryopréservée. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Niveaux de Gris : Signal SHG – Collagène (Collection objectif x40, NA=0,8). Canal Vert : Autofluorescence (400-500 nm) – Elastine.

III.5.C. Comparaison de la média et de l'intima de différents types d'artères dites élastiques ou musculaires

En combinant la détection des signaux de fluorescence et de SHG, nous pouvons comparer la structure de différents types de vaisseaux. Sur la Figure 110 la quantité de fibres d'élastine apparaît beaucoup plus importante pour des artères de type élastique, telles la carotide ou l'aorte. En revanche, pour des vaisseaux musculaires, comme l'artère fémorale, uniquement la limitante élastique interne émet un fort signal d'autofluorescence (Figure 110).

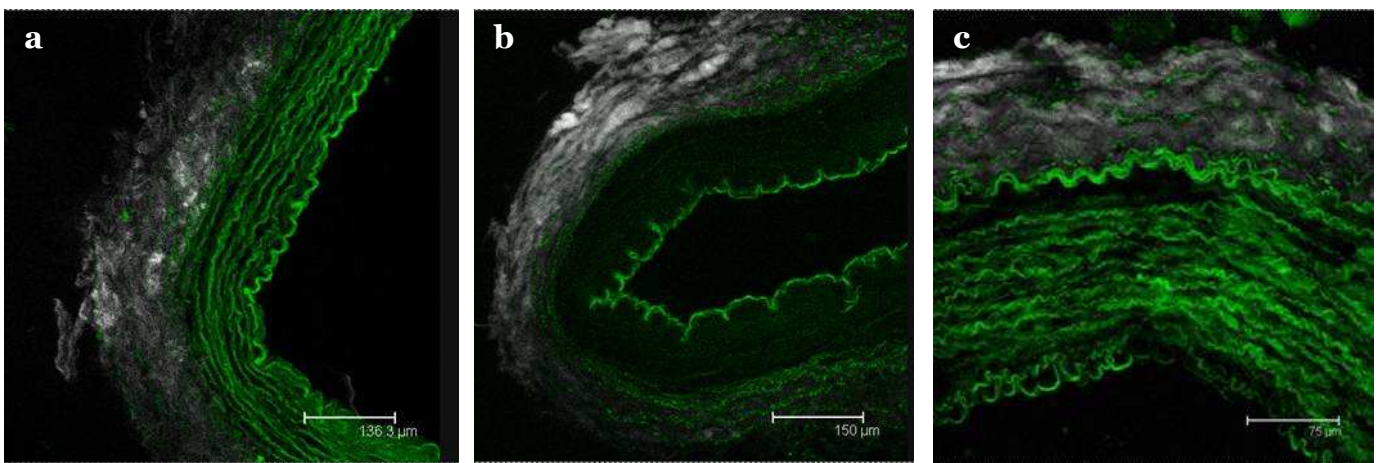


Figure 110 : Comparaison de différents types de vaisseaux (lapin). Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. (a) Carotide ; (b) Artère fémorale ; (c) Aorte abdominale. Canal vert : Autofluorescence – Elastine (500-600 nm). Niveaux de gris : SHG – Collagène (Collection objectif x40, NA=0,8).

Le tracé de profils de distribution du signal SHG et de fluorescence sur la paroi artérielle permet de mesurer l'épaisseur de la média et de l'adventice. Les Figures 111 à 114 représentent ces tracés pour une carotide, une artère fémorale et une aorte de lapin (n = 2 profils) fixées avec du PAF 5%. Les images étudiées représentent des projections d'acquisitions en coupes sériées sur une épaisseur de l'ordre de 100 μm.

Les profils représentés en vert caractérisent le signal d'autofluorescence au travers de la paroi. Dans le cas de la carotide (Figure 111), on observe des pics au niveau du profil, correspondant à la traversée des feuillets d'élastine. Il en est de même pour l'aorte (Figure 113). En revanche, les profils tracés au travers de la paroi fémorale (Figure 112) présentent uniquement 2 pics intenses aux extrémités de l'intima, correspondant aux limites élastiques interne et externe.

La média présente une épaisseur d'environ 180 μm pour une carotide, 300 μm pour l'aorte et de 150 μm pour la fémorale. De la même manière, l'adventice apparaît plus épaisse pour la carotide (200-215 μm) que pour la fémorale (150-200 μm). La paroi adventitielle de l'aorte présente une épaisseur d'environ 150 μm .

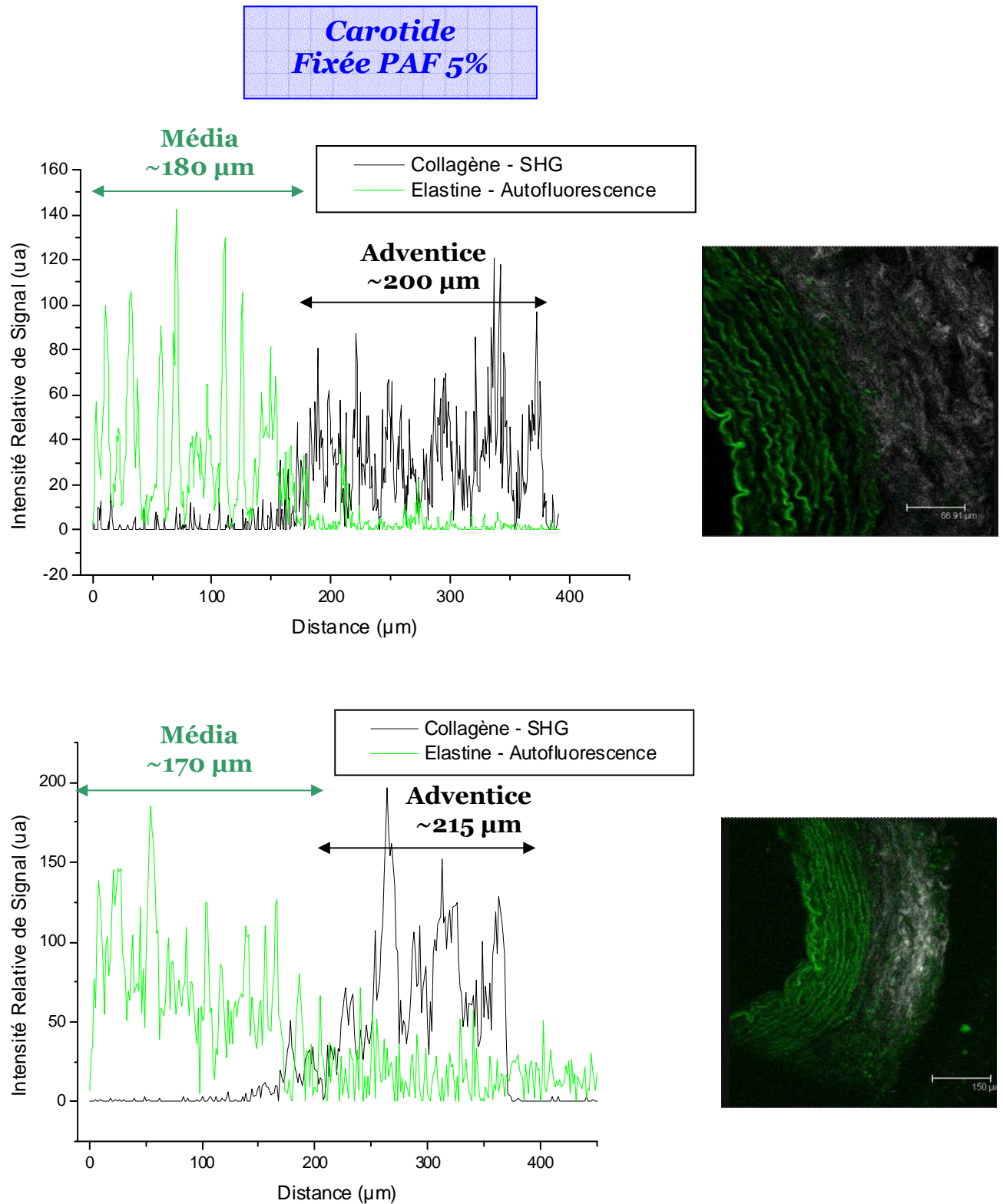


Figure 111 : Mesure de l'épaisseur de la média et de l'adventice au niveau d'une carotide de lapin. Profils sur la paroi artérielle représentant le signal de Collagène (gris) et le signal de fluorescence de l'élastine (vert). La média présente une épaisseur comprise entre 170 et 180 μm et l'adventice une épaisseur de l'ordre de 200 à 215 μm.

Fémorale
Fixée PAF 5%

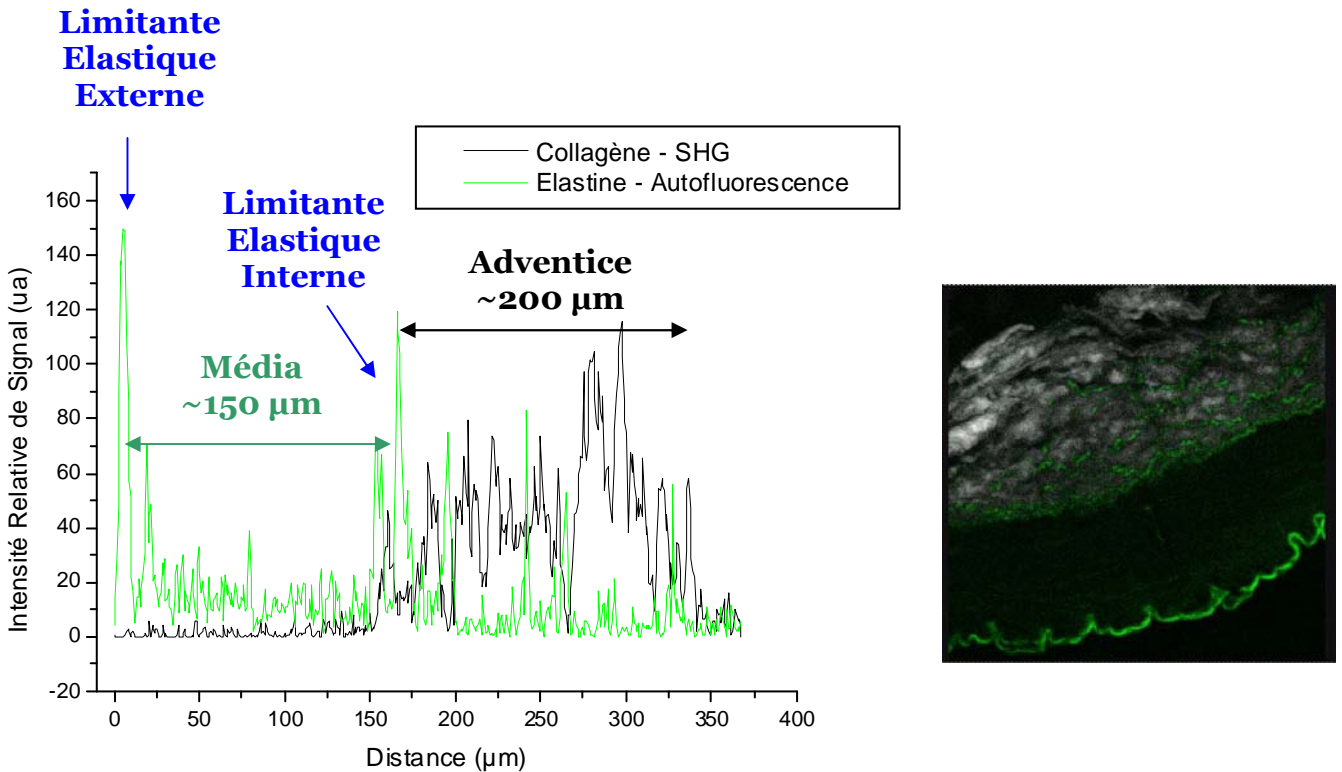
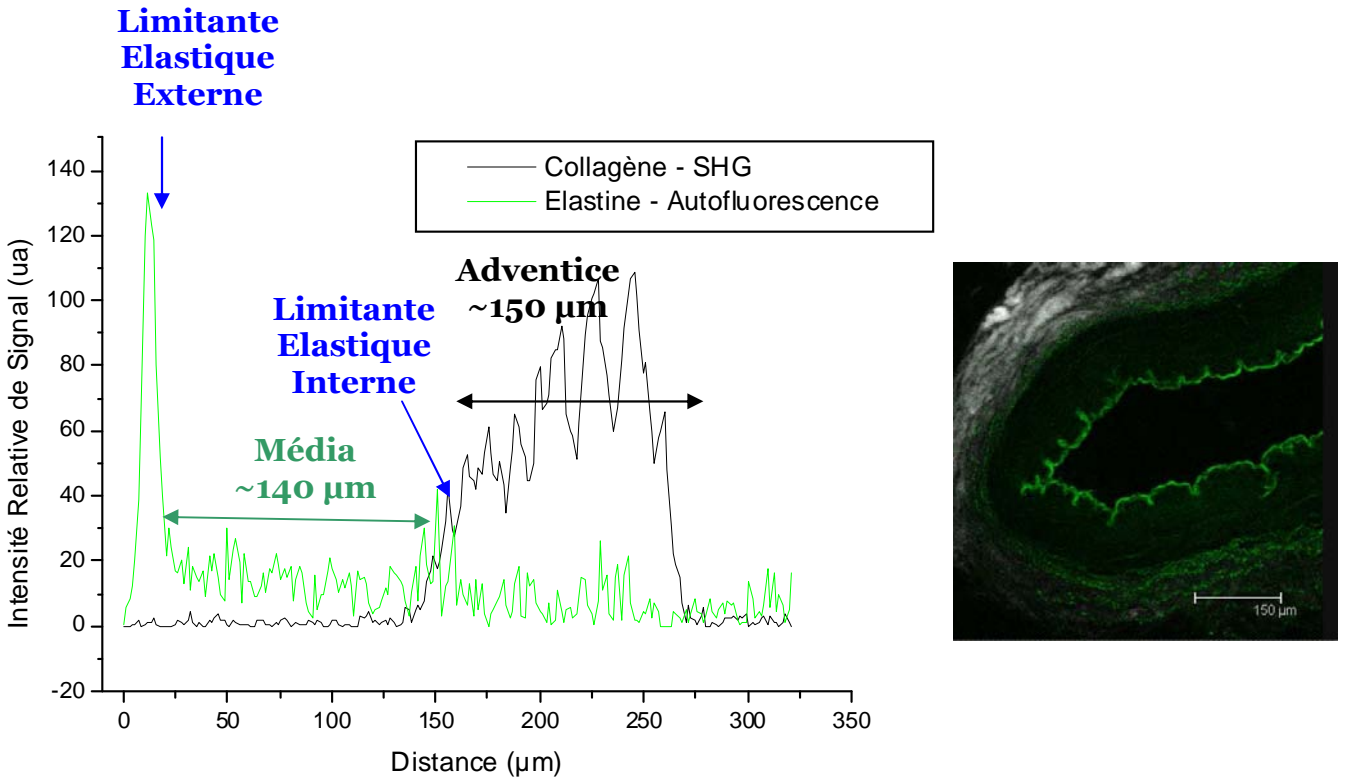


Figure 112 : Mesure de l'épaisseur de la média et de l'adventice au niveau d'une artère fémorale de lapin. Profils sur la paroi artérielle représentant le signal de Collagène (gris) et le signal de fluorescence de l'élastine (vert). La média présente une épaisseur comprise entre 140 et 150 µm et l'adventice une épaisseur de l'ordre de 150 à 200 µm.

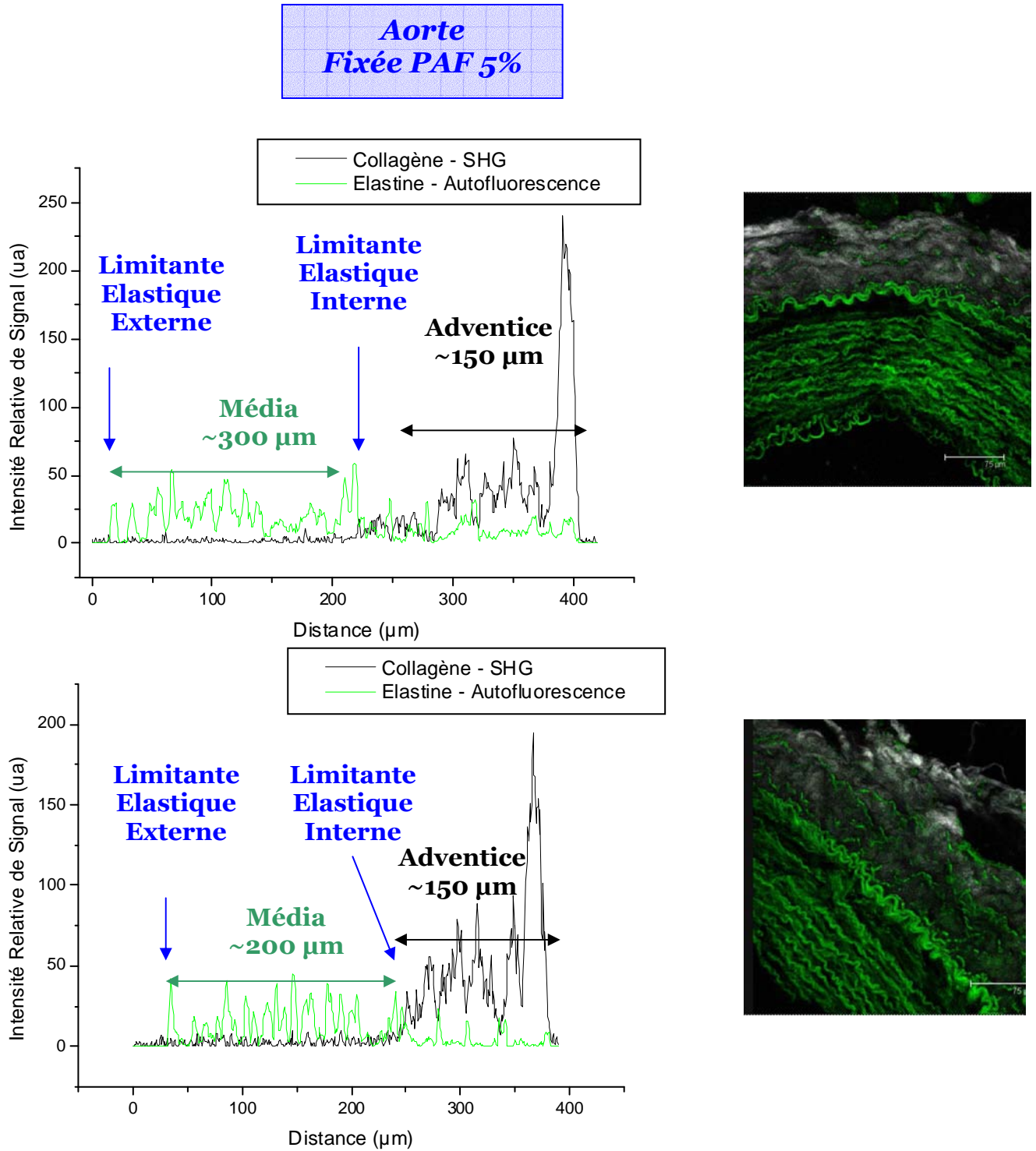


Figure 113 : Mesure de l'épaisseur de la média et de l'adventice au niveau d'une aorte de lapin. Profils sur la paroi artérielle représentant le signal de Collagène (gris) et le signal de fluorescence de l'élastine (vert). La média présente une épaisseur comprise entre 200 et 300 μm et l'adventice une épaisseur de l'ordre de 150 μm.

	Epaisseur de la média (μm)	Epaisseur de l'adventice (μm)
Carotide (Lapin)	180	200
	170	215
Fémorale (Lapin)	140	150
	150	200
Aorte (Lapin)	300	150
	200	150

Tableau 25 : Mesure de l'épaisseur de la média et de l'adventice d'une carotide, d'une artère fémorale et d'une aorte de lapin.

III.5.D. Comparaison du réseau de collagène pour différents types d'artères élastiques ou musculaires

Le diamètre des faisceaux de fibres de collagène peut être mesuré en traçant des profils au travers de ces faisceaux. Il se situe entre 3 et 7 μm pour chacun des vaisseaux étudiés ci-dessus (carotide, fémorale ou aorte). De la même manière, nous avons observé que les dimensions des faisceaux d'une artère ombilicale humaine sont du même ordre de grandeur (Figure 114).

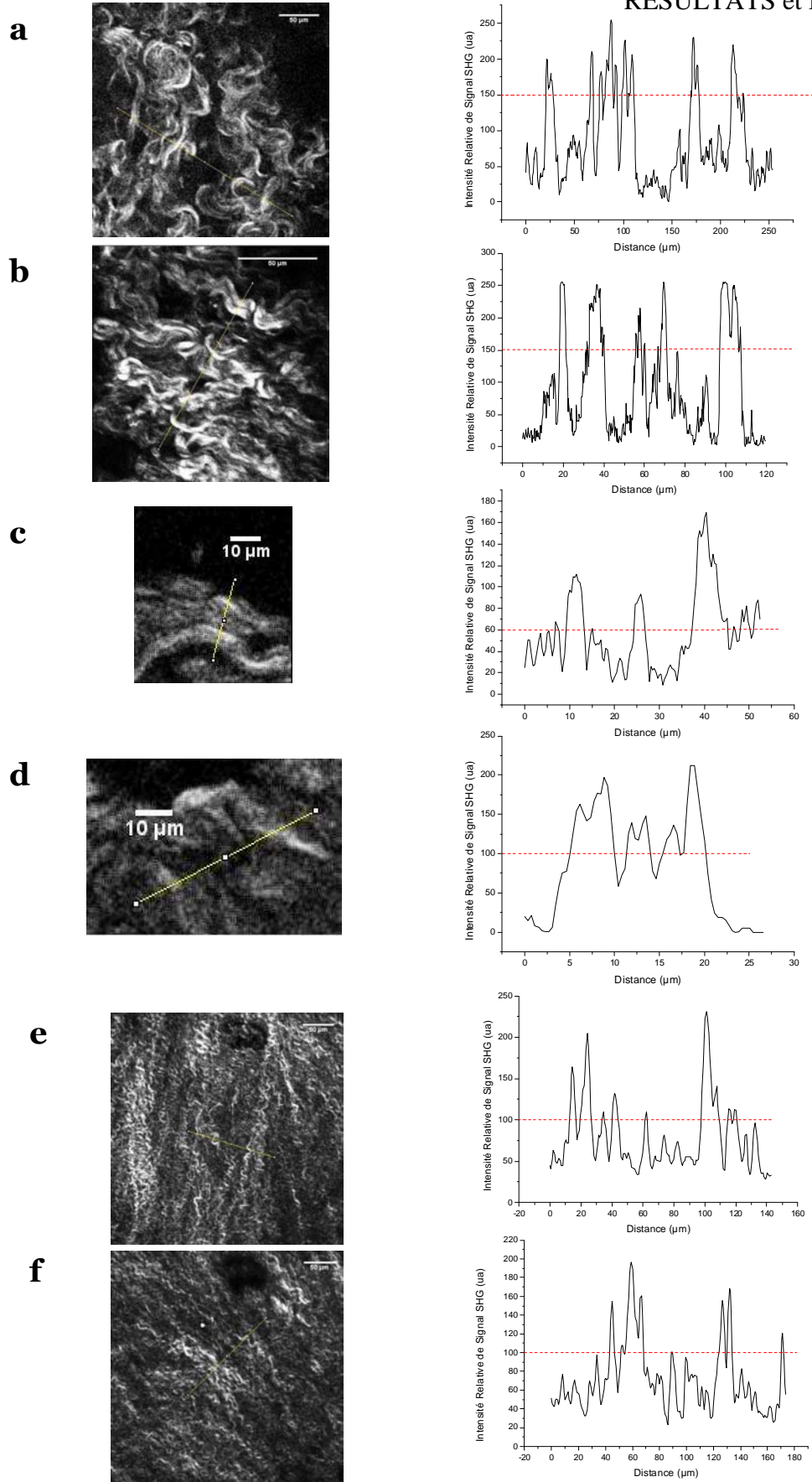


Figure 114 : Tracé des profils permettant de mesurer le diamètre des faisceaux de fibres de collagène pour différents types de vaisseaux. (a) Carotide de lapin, (b) Artère fémorale de lapin, (c-d) Aorte de lapin, (e-f) Artère ombilicale humaine.

Les faisceaux que l'on peut observer en imagerie SHG sont en réalité composés d'un ensemble de fibres. L'observation à un grossissement plus élevé permet de distinguer les fibres d'un même faisceau. En moyenne, un faisceau est composé d'environ 5 à 10 fibres de diamètre compris entre 0,6 et 0,8 μm .

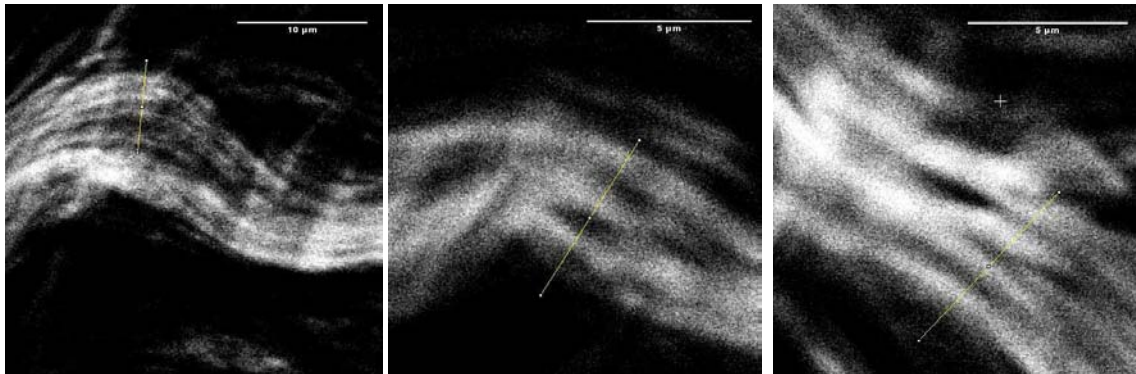


Figure 115 : Faisceaux de fibres d'une carotide de lapin. Diamètre moyen d'une fibre ~ 670 nm. Diamètre moyen d'un faisceau $\sim 7,5$ μm .

III.5.E. Etude du remodelage vasculaire après implantation.

Des artères ombilicales ont été prélevées puis conservées dans des cryotubes plongés dans de l'azote liquide (-180°C) pendant 6 mois. Elles ont ensuite été implantées chez le lapin, au niveau de la carotide, après avoir subi un traitement surfacique (dépôt d'un film de polyélectrolytes marqué à la Rhodamine B sur la surface intimale). Cette étude a été menée en collaboration avec le Dr H. Kerdjoudj (équipe Pr P. Menu) qui a réalisé les prélèvements, modifications de surface et réimplantations des substituts [184-186].

Nous avons observé des sections d'artère après décongélation, et avant le dépôt du film sur la face luminale. La structure visualisée ressemble à celle d'un vaisseau de type 'musculaire', comme l'artère fémorale. Nous n'avons pu distinguer que la limitante élastique interne du vaisseau.

Après 6 mois d'implantation, le réseau d'élastine apparaît remodelé, reconstruit, et prend l'aspect du réseau que l'on a pu observer au niveau des carotides de lapin (Figure 116), structure caractéristique d'un vaisseau de type élastique. Concernant le collagène, nous

n'avons observé que peu de signal SHG, voire pas du tout au niveau des artères ombilicales lorsqu'on en observe une section, mais en quantité plus importante pour les vaisseaux implantés durant 6 mois.

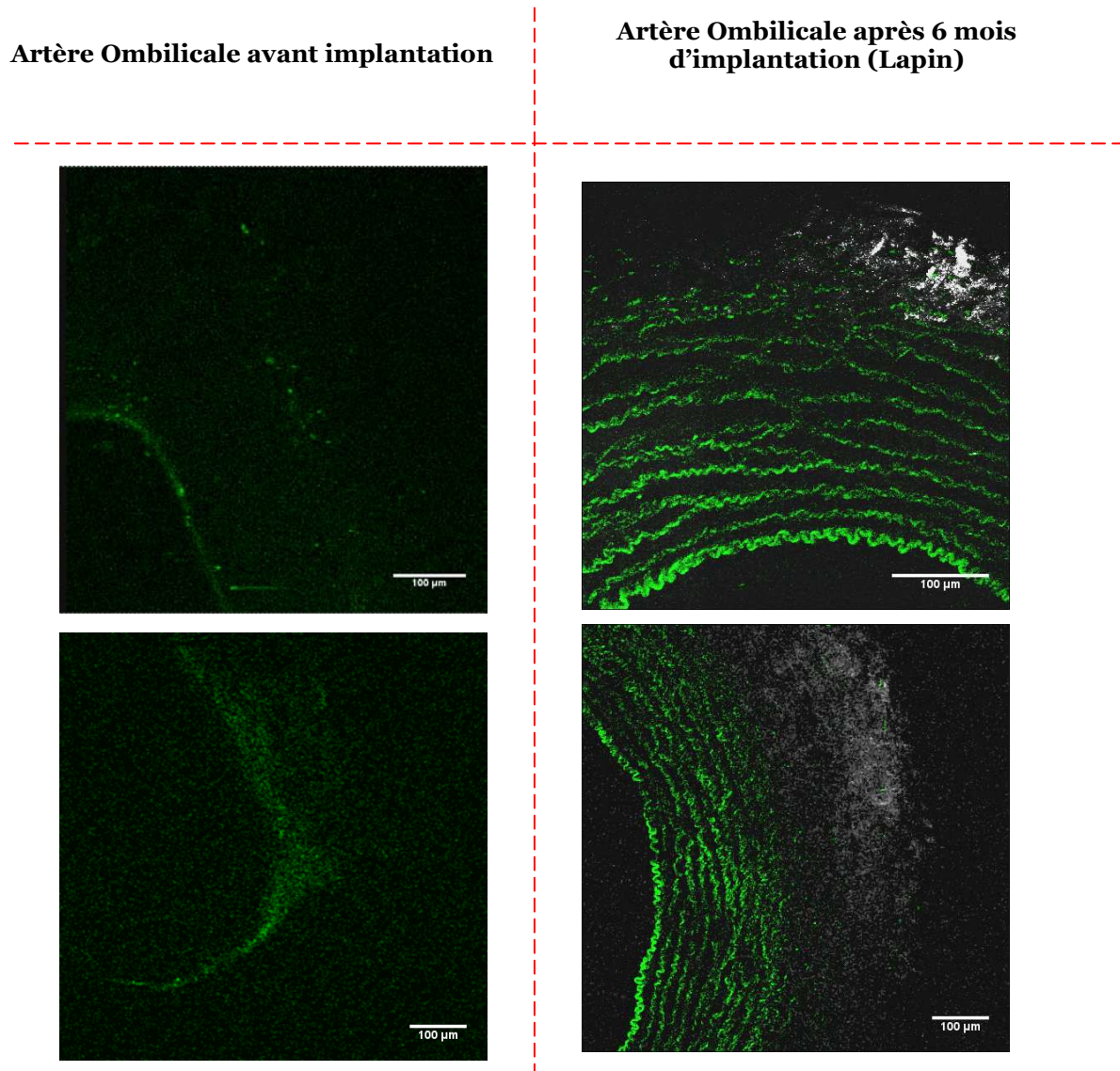


Figure 116 : Artère ombilicale humaine cryopréservée avant et après 6 mois d'implantation au niveau d'une carotide de lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Niveaux de Gris : Signal SHG – Collagène (Collection objectif x40, NA=0,8). Canal Vert : Autofluorescence (500-600 nm) – Elastine.

Sur certaines sections des substituts artériels (prélevés après 6 mois d'implantation), nous avons pu mesurer un très intense signal de fluorescence provenant de la zone limitante interne. L'analyse spectrale du signal recueilli présente un pic aux environs de 580 nm : le signal mesuré pourrait correspondre à l'émission de fluorescence de la Rhodamine B

(marquage du film de polyélectrolytes). Cependant, nous n'avons pas pu mesurer ce signal caractéristique sur l'ensemble des sections artérielles observées.

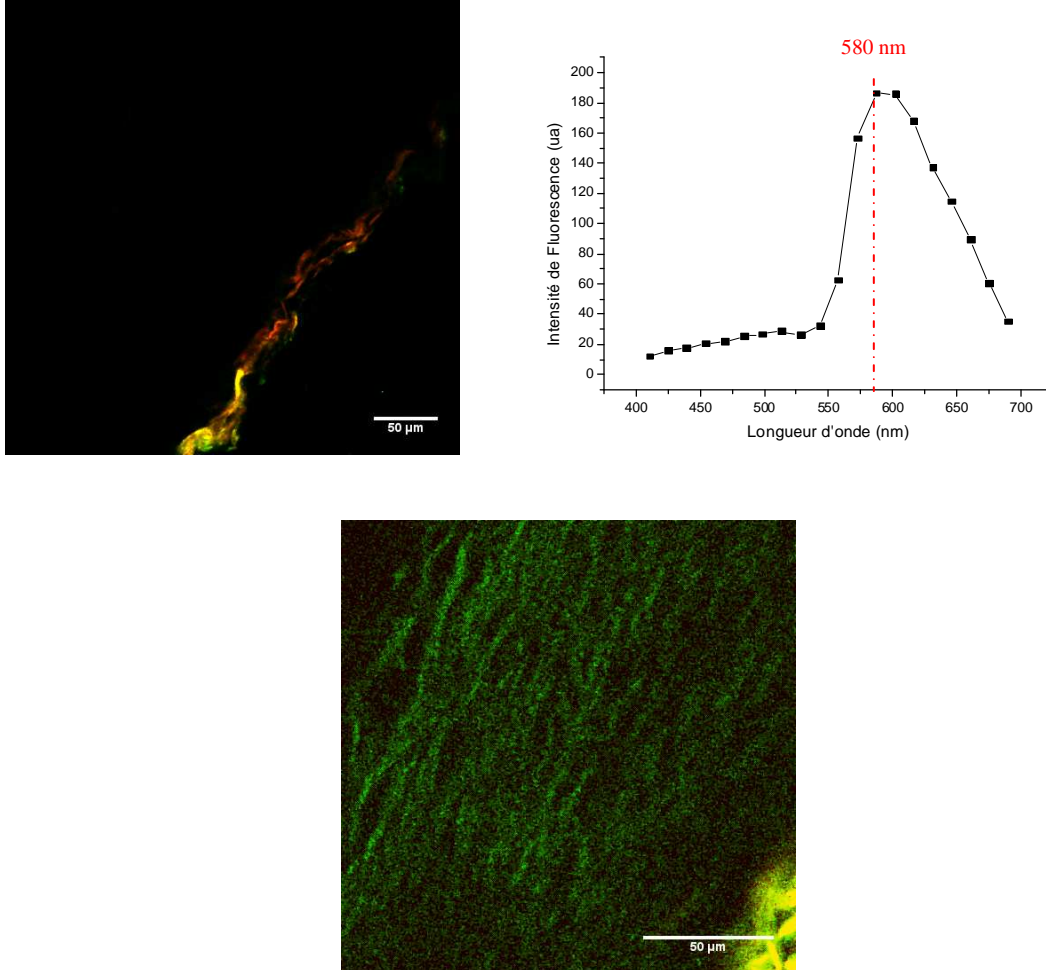


Figure 117 : Artère ombilicale humaine cryopréservée après 6 mois d'implantation au niveau d'une carotide de lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Canal Vert (500-570 nm): Autofluorescence (500-600 nm) – Elastine. Canal Rouge (580-670 nm): Fluorescence de la Rhodamine B(marquage film de polyélectrolytes). Images représentant la superposition des canaux de détection.

Un marquage de noyaux (Hoechst) permet de distinguer des cellules musculaires lisses entre les fibres élastiques de la média (noyaux allongés) et les cellules endothéliales de l'intima (noyaux plus arrondis) (Figure 118).

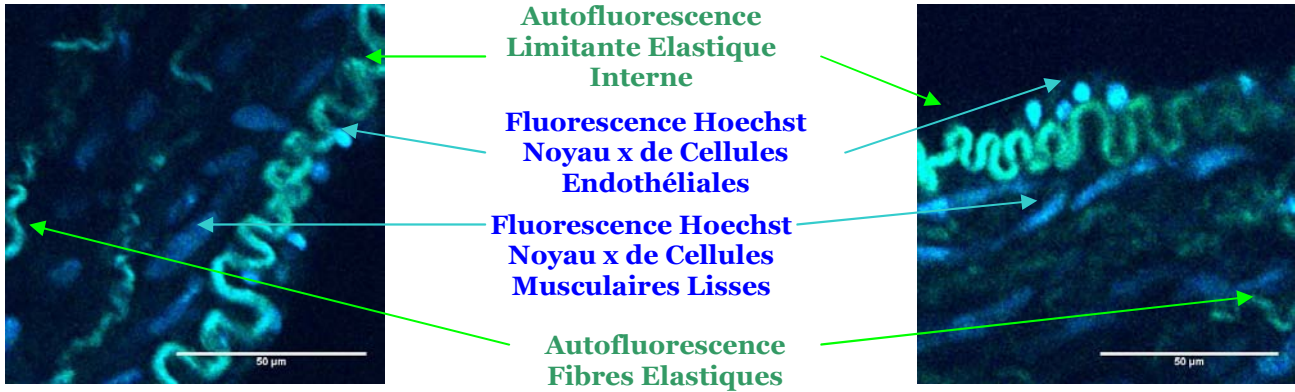


Figure 118 : Artère ombilicale humaine après 6 mois d'implantation au niveau d'une carotide de lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Niveaux de Gris : Signal SHG – Collagène (Collection objectif x40, NA=0,8). Canal Vert : Autofluorescence (500-570 nm) – Elastine. Canal Bleu : Fluorescence du Hoechst (390-480 nm) – noyaux de cellules.

Les spectres de l'autofluorescence de l'élastine et du marqueur Hoechst (noyaux) se chevauchent sur une large bande (Figure 119). Le spectre d'autofluorescence de l'élastine semble légèrement décalé vers de plus grandes longueurs d'onde, mais la discrimination spectrale reste très délicate, ce qui nécessite une approche FLIM.

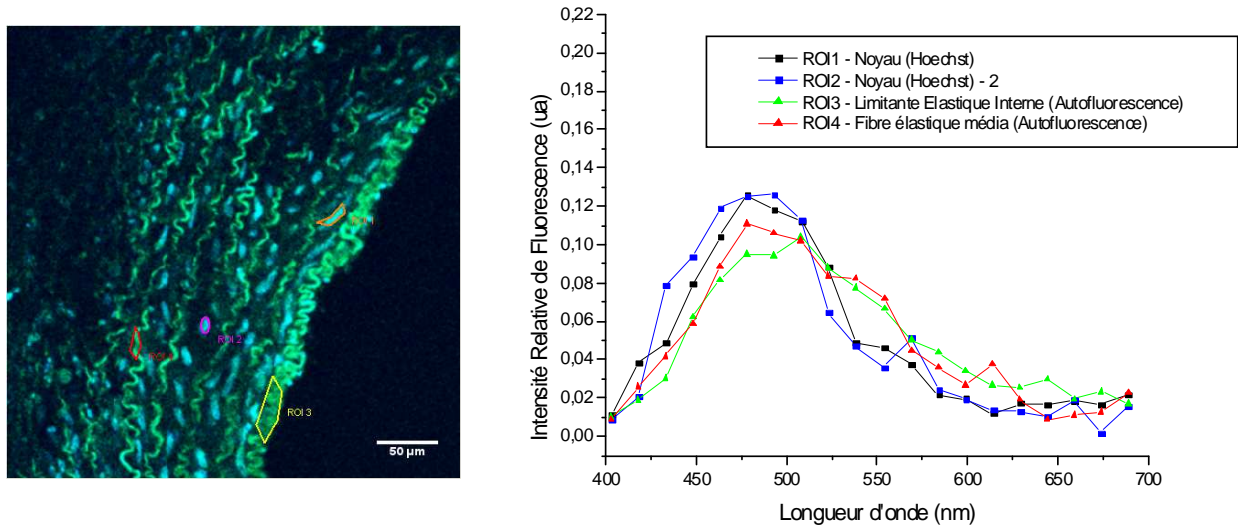


Figure 119 : Artère ombilicale humaine après 6 mois d'implantation au niveau d'une carotide de lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Niveaux de Gris : Signal SHG – Collagène (Collection objectif x40, NA=0,8). Canal Vert : Autofluorescence (500-570 nm) – Elastine. Canal Bleu : Fluorescence du Hoechst (390-480 nm) – noyaux de cellules. Spectres mesurés sur différentes régions d'intérêt : ROIs 1 et 2 : Noyaux ; ROI 3 : Limitante élastique interne ; ROI4 Fibre élastique interne.

L'imagerie en durée de vie de fluorescence, avec une excitation MP à 800 nm, nous a permis de confirmer la présence de deux populations de molécules fluorescentes distinctes. Le marqueur de noyaux (Hoechst) présente une durée de vie moyenne de fluorescence aux environs de 2,3 ns, tandis que l'autofluorescence de l'élastine est caractérisée par une constante de déclin plus courte se rapprochant de 2ns (Figure 120).

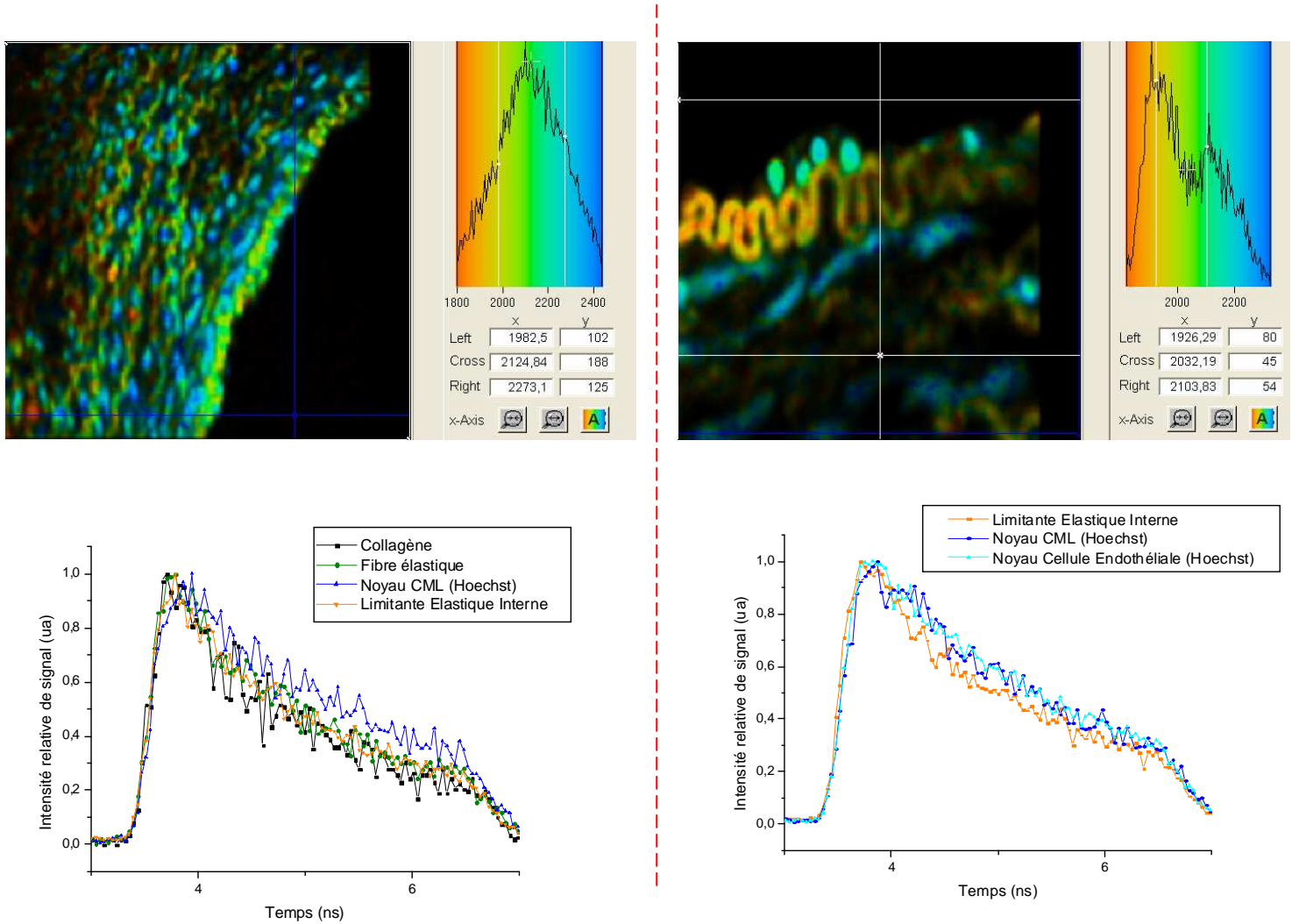


Figure 120 : Artère ombilicale humaine après 6 mois d'implantation au niveau d'une carotide de lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. Images codées en durée de vie de fluorescence – Ajustement monoexponentiel des courbes de déclin. Graphiques représentant la superposition de courbes de déclin de fluorescence correspondant à différentes zones des images.

Par ailleurs, nous nous sommes intéressés à la mesure des durées de vie de fluorescence au niveau de zones présentant une concentration importante en collagène (Figure 121). Au moyen de cet outil d'imagerie de contraste, nous pouvons discriminer les régions

riches en collagène. L'ajustement des déclins de fluorescence en mode biexponentiel puis la représentation de la durée de vie moyenne de fluorescence permet d'isoler une population de molécules présentant un τ_m de l'ordre de 0,5 ns. En comparant ces données avec les images de SHG mesurées sur la même région d'intérêt, nous pouvons constater que les zones présentant un intense signal SHG, donc une concentration élevée en collagène, correspondent aux régions caractérisées par ce temps de vie court.

Ce résultat nous amène à penser qu'une partie du signal SHG est réfléchi vers l'arrière, c'est-à-dire dans le sens inverse au rayon incident d'excitation. Comme ce processus est quasi instantané, il se traduit par l'apparition d'une composante de déclin très courte (de l'ordre de 400 ps) qui intervient de manière importante lors de l'ajustement biexponentiel des données (~80%).

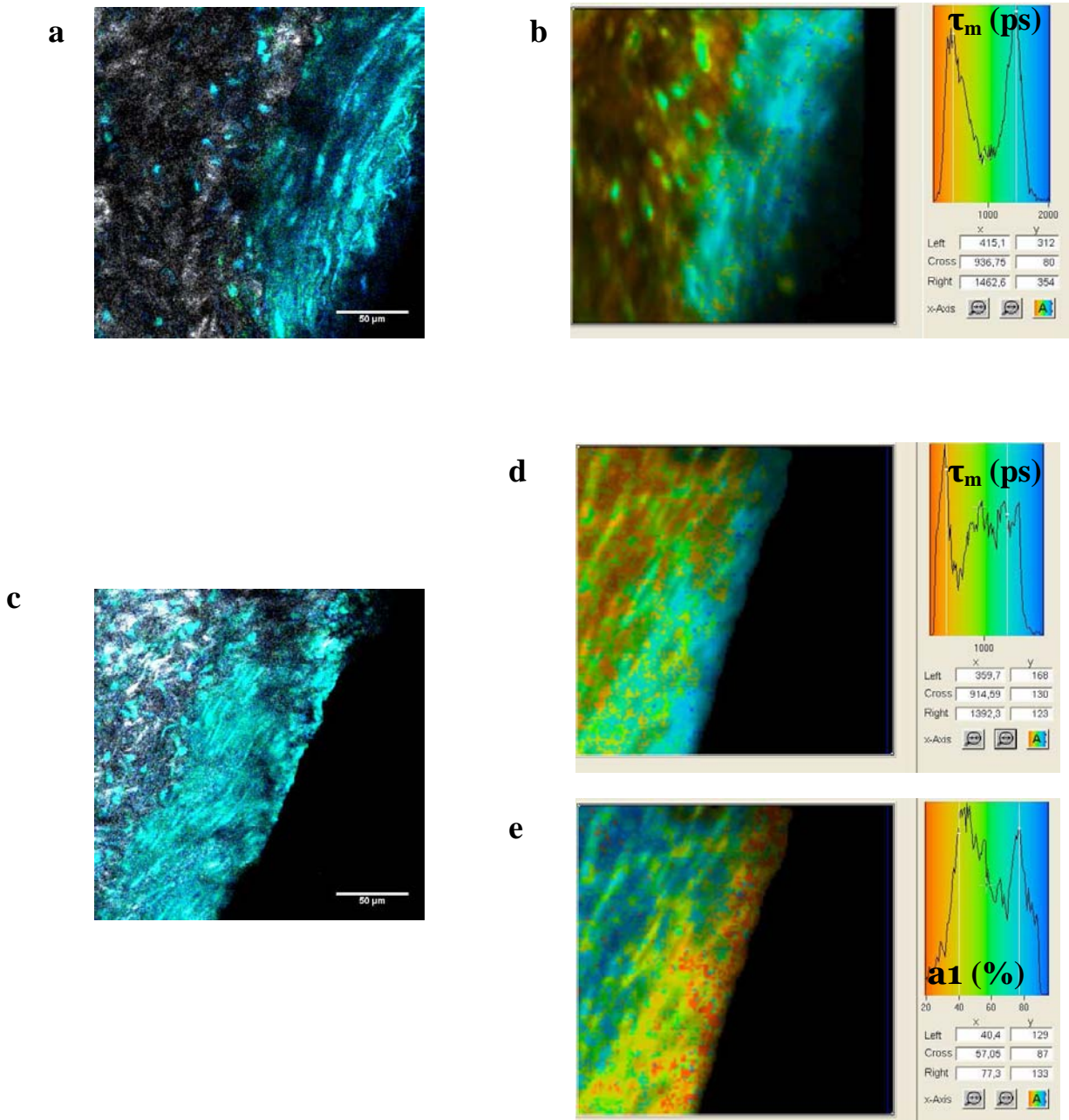


Figure 121 : Artère ombilicale humaine après 6 mois d'implantation au niveau d'une carotide de lapin. Excitation MP 800 nm, objectif x20, NA=0,7. (a,c) Niveaux de Gris : Signal SHG – Collagène (Collection objectif x40, NA=0,8). Canal Vert : Autofluorescence (400-500 nm) – Elastine. Canal bleu : Hoechst (noyaux). (b,d) Images codées en durée de vie de fluorescence – Ajustement bi-exponentiel des courbes de déclin. Histogramme de répartition des durées de vie moyennes sur les images complètes. (e) Histogramme de répartition du poids de la composante courte (a1 %).

III.5.F. Conclusion

Cette étude montre l'intérêt indéniable de l'imagerie multiphoton en plein essor pour l'observation de tissus vasculaires diffusants et opaques. En couplant le signal d'autofluorescence avec la détection de signal SHG, les principaux composants de la MEC des parois vasculaires ont été imagés sans marquage fluorescent.

Ainsi, en mettant à profit la propriété d'autofluorescence de l'élastine et la propriété de générer un signal SHG du collagène, l'observation des réseaux de la média (feuillettes d'élastine) et du réseau 3D collagénique a été possible sans marquage fluorescent. Nous avons pu apprécier le remodelage de ces réseaux intervenant après l'implantation d'une artère ombilicale humaine au niveau de la carotide d'un lapin.

La comparaison des images obtenues pour des échantillons conservés de manière différentes (fixation ou cryopréservation) nous a permis d'apprécier qualitativement les dégradations de la MEC.

L'importance de la MEC des vaisseaux a déjà été montrée dans de précédentes études. En particulier, les réseaux qui la composent subissent des modifications structurales dans des pathologies comme l'hypertension [187,188]. Concernant le contenu en élastine de parois artérielles, des corrélations ont pu être effectuées entre les résultats tirés d'analyses d'images obtenues en microscopie confocale, des dosages biochimiques, et des mesures de propriétés mécaniques [189]. L'imagerie par microscopie multiphoton, et l'association de la détection de fluorescence de l'élastine et du signal SHG du collagène pourrait permettre d'approfondir ce type de résultats, sans passer par l'utilisation d'un marquage fluorescent exogène.

Par ailleurs, l'interaction entre les cellules et la MEC semble jouer un rôle important dans le remodelage vasculaire et par la suite dans le développement de pathologies [190].

III.6. Imagerie de tumeurs et intérêt de la macrofluorescence

III.6.A. Vascularisation tumorale et diffusion d'un photosensibilisateur au sein de la tumeur visualisé en microscopie non linéaire

La thérapie photodynamique (PDT), méthode de lutte clinique contre le cancer, repose sur l'injection d'un photosensibilisateur suivie d'un éclairage intense au moment où celui-ci est préférentiellement distribué dans les tissus tumoraux, en vue de leur destruction. L'objectif de ce travail porte sur les cinétiques de diffusion d'un photosensibilisateur de nouvelle génération (Foslip®) au sein de tumeurs, suite à une injection intratumorale, travail mené en collaboration avec le Centre Alexis Vautrin de Nancy (L. Bolotine, MA. d'Hallewin, Y. Viry-Babel).

Cette étude repose sur l'utilisation des techniques de détection de fluorescence en mode Infrarouge, en particulier spectral, FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy), et SHG (Second Harmonic Generation) en vue d'obtenir des informations structurales (microvascularisation) et ainsi que la distribution chronobiologique en temps réel du photosensibilisateur naturellement fluorescent au sein de la tumeur.

Le réseau de microvascularisation au sein de tumeurs générées par injection sous-cutanée de cellules murines de carcinomes mammaires EMT6 à des souris BALB/c (effectuée par l'équipe du CAV), a été visualisé au moyen de billes fluorescentes orange ($\varnothing = 22 \mu\text{m}$). La cinétique de diffusion du photosensibilisateur testé a été suivie pour optimiser la 'Dose-Ranging' en vue du traitement photodynamique.

L'imagerie spectrale a permis de discriminer les différentes sondes fluorescentes (billes, photosensibilisateur, Hoechst) et de quantifier le signal obtenu pour chaque structure ciblée (vaisseau, masse tumorale, noyau).

Au niveau des vaisseaux sanguins, le niveau de fluorescence mesuré pour les billes orange (560 nm), et le photosensibilisateur (660 nm) est directement proportionnel au temps qui sépare l'injection et le sacrifice de la souris. Le mode FLIM permet de discriminer les trois sondes fluorescentes au sein de la tumeur sur la base de leur constante de déclin (2,3 ns pour Hoechst, 2,7 ns pour le photosensibilisateur et 3,9 ns pour les billes). En

macrofluorescence les résultats ont montré une augmentation progressive de la quantité de photosensibilisateur dans le tissu tumoral pour des temps allant de 30 minutes à 15 heures (30 min, 1, 3, 6, 15 et 24 h) et peuvent être visualisées sur la Figure 126 au § III.6.C.

Ce travail nous a permis de préciser les temps maximum pour lesquels la dose du photosensibilisateur est optimisée avant l'irradiation de la tumeur par PDT. Les méthodes de détection de fluorescence (spectre, intensité, durée de vie, SHG) associées au système macroscopique, pour la visualisation de la tumeur dans son intégrité, représentent des avancées majeures en photodiagnostic optique.

Différentes modalités d'imagerie ont été couplées afin d'obtenir des informations sur la distribution de photosensibilisateur au sein de la tumeur [141]. Les billes fluorescentes présentent un spectre d'émission de fluorescence aisément discriminable de celui du photosensibilisateur. Les spectres sont centrés respectivement sur 570 nm pour les billes et 670 nm pour le PS (Figure 122 et Figure 123).

On peut remarquer que le spectre de la Figure 122 présente un pic d'émission à 400 nm correspondant à la moitié de la longueur d'excitation utilisée (800 nm). Ce signal représente une faible proportion de signal SHG réfléchi dans le sens inverse au rayon incident (signal SHG 'backward'). Le signal étant trop faible, nous avons cherché à le caractériser par la suite (cf. § III.6.B) en mesurant le signal dans le sens du rayon incident (en mode 'Lumière Transmise').

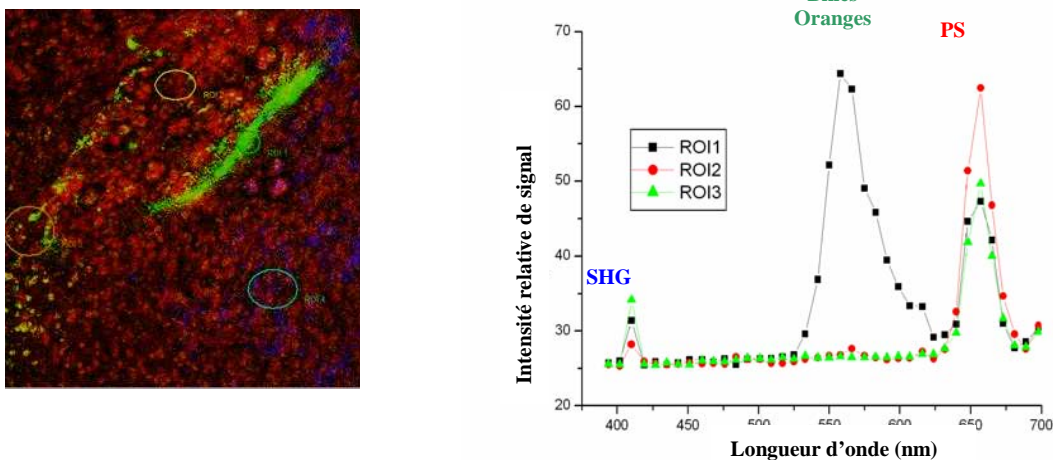


Figure 122 : Spectres de fluorescence associés à différentes régions d'intérêt. Vascularisation de tumeur murine. Excitation MP 820 nm, obj x20 (NA=0.7). Projection (Profondeur 83 μ m) ; Superposition : Canal Bleu 400-425 nm (SHG), Canal Vert 540-600 nm (Réseau vasculaire visualisé par fluorescence de microsphères de polystyrène), Canal Rouge 655-700 nm (photosensibilisateur).

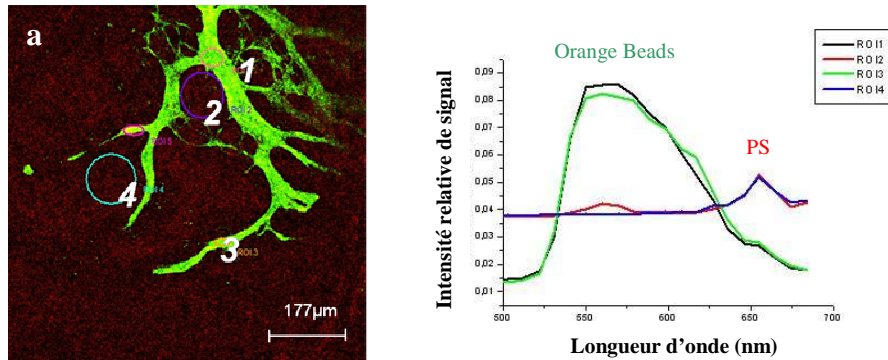


Figure 123 : Spectres de fluorescence associés à différentes régions d'intérêt. Vascularisation de tumeur murine suite à une injection de photosensibilisateur. Excitation MP 820 nm, obj x20 (NA=0,7). Canal Vert 540-600 nm (Réseau vasculaire visualisé par fluorescence de microsphères de polystyrène), Canal Rouge 655-700 nm (photosensibilisateur).

Nous avons en parallèle cherché à discriminer les espèces fluorescentes en présence sur la base de leur durée de vie de fluorescence. La Figure 124 présente une image codée en durée de vie de fluorescence de la même tumeur imagée sur la Figure 123 en intensité de fluorescence. Deux populations se distinguent nettement, la première présentant une constante de déclin courte de l'ordre de 2 ns, correspondant au photosensibilisateur, la seconde présentant une constante plus longue, de l'ordre de 3,6 ns associée aux billes fluorescentes. Malgré la faible proportion de signal de fluorescence du PS par rapport aux billes (Figure 123), l'imagerie FLIM permet la distinction des espèces en présence (Figure 124).

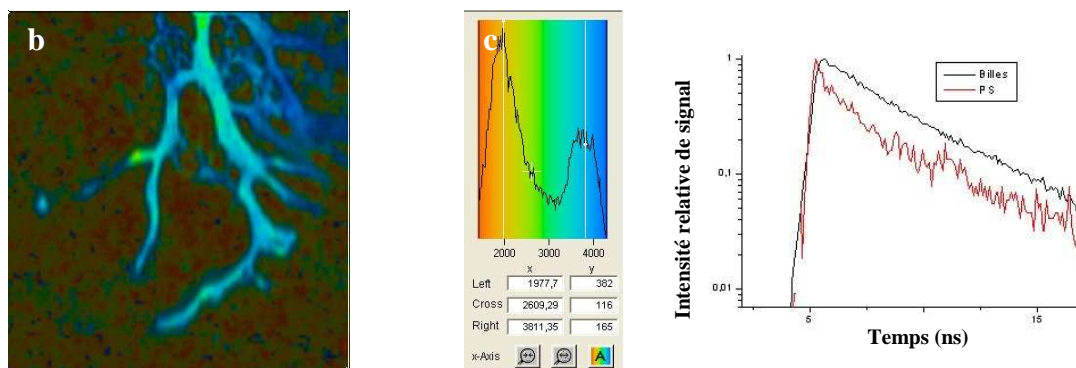


Figure 124 : Vascularisation de tumeur murine suite à une injection de photosensibilisateur. Excitation MP 820 nm, obj x20 (NA=0,7). Réseau vasculaire visualisé par fluorescence de microsphères de polystyrène. Images en durées de vie de fluorescence. Histogramme de répartition des temps de vie sur l'image complète. Déclins de fluorescence (Billes ~3,6 ns ; PS ~2,3 ns).

III.6.B. Le réseau de collagène des tumeurs

En introduction (§ I.1.C), nous avons rappelé l'intérêt grandissant des chercheurs pour le réseau de collagène dans les états précancéreux ou cancéreux qui serait éventuellement remodelé lors de la croissance des tumeurs. Nous avons pu mettre en évidence les potentialités de l'imagerie par SHG en vue de caractériser ce réseau de collagène intervenant dans la composition matricielle des tumeurs. La Figure 125 représente ces réseaux de collagène qui s'intègrent dans le tissu tumoral ayant intégré le photosensibilisateur. On peut noter des organisations différentes des réseaux : tantôt celui-ci est composé de fibres présentant le même type d'enroulement que les faisceaux visualisés pour des échantillons de peau ou dans l'adventice des artères, tantôt les structures semblent plus agrégés et on distingue des spots au niveau des images.

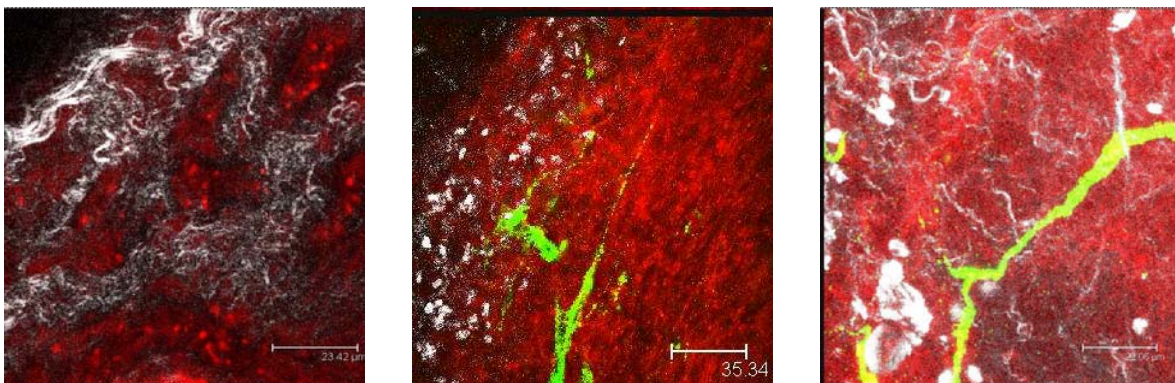


Figure 125 : Vascularisation de tumeur murine. Excitation MP 800 nm, obj x20 (NA=0,7). Projection (Profondeur 83 μ m) ; Superposition : Niveaux de Gris (SHG provenant du réseau de collagène), Canal Vert 540-600 nm (Réseau vasculaire visualisé par fluorescence de microsphères de polystyrène), Canal Rouge 655-700 nm (photosensibilisant).

III.6.C. L'intérêt de l'imagerie en macrofluorescence

Une partie de l'étude a été menée en utilisant un système de macrofluorescence qui permet l'observation de l'intégralité d'une tumeur à la différence de la microscopie dont le champ d'observation est plus restreint. Les tumeurs ont été prélevées respectivement 30 minutes, 1, 3, 6 et 24 h après l'injection intratumorale. La Figure 126 représente l'évolution de la quantité de signal de fluorescence au sein de la tumeur. La concentration et la répartition

du PS apparaissent inhomogènes, mais sa concentration est croissante au cours du temps. Ces images ont été acquises au moyen d'une excitation avec une lampe fluorescente (filtre passe-bande 560/40 nm), et une détection au travers d'un filtre adapté à la détection du PS (filtre passe-bande 645/75 nm).

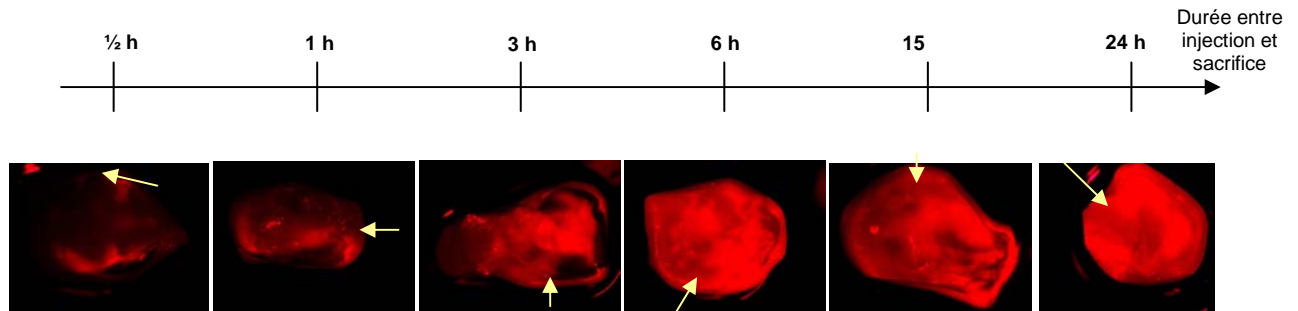


Figure 126 : Fluorescence du Foslip® au sein d'une tumeur injectée de manière intratumorale. Evolution de la distribution en fonction de différents temps entre l'injection et le sacrifice (1/2, 1, 3, 6 et 24 h). Flèches indiquant le point d'injection. Excitation : Filtre Passe-Bande 560/40 nm. Emission : Filtre Passe-Bande 645/75 nm.

III.6.D. Conclusion

Cette étude avait pour but de localiser la vascularisation tumorale après injection d'un marqueur fluorescent (billes). La distribution d'un photosensibilisateur fluorescent au sein du tissu tumoral a pu être appréciée à une échelle microscopique puis macroscopique.

Dans un premier temps, les signaux provenant de la vascularisation et du tissu tumoral ont pu être discriminés spectralement, puisque les spectres d'émission des deux espèces étudiées ne présentent qu'un léger chevauchement.

Etant donné que l'imagerie en mode 'Spectral' est fortement dépendante du ratio des sondes fluorescentes et de leur concentration respective, l'imagerie des durées de vie de fluorescence nous a permis de confirmer la présence de ces deux espèces fluorescentes (billes et photosensibilisateur), malgré une émission de fluorescence beaucoup plus intense pour la première. Par ailleurs, la durée de vie de fluorescence dépendant de l'environnement physicochimique immédiat des sondes fluorescentes, des études complémentaires pourraient être envisagées pour suivre l'état environnemental des molécules de photosensibilisateur : une forme dimérée des molécules devrait engendrer une mesure de durée de vie plus courte

qu'une structure monomérisée. Un projet est mené actuellement sur ce sujet par le Dr HP Lasalle (résultats sous presse).

Dans un second temps, nous avons montré que l'imagerie de type macrofluorescence permet d'avoir une appréciation de la distribution de photosensibilisateur au sein de la tumeur entière. Cette approche est complémentaire à la microscopie de fluorescence plus apte à la distinction de structures à l'échelle moléculaire. Les images présentées dans ce travail ont été réalisées au moyen d'une excitation avec une lampe fluorescente.

Mais il serait intéressant d'utiliser cette approche macroscopique couplée à une méthode d'imagerie confocale (excitation visible) ou multiphoton. Ce projet fait l'objet d'un développement entre l'IGBMC (Strasbourg) et l'Ecole Polytechnique (Paris).

Par ailleurs, les possibilités d'imager les réseaux de collagène au sein de tumeurs ouvrent des perspectives intéressantes, puisque la densité de ces réseaux peut influencer sur la migration de cellules cancéreuses, ou la formation de néovaisseaux.

Il serait intéressant de coupler les avantages des diverses techniques, c'est-à-dire l'observation d'un champ large pour la macrofluorescence, la résolution spatiale et possibilité d'imagerie nette en 3D pour le confocal, et l'excitation MP pour une meilleure pénétration du rayon d'excitation et la possibilité d'étendre les modalités (FLIM, SHG).

IV. CONCLUSION GENERALE

Cette étude nous a permis de valider les potentialités de l'imagerie microscopique associée à une excitation multiphoton impulsionnelle pour imager des tissus en profondeur. En particulier, les principaux constituants des MEC du cartilage et des parois vasculaires ont pu être imagés sans marquage fluorescent exogène.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence des conditions d'excitation sur la probabilité d'absorption multiphoton. Pour cela, deux systèmes de modulation du faisceau d'excitation ont été comparés.

Nous avons pu mettre à profit les propriétés d'autofluorescence des protéoglycannes du cartilage ou encore du réseau d'élastine des parois vasculaires. Par ailleurs, le collagène est un constituant matriciel entrant dans la composition de la plupart des tissus biologiques. Cette molécule est caractérisée par des propriétés non linéaires que nous avons pu mettre à profit pour imager les réseaux par génération d'un signal de seconde harmonique sous une excitation MP.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la MEC cartilagineuse. Nous avons comparé le signal SHG émanant de cette matrice en fonction de différentes contraintes environnementales de l'échantillon. Ainsi, en soumettant les échantillons à une contrainte de compression, nous avons pu déterminer une restructuration de la MEC, en nous basant sur des outils d'analyse de texture d'images (paramètres de Haralick). En revanche, une action enzymatique de la Collagénase B entraîne rapidement une perte du signal SHG, suggérant une dénaturation des molécules de collagène qui perdraient ainsi leur propriété de susceptibilité non linéaire.

Le second axe d'étude que nous avons choisi de développer concerne l'imagerie vasculaire. L'association d'une excitation MP à une détection du signal d'autofluorescence et du signal SHG nous a permis de visualiser les parois de différents types de vaisseaux (musculaires ou élastiques). Ainsi l'autofluorescence de l'élastine nous a permis d'observer un remodelage du réseau d'élastine après implantation d'une artère ombilicale humaine (dont la surface luminale a été modifiée) au niveau de la carotide d'un lapin. La microscopie par SHG nous a permis d'apprécier qualitativement le réseau de collagène de l'adventice en fonction de différentes méthodes de conservation d'échantillons. Ainsi, le réseau de collagène ne semble pas être affecté par une fixation au PAF 5%, mais il est partiellement dégradé lors d'une cryopréservation à -180°C.

De nombreuses pathologies articulaires (arthrose) ou vasculaire (hypertension, athérosclérose) ou relevant du domaine de la cancérologie entraînent des altérations, une restructuration ou un remodelage des matrices extracellulaires. La possibilité d'imager les structures de ces matrices en profondeur et sans marqueur exogène présente donc un fort potentiel et ouvre de larges perspectives d'études. L'utilisation de l'imagerie multiphoton, associée à des techniques d'analyse d'images (analyse de texture, morphologie, segmentation) pourrait permettre de caractériser ce remodelage et représenterait un outil diagnostique utile.

Le couplage de ces modalités de détection (en particulier le mode SHG, Spectral ou FLIM) à une imagerie de type macroscopique permettrait d'allier les avantages d'une excitation multiphoton (profondeur, invasivité minimale) à ceux du microscope (visualisation d'un champ beaucoup plus grand).

Outre les perspectives diagnostiques, une des applications envisagées pourrait être la validation d'un biotissu en terme de biofonctionnalité. En effet, la synthèse matricielle intervient également lorsque les cellules sontensemencées sur différents types de support en vue d'aboutir à un biomatériau implantable chez l'homme (par exemple la synthèse de collagène par les chondrocytes ensemencés dans des billes d'alginate ou des éponges de collagène). Les méthodes d'imagerie utilisées dans ce travail pourraient permettre de suivre ces modifications de manière non invasive puis de valider les structures avant implantation, en déterminant un indice de fonctionnalité basé par exemple sur le contenu en collagène d'un matériau fonctionnalisé.

Ces outils d'imagerie ouvrent des perspectives pour la recherche pharmacologique. Ils pourraient être utilisés pour suivre en temps réel l'action de médicaments sur les réseaux des matrices extracellulaires. Des applications intéressantes dans le domaine de la cancérologie seraient probables puisque le relâchement du réseau de collagène faciliterait la diffusion des agents traitants au sein du tissu tumoral.

Bibliographie

- [1] Vaquette C, Frochot C, Rahouadj R, Wang X. An innovative method to obtain porous PLLA scaffolds with highly spherical and interconnected pores. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007;86B (1):9-17.
- [2] Kerdjoudj H, Moby V, Berthelemy N, Gentils M, Boura C, Bordenave L, Stoltz JF, Menu P. The ideal small arterial substitute: Role of cell seeding and tissue engineering. *Clin Hemorheol Microcirc* 2007;37 (1-2):89-98.
- [3] Vaquette C, Fawzi-Grancher S, Lavallo P, Frochot C, Viriot ML, Muller S, Wang X. In vitro biocompatibility of different polyester membranes. *Biomed Mater Eng* 2006;16 (4 Suppl):S131-6.
- [4] Gigant-Huselstein C, Hubert P, Dumas D, Dellacherie E, Netter P, Payan E, Stoltz JF. Expression of adhesion molecules and collagen on rat chondrocyte seeded into alginate and hyaluronate based 3D biosystems. Influence of mechanical stresses. *Biorheology* 2004;41 (3-4):423-31.
- [5] Eyre D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* 2002;4 (1):30-5.
- [6] Kouri JB, Jimenez SA, Quintero M, Chico A. Ultrastructural study of chondrocytes from fibrillated and non-fibrillated human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 1996;4 (2):111-25.
- [7] Notzli H, Clark J. Deformation of loaded articular cartilage prepared for scanning electron microscopy with rapid freezing and freeze-substitution fixation. *J Orthop Res* 1997;15 (1):76-86.
- [8] Dumas D, Grossin L, Cauchois G, Gentils M, Santus R, Stoltz JF. Comparison of wide-field/deconvolution and confocal microscopy in bioengineering. Interest of multi-photon microscopy in the study of articular cartilage. *Biorheology* 2003;40 (1-3):253-9.
- [9] Dumas D, Riquelme B, Werkmeister E, De Isla N, Stoltz JF. Multimodality of Microscopy Imaging applied to Cartilage Tissue Engineering. *Osteoarthritis, Inflammation and Degradation : A Continuum* 2007.
- [10] Quinn TM, Morel V. Microstructural modeling of collagen network mechanics and interactions with the proteoglycan gel in articular cartilage. *Biomech Model Mechanobiol* 2007;6 (1-2):73-82.
- [11] Scott JE. Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem J* 1988;252 (2):313-23.
- [12] Hollander AP, Pidoux I, Reiner A, Rorabeck C, Bourne R, Poole AR. Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. *J Clin Invest* 1995;96 (6):2859-69.
- [13] Wei L, Hjerpe A, Brismar BH, Svensson O. Effect of load on articular cartilage matrix and the development of guinea-pig osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9 (5):447-53.
- [14] Bank RA, Soudry M, Maroudas A, Mizrahi J, TeKoppele JM. The increased swelling and instantaneous deformation of osteoarthritic cartilage is highly correlated with collagen degradation. *Arthritis Rheum* 2000;43 (10):2202-10.
- [15] Broom ND. An enzymatically induced structural transformation in articular cartilage. Its significance with respect to matrix breakdown. *Arthritis Rheum* 1988;31 (2):210-8.
- [16] Broom ND. Structural consequences of traumatizing articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 1986;45 (3):225-34.

- [17] Jenniskens YM, Koevoet W, de Bart AC, Weinans H, Jahr H, Verhaar JA, DeGroot J, van Osch GJ. Biochemical and functional modulation of the cartilage collagen network by IGF1, TGFbeta2 and FGF2. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14 (11):1136-46.
- [18] Kozaci LD, Buttle DJ, Hollander AP. Degradation of type II collagen, but not proteoglycan, correlates with matrix metalloproteinase activity in cartilage explant cultures. *Arthritis Rheum* 1997;40 (1):164-74.
- [19] Mort JS, Dodge GR, Roughley PJ, Liu J, Finch SJ, DiPasquale G, Poole AR. Direct evidence for active metalloproteinases mediating matrix degradation in interleukin 1-stimulated human articular cartilage. *Matrix* 1993;13 (2):95-102.
- [20] Broom N, Chen MH, Hardy A. A degeneration-based hypothesis for interpreting fibrillar changes in the osteoarthritic cartilage matrix. *J Anat* 2001;199 (Pt 6):683-98.
- [21] Choi JB, Youn I, Cao L, Leddy HA, Gilchrist CL, Setton LA, Guilak F. Zonal changes in the three-dimensional morphology of the chondron under compression: the relationship among cellular, pericellular, and extracellular deformation in articular cartilage. *J Biomech* 2007;40 (12):2596-603.
- [22] Kaab MJ, Ito K, Clark JM, Notzli HP. The acute structural changes of loaded articular cartilage following meniscectomy or ACL-transection. *Osteoarthritis Cartilage* 2000;8 (6):464-73.
- [23] Kaab MJ, Ito K, Rahn B, Clark JM, Notzli HP. Effect of mechanical load on articular cartilage collagen structure: a scanning electron-microscopic study. *Cells Tissues Organs* 2000;167 (2-3):106-20.
- [24] Kaab MJ, Richards RG, Ito K, ap Gwynn I, Notzli HP. Deformation of chondrocytes in articular cartilage under compressive load: a morphological study. *Cells Tissues Organs* 2003;175 (3):133-9.
- [25] Glaser C, Putz R. Functional anatomy of articular cartilage under compressive loading. Quantitative aspects of global, local and zonal reactions of the collagenous network with respect to the surface integrity. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10 (2):83-99.
- [26] Dodge GR, Poole AR. Immunohistochemical detection and immunochemical analysis of type II collagen degradation in human normal, rheumatoid, and osteoarthritic articular cartilages and in explants of bovine articular cartilage cultured with interleukin 1. *J Clin Invest* 1989;83 (2):647-61.
- [27] Hollander AP, Heathfield TF, Webber C, Iwata Y, Bourne R, Rorabeck C, Poole AR. Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay. *J Clin Invest* 1994;93 (4):1722-32.
- [28] Broom ND, Marra DL. Ultrastructural evidence for fibril-to-fibril associations in articular cartilage and their functional implication. *J Anat* 1986;146:185-200.
- [29] Chen MH, Broom N. On the ultrastructure of softened cartilage: a possible model for structural transformation. *J Anat* 1998;192 (Pt 3):329-41.
- [30] Kaab MJ, Ito K, Clark JM, Notzli HP. Deformation of articular cartilage collagen structure under static and cyclic loading. *J Orthop Res* 1998;16 (6):743-51.
- [31] Thibault M, Poole AR, Buschmann MD. Cyclic compression of cartilage/bone explants in vitro leads to physical weakening, mechanical breakdown of collagen and release of matrix fragments. *J Orthop Res* 2002;20 (6):1265-73.
- [32] Dumas D, Gigant C, Presle N, Cipolletta C, Miralles G, Payan E, Jouzeau JY, Mainard D, Terlain B, Netter P, Stoltz JF. The role of 3D-microscopy in the study of chondrocyte-matrix interaction (alginate bead or sponge, rat femoral head cap, human osteoarthritic cartilage) and pharmacological application. *Biorheology* 2000;37 (1-2):165-76.

- [33] Huselstein C, de Isla N, Kolopp-Sarda MN, Kerdjoudj H, Muller S, Stoltz JF. Influence of mechanical stress on cell viability. *Biorheology* 2006;43 (3-4):371-5.
- [34] Guilak F, Alexopoulos LG, Upton ML, Youn I, Choi JB, Cao L, Setton LA, Haider MA. The pericellular matrix as a transducer of biomechanical and biochemical signals in articular cartilage. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1068:498-512.
- [35] Dimicco MA, Kisiday JD, Gong H, Grodzinsky AJ. Structure of pericellular matrix around agarose-embedded chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15 (10):1207-16.
- [36] Poole C, Ayad S, Schofield J. Chondrons from articular cartilage. I. Immunolocalization of type VI collagen in the pericellular capsule of isolated canine tibial chondrons. *Journal of Cell Science* 1988;90:635-43.
- [37] Poole CA, Ayad S, Gilbert RT. Chondrons from articular cartilage. V. Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organisation in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy. *J Cell Sci* 1992;103 (Pt 4):1101-10.
- [38] Sherwin AF, Carter DH, Poole CA, Hoyland JA, Ayad S. The distribution of type VI collagen in the developing tissues of the bovine femoral head. *Histochem J* 1999;31 (9):623-32.
- [39] Hambach L, Neureiter D, Zeiler G, Kirchner T, Aigner T. Severe disturbance of the distribution and expression of type VI collagen chains in osteoarthritic articular cartilage. *Arthritis Rheum* 1998;41 (6):986-96.
- [40] Swoboda B, Pullig O, Kirsch T, Kladny B, Steinhauser B, Weseloh G. Increased content of type-VI collagen epitopes in human osteoarthritic cartilage: quantitation by inhibition ELISA. *J Orthop Res* 1998;16 (1):96-9.
- [41] Horikawa O, Nakajima H, Kikuchi T, Ichimura S, Yamada H, Fujikawa K, Toyama Y. Distribution of type VI collagen in chondrocyte microenvironment: study of chondrons isolated from human normal and degenerative articular cartilage and cultured chondrocytes. *J Orthop Sci* 2004;9 (1):29-36.
- [42] Silver FH, Horvath I, Foran DJ. Viscoelasticity of the vessel wall: the role of collagen and elastic fibers. *Crit Rev Biomed Eng* 2001;29 (3):279-301.
- [43] Shadwick RE. Mechanical design in arteries. *J Exp Biol* 1999;202 (Pt 23):3305-13.
- [44] Fonck E, Prod'homme G, Roy S, Augsburg L, Rufenacht DA, Stergiopoulos N. Effect of elastin degradation on carotid wall mechanics as assessed by a constituent-based biomechanical model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292 (6):H2754-63.
- [45] Sasamura H, Shimizu-Hirota R, Saruta T. Extracellular Matrix Remodeling in Hypertension. *Current Hypertension Reviews* 2005;1:51-60.
- [46] Arribas SM, Daly CJ, Gonzalez MC, McGrath JC. Imaging the vascular wall using confocal microscopy. *J Physiol* 2007;584 (Pt 1):5-9.
- [47] van Zandvoort M, Engels W, Douma K, Beckers L, Oude Egbrink M, Daemen M, Slaaf DW. Two-photon microscopy for imaging of the (atherosclerotic) vascular wall: a proof of concept study. *J Vasc Res* 2004;41 (1):54-63.
- [48] Yu W, Braz JC, Dutton AM, Prusakov P, Rekhter M. In vivo imaging of atherosclerotic plaques in apolipoprotein E deficient mice using nonlinear microscopy. *J Biomed Opt* 2007;12 (5):054008.
- [49] Davis GE, Senger DR. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res* 2005;97 (11):1093-107.
- [50] Ben Driss A, Benessiano J, Poitevin P, Levy BI, Michel JB. Arterial expansive remodeling induced by high flow rates. *Am J Physiol* 1997;272 (2 Pt 2):H851-8.

- [51] Hayashi K, Mori K, Miyazaki H. Biomechanical response of femoral vein to chronic elevation of blood pressure in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284 (2):H511-8.
- [52] Langille BL, Bendeck MP, Keeley FW. Adaptations of carotid arteries of young and mature rabbits to reduced carotid blood flow. *Am J Physiol* 1989;256 (4 Pt 2):H931-9.
- [53] Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, Levick SP, Janicki JS. The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006;30 (4):604-10.
- [54] Driessen NJ, Cox MA, Bouten CV, Baaijens FP. Remodelling of the angular collagen fiber distribution in cardiovascular tissues. *Biomech Model Mechanobiol* 2008;7 (2):93-103.
- [55] Hariton I, de Botton G, Gasser TC, Holzapfel GA. Stress-driven collagen fiber remodeling in arterial walls. *Biomech Model Mechanobiol* 2007;6 (3):163-75.
- [56] Hariton I, deBotton G, Gasser TC, Holzapfel GA. Stress-modulated collagen fiber remodeling in a human carotid bifurcation. *J Theor Biol* 2007;248 (3):460-70.
- [57] Konig K, Schenke-Layland K, Riemann I, Stock UA. Multiphoton autofluorescence imaging of intratissue elastic fibers. *Biomaterials* 2005;26 (5):495-500.
- [58] Zoumi A, Lu X, Kassab GS, Tromberg BJ. Imaging coronary artery microstructure using second-harmonic and two-photon fluorescence microscopy. *Biophys J* 2004;87 (4):2778-86.
- [59] Wang J, Ji L, Lin XS, Ma H. Tracking deforming aortas in two-photon autofluorescence images and its application on quantitative evaluation of aorta-related drugs. *Comput Med Imaging Graph* 2004;28 (1-2):51-9.
- [60] Boulesteix T, Pena AM, Pages N, Godeau G, Sauviat MP, Beaurepaire E, Schanne-Klein MC. Micrometer Scale Ex Vivo Multiphoton Imaging of Unstained Arterial Wall Structure. *Cytometry A* 2005;69:20-6.
- [61] Schenke-Layland K, Xie J, Heydarkhan-Hagvall S, Hamm-Alvarez SF, Stock UA, Brockbank KG, MacLellan WR. Optimized preservation of extracellular matrix in cardiac tissues: implications for long-term graft durability. *Ann Thorac Surg* 2007;83 (5):1641-50.
- [62] Choserot C, Pery E, Goebel JC, Dumas D, Didelon J, Stoltz JF, Blondel WC. Experimental comparison between autofluorescence spectra of constrained fresh and cryopreserved arteries. *Clin Hemorheol Microcirc* 2005;33 (3):235-42.
- [63] Skala MC, Squirrell JM, Vrotsos KM, Eickhoff JC, Gendron-Fitzpatrick A, Eliceiri KW, Ramanujam N. Multiphoton Microscopy of Endogenous Fluorescence Differentiates Normal, Precancerous, and Cancerous Squamous Epithelial Tissues. *Cancer Res* 2005;65 (4):1180-6.
- [64] Kirkpatrick ND, Brewer MA, Utzinger U. Endogenous optical biomarkers of ovarian cancer evaluated with multiphoton microscopy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16 (10):2048-57.
- [65] Provenzano PP, Eliceiri KW, Campbell JM, Inman DR, White JG, Keely PJ. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med* 2006;4 (1):38.
- [66] Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Knittel JG, Yan L, Rueden CT, White JG, Keely PJ. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Med* 2008;6:11.
- [67] Brown E, McKee T, diTomaso E, Pluen A, Seed B, Boucher Y, Jain RK. Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumors in vivo using second-harmonic generation. *Nat Med* 2003;9 (6):796-800.

- [68] Ramanujan S, Pluen A, McKee TD, Brown EB, Boucher Y, Jain RK. Diffusion and convection in collagen gels: implications for transport in the tumor interstitium. *Biophys J* 2002;83 (3):1650-60.
- [69] Kirkpatrick ND, Andreou S, Hoying JB, Utzinger U. Live imaging of collagen remodeling during angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292 (6):H3198-206.
- [70] Tyrrell JA, Mahadevan V, Tong RT, Brown EB, Jain RK, Roysam B. A 2-D/3-D model-based method to quantify the complexity of microvasculature imaged by in vivo multiphoton microscopy. *Microvasc Res* 2005;70 (3):165-78.
- [71] Theer P, Hasan MT, Denk W. Two-photon imaging to a depth of 1000 microm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier. *Opt Lett* 2003;28 (12):1022-4.
- [72] Centonze VE, White JG. Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging. *Biophys J* 1998;75 (4):2015-24.
- [73] Oheim M, Beaurepaire E, Chaigneau E, Mertz J, Charpak S. Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth. *J Neurosci Methods* 2001;111 (1):29-37.
- [74] Chirico G, Olvini F, Beretta S. Fluorescence Excitation Volume in Two-Photon Microscopy by Autocorrelation Spectroscopy and Photon Counting Histogram. *Appl Spec* 2000;54 (7):1084-90.
- [75] Ballou B, Ernst LA, Waggoner AS. Fluorescence imaging of tumors in vivo. *Curr Med Chem* 2005;12 (7):795-805.
- [76] Emptage NJ. Fluorescent imaging in living systems. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1 (5):521-5.
- [77] König K. Multiphoton microscopy in life sciences. *J Microsc* 2000;200 (Pt 2):83-104.
- [78] Masters BR. Confocal microscopy and multi-photon excitation microscopy of human skin in vivo. *Opt Express* 2001;8 (1):2-10.
- [79] Masters BR, So PT. Multi-photon Excitation Microscopy and Confocal Microscopy Imaging of In Vivo Human Skin: A Comparison. *Microscopy and Microanalysis* 1999;5 (4):282-9.
- [80] Masters BR, So PT, Kim KH, Buehler C, Gratton E. Multiphoton excitation microscopy, confocal microscopy, and spectroscopy of living cells and tissues; functional metabolic imaging of human skin in vivo. *Methods Enzymol* 1999;307:513-36.
- [81] Stephens DJ, Allan VJ. Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science* 2003;300 (5616):82-6.
- [82] Cahalan MD, Parker I, Wei SH, Miller MJ. Two-photon tissue imaging: seeing the immune system in a fresh light. *Nat Rev Immunol* 2002;2 (11):872-80.
- [83] Ruthazer ES, Cline HT. Multiphoton Imaging of Neurons in Living Tissue: Acquisition and Analysis of Time-Lapse Morphological Data. *Real-time Imaging* 2002;8:175-88.
- [84] Göppert-Mayer M. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann. Phys.* 1931;9:273-94.
- [85] Deng X, Gan X, Min G. Multiphoton fluorescence microscopic imaging through double-layer turbid tissue media. *J Appl Phys* 2002;91 (7):4659-65.
- [86] Denk W, Strickler JH, Webb WW. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 1990;248 (4951):73-6.
- [87] Diaspro A. Introduction: advanced multiphoton and fluorescence lifetime imaging techniques. *Microsc Res Tech* 2007;70 (5):397.

- [88] Dumas D, Gaborit N, Grossin L, Riquelme B, Gigant-Huselstein C, De Isla N, Gillet P, Netter P, Stoltz JF. Spectral and lifetime fluorescence imaging microscopies: new modalities of multiphoton microscopy applied to tissue or cell engineering. *Biorheology* 2004;41 (3-4):459-67.
- [89] Bestvater F, Spiess E, Stobrawa G, Hacker M, Feurer T, Porwol T, Berchner-Pfannschmidt U, Wotzlaw C, Acker H. Two-photon fluorescence absorption and emission spectra of dyes relevant for cell imaging. *J Microsc* 2002;208 (Pt 2):108-15.
- [90] Tang S, Krasieva TB, Chen Z, Tempea G, Tromberg BJ. Effect of pulse duration on two-photon excited fluorescence and second harmonic generation in nonlinear optical microscopy. *J Biomed Opt* 2006;11 (2):020501.
- [91] Albota M, Beljonne D, Bredas JL, Ehrlich JE, Fu JY, Heikal AA, Hess SE, Kogej T, Levin MD, Marder SR, McCord-Maughon D, Perry JW, Rockel H, Rumi M, Subramaniam G, Webb WW, Wu XL, Xu C. Design of organic molecules with large two-photon absorption cross sections. *Science* 1998;281 (5383):1653-6.
- [92] Mongin O, Porres L, Moreaux L, Mertz J, Blanchard-Desce M. Synthesis and photophysical properties of new conjugated fluorophores designed for two-photon-excited fluorescence. *Org Lett* 2002;4 (5):719-22.
- [93] Xu C, Zipfel W, Shear JB, Williams RM, Webb WW. Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93 (20):10763-8.
- [94] Helmchen F, Denk W. New developments in multiphoton microscopy. *Curr Opin Neurobiol* 2002;12 (5):593-601.
- [95] Kohler RH, Zipfel WR, Webb WW, Hanson MR. The green fluorescent protein as a marker to visualize plant mitochondria in vivo. *Plant J* 1997;11 (3):613-21.
- [96] Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2005;2 (12):905-9.
- [97] Karasawa S, Araki T, Nagai T, Mizuno H, Miyawaki A. Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer. *Biochem J* 2004;381 (Pt 1):307-12.
- [98] Alivisatos AP, Johnsson KP, Peng X, Wilson TE, Loweth CJ, Bruchez MP, Jr., Schultz PG. Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA. *Nature* 1996;382 (6592):609-11.
- [99] Parak WJ, Pellegrino T, Plank C. Labelling of cells with quantum dots. *Nanotechnology R* 2005;16:9-25.
- [100] Kahn E, Menetrier F, Vejux A, Montange T, Dumas D, Riedinger JM, Frouin F, Tourneur Y, Brau F, Stoltz JF, Lizard G. Flow cytometry and spectral imaging multiphoton microscopy analysis of CD36 expression with quantum dots 605 of untreated and 7-ketocholesterol-treated human monocytic cells. *Anal Quant Cytol Histol* 2006;28 (6):316-30.
- [101] Voura EB, Jaiswal JK, Mattoussi H, Simon SM. Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy. *Nat Med* 2004;10 (9):993-8.
- [102] Wu X, Liu H, Liu J, Haley KN, Treadway JA, Larson JP, Ge N, Peale F, Bruchez MP. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol* 2003;21 (1):41-6.
- [103] Eliceiri KW, Fan CH, Lyons GE, White JG. Analysis of histology specimens using lifetime multiphoton microscopy. *J Biomed Opt* 2003;8 (3):376-80.
- [104] Lekadir K, Elson DS, Requejo-Isidro J, Dunsby C, McGinty J, Galletly N, Stamp G, French PM, Yang GZ. Tissue characterization using dimensionality reduction and

- fluorescence imaging. *Med Image Comput Assist Interv Int Conf Med Image Comput Assist Interv* 2006;9 (Pt 2):586-93.
- [105] Ramanujan VK, Zhang JH, Biener E, Herman B. Multiphoton fluorescence lifetime contrast in deep tissue imaging: prospects in redox imaging and disease diagnosis. *J Biomed Opt* 2005;10 (5):051407.
- [106] Bird DK, Yan L, Vrotsos KM, Eliceiri KW, Vaughan EM, Keely PJ, White JG, Ramanujam N. Metabolic mapping of MCF10A human breast cells via multiphoton fluorescence lifetime imaging of the coenzyme NADH. *Cancer Res* 2005;65 (19):8766-73.
- [107] Bloch S, Lesage F, McIntosh L, Gandjbakhche A, Liang K, Achilefu S. Whole-body fluorescence lifetime imaging of a tumor-targeted near-infrared molecular probe in mice. *J Biomed Opt* 2005;10 (5):054003.
- [108] Elson D, Requejo-Isidro J, Munro I, Reavell F, Siegel J, Suhling K, Tadrous P, Benninger R, Lanigan P, McGinty J, Talbot C, Treanor B, Webb S, Sandison A, Wallace A, Davis D, Lever J, Neil M, Phillips D, Stamp G, French P. Time-domain fluorescence lifetime imaging applied to biological tissue. *Photochem Photobiol Sci* 2004;3 (8):795-801.
- [109] Botchway SW, Parker AW, Bisby RH, Crisostomo AG. Real-time cellular uptake of serotonin using fluorescence lifetime imaging with two-photon excitation. *Microsc Res Tech* 2008;71 (4):267-73.
- [110] Douma K, Megens RT, Reitsma S, Prinzen L, Slaaf DW, Van Zandvoort MA. Two-photon lifetime imaging of fluorescent probes in intact blood vessels: a window to sub-cellular structural information and binding status. *Microsc Res Tech* 2007;70 (5):467-75.
- [111] Abulrob A, Brunette E, Slinn J, Baumann E, Stanimirovic D. In vivo time domain optical imaging of renal ischemia-reperfusion injury: discrimination based on fluorescence lifetime. *Mol Imaging* 2007;6 (5):304-14.
- [112] Bohringer HJ, Boller D, Leppert J, Knopp U, Lanckenau E, Reusche E, Huttmann G, Giese A. Time-domain and spectral-domain optical coherence tomography in the analysis of brain tumor tissue. *Lasers Surg Med* 2006;38 (6):588-97.
- [113] Galletly NP, McGinty J, Dunsby C, Teixeira F, Requejo-Isidro J, Munro I, Elson DS, Neil MA, Chu AC, French PM, Stamp GW. Fluorescence lifetime imaging distinguishes basal cell carcinoma from surrounding uninvolved skin. *Br J Dermatol* 2008.
- [114] Kantelhardt SR, Leppert J, Krajewski J, Petkus N, Reusche E, Tronnier VM, Huttmann G, Giese A. Imaging of brain and brain tumor specimens by time-resolved multiphoton excitation microscopy ex vivo. *Neuro Oncol* 2007;9 (2):103-12.
- [115] Leppert J, Krajewski J, Kantelhardt SR, Schlaffer S, Petkus N, Reusche E, Huttmann G, Giese A. Multiphoton excitation of autofluorescence for microscopy of glioma tissue. *Neurosurgery* 2006;58 (4):759-67; discussion -67.
- [116] Li Y, Xu T, Guo H, Yang H. Is phosphorescence lifetime an indicator of angiogenesis in cortical sarcoma? *J Fluoresc* 2007;17 (4):437-43.
- [117] Skala MC, Riching KM, Bird DK, Gendron-Fitzpatrick A, Eickhoff J, Eliceiri KW, Keely PJ, Ramanujam N. In vivo multiphoton fluorescence lifetime imaging of protein-bound and free nicotinamide adenine dinucleotide in normal and precancerous epithelia. *J Biomed Opt* 2007;12 (2):024014.
- [118] Bird DK, Schneider AL, Watkinson AC, Finnin B, Smith TA. Navigating transdermal diffusion with multiphoton fluorescence lifetime imaging. *J Microsc* 2008;230 (Pt 1):61-9.

- [119] Debarre D, Beaufepaire E. Quantitative characterization of biological liquids for third-harmonic generation microscopy. *Biophys J* 2007;92 (2):603-12.
- [120] Debarre D, Pena AM, Supatto W, Boulesteix T, Strupler M, Sauviat MP, Martin JL, Schanne-Klein MC, Beaufepaire E. [Second- and third-harmonic generation microscopies for the structural imaging of intact tissues]. *Med Sci (Paris)* 2006;22 (10):845-50.
- [121] Yelin D, Silberberg Y. Laser scanning third-harmonic-generation microscopy in biology. *Opt Express* 1999;5 (8):169-75.
- [122] Gauderon R, Lukins PB, Sheppard CJ. Simultaneous multichannel nonlinear imaging: combined two-photon excited fluorescence and second-harmonic generation microscopy. *Micron* 2001;32 (7):685-9.
- [123] Gualda EJ, Filippidis G, Voglis G, Mari M, Fotakis C, Tavernarakis N. In vivo imaging of cellular structures in *Caenorhabditis elegans* by combined TPEF, SHG and THG microscopy. *J Microsc* 2008;229 (Pt 1):141-50.
- [124] Moreaux L, Sandre O, Charpak S, Blanchard-Desce M, Mertz J. Coherent scattering in multi-harmonic light microscopy. *Biophys J* 2001;80 (3):1568-74.
- [125] Legare F, Pfeffer C, Olsen BR. The role of backscattering in SHG tissue imaging. *Biophys J* 2007;93 (4):1312-20.
- [126] Han M, Giese G, Bille J. Second harmonic generation imaging of collagen fibrils in cornea and sclera. *Optics Express* 2005;13 (15):5791-7.
- [127] Odin C, Le Grand Y, Renault A, Gailhouse L, Baffet G. Orientation fields of nonlinear biological fibrils by second harmonic generation microscopy. *J Microsc* 2008;229 (Pt 1):32-8.
- [128] Campagnola PJ, Millard AC, Terasaki M, Hoppe PE, Malone CJ, Mohler WA. Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues. *Biophys J* 2002;82 (1 Pt 1):493-508.
- [129] Williams RM, Zipfel WR, Webb WW. Interpreting second-harmonic generation images of collagen I fibrils. *Biophys J* 2005;88 (2):1377-86.
- [130] Sun Y, Chen WL, Lin SJ, Jee SH, Chen YF, Lin LC, So PT, Dong CY. Investigating mechanisms of collagen thermal denaturation by high resolution second-harmonic generation imaging. *Biophys J* 2006;91 (7):2620-5.
- [131] Cox G, Kable E, Jones A, Fraser I, Manconi F, Gorrell MD. 3-dimensional imaging of collagen using second harmonic generation. *J Struct Biol* 2003;141 (1):53-62.
- [132] Cox G, Xu P, Sheppard CJ, Ramshawc J. Characterization of the Second Harmonic Signal from Collagen. *Proceedings - Society of Photo-Optical Instrumentation Engineer*. San Jose: SPIE, 2003. pp. 32-40.
- [133] Kim BM, Eichler J, Reiser KM, Rubenchik AM, Da Silva LB. Collagen structure and nonlinear susceptibility: effects of heat, glycation, and enzymatic cleavage on second harmonic signal intensity. *Lasers Surg Med* 2000;27 (4):329-35.
- [134] Cameron GJ, Alberts IL, Laing JH, Wess TJ. Structure of type I and type III heterotypic collagen fibrils: an X-ray diffraction study. *J Struct Biol* 2002;137 (1-2):15-22.
- [135] Stoner P, Kim BM, Rubenchik AM, Reiser KM, Da Silva LB. Measurement of the Second Order Non-1 linear Susceptibility of Collagen using Polarization Modulation and Phase- sensitive Detection. *Society of Photo optical Instrumentation Engineers*, San Jose, CA January, 20-26, 2001.
- [136] Zoumi A, Yeh A, Tromberg BJ. Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99 (17):11014-9.

- [137] Yeh AT, Choi B, Nelson JS, Tromberg BJ. Reversible dissociation of collagen in tissues. *J Invest Dermatol* 2003;121 (6):1332-5.
- [138] Pena AM, Boulesteix T, Dartigalongue T, Schanne-Klein MC. Chiroptical effects in the second harmonic signal of collagens I and IV. *J Am Chem Soc* 2005;127 (29):10314-22.
- [139] Zipfel WR, Williams RM, Christie R, Nikitin AY, Hyman BT, Webb WW. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100 (12):7075-80.
- [140] Zipfel WR, Williams RM, Webb WW. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol* 2003;21 (11):1369-77.
- [141] Werkmeister E, Kerdjoudj H, Marchal L, Stoltz JF, Dumas D. Multiphoton microscopy for blood vessel imaging: new non-invasive tools (Spectral, SHG, FLIM). *Clin Hemorheol Microcirc* 2007;37 (1-2):77-88.
- [142] Plotnikov SV, Millard AC, Campagnola PJ, Mohler WA. Characterization of the myosin-based source for second-harmonic generation from muscle sarcomeres. *Biophys J* 2006;90 (2):693-703.
- [143] Theodossiou TA, Thrasivoulou C, Ekwobi C, Becker DL. Second harmonic generation confocal microscopy of collagen type I from rat tendon cryosections. *Biophys J* 2006;91 (12):4665-77.
- [144] So PT, Kim H. Two-photon deep tissue ex vivo imaging of mouse dermal and subcutaneous structures. *Opt Express* 1998;3 (9):339-50.
- [145] Zhuo S, Chen J, Luo T, Chen H, JJ. Z. High-Contrast Multimodel Nonlinear Optical Imaging of Collagen and Elastin. *Journal of Physics: Conference Series* 2006;48:1476-81.
- [146] Brown DJ, Morishige N, Neekhra A, Minckler DS, Jester JV. Application of second harmonic imaging microscopy to assess structural changes in optic nerve head structure ex vivo. *J Biomed Opt* 2007;12 (2):024029.
- [147] Morishige N, Wahlert AJ, Kenney MC, Brown DJ, Kawamoto K, Chikama T, Nishida T, Jester JV. Second-harmonic imaging microscopy of normal human and keratoconus cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48 (3):1087-94.
- [148] Tan HY, Sun Y, Lo W, Teng SW, Wu RJ, Jee SH, Lin WC, Hsiao CH, Lin HC, Chen YF, Ma DH, Huang SC, Lin SJ, Dong CY. Multiphoton fluorescence and second harmonic generation microscopy for imaging infectious keratitis. *J Biomed Opt* 2007;12 (2):024013.
- [149] Teng SW, Tan HY, Peng JL, Lin HH, Kim KH, Lo W, Sun Y, Lin WC, Lin SJ, Jee SH, So PT, Dong CY. Multiphoton autofluorescence and second-harmonic generation imaging of the ex vivo porcine eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47 (3):1216-24.
- [150] Teng SW, Tan HY, Sun Y, Lin SJ, Lo W, Hsueh CM, Hsiao CH, Lin WC, Huang SC, Dong CY. Multiphoton fluorescence and second-harmonic-generation microscopy for imaging structural alterations in corneal scar tissue in penetrating full-thickness wound. *Arch Ophthalmol* 2007;125 (7):977-8.
- [151] Schenke-Layland K, Xie J, Angelis E, Starcher B, Wu K, Riemann I, Maclellan WR, Hamm-Alvarez SF. Increased degradation of extracellular matrix structures of lacrimal glands implicated in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *Matrix Biol* 2008;27 (1):53-66.
- [152] Chen J, Zhuo S, Luo T, Jiang X, Zhao J. Spectral characteristics of autofluorescence and second harmonic generation from ex vivo human skin induced by femtosecond laser and visible lasers. *Scanning* 2006;28 (6):319-26.

- [153] Lin MG, Yang TL, Chiang CT, Kao HC, Lee JN, Lo W, Jee SH, Chen YF, Dong CY, Lin SJ. Evaluation of dermal thermal damage by multiphoton autofluorescence and second-harmonic-generation microscopy. *J Biomed Opt* 2006;11 (6):064006.
- [154] Chen MH, Chen WL, Sun Y, Fwu PT, Dong CY. Multiphoton autofluorescence and second-harmonic generation imaging of the tooth. *J Biomed Opt* 2007;12 (6):064018.
- [155] Megens RT, Reitsma S, Schiffers PH, Hilgers RH, De Mey JG, Slaaf DW, oude Egbrink MG, van Zandvoort MA. Two-photon microscopy of vital murine elastic and muscular arteries. Combined structural and functional imaging with subcellular resolution. *J Vasc Res* 2007;44 (2):87-98.
- [156] Schenke-Layland K, Riemann I, Opitz F, Konig K, Halbhuber KJ, Stock UA. Comparative study of cellular and extracellular matrix composition of native and tissue engineered heart valves. *Matrix Biol* 2004;23 (2):113-25.
- [157] Lilledahl MB, Haugen OA, de Lange Davies C, Svaasand LO. Characterization of vulnerable plaques by multiphoton microscopy. *J Biomed Opt* 2007;12 (4):044005.
- [158] Nadiarnykh O, Plotnikov S, Mohler WA, Kalajzic I, Redford-Badwal D, Campagnola PJ. Second harmonic generation imaging microscopy studies of osteogenesis imperfecta. *J Biomed Opt* 2007;12 (5):051805.
- [159] Reiser KM, Bratton C, Yankelevich DR, Knoesen A, Rocha-Mendoza I, Lotz J. Quantitative analysis of structural disorder in intervertebral disks using second harmonic generation imaging: comparison with morphometric analysis. *J Biomed Opt* 2007;12 (6):064019.
- [160] Han H, Burke R, Zettel M, Tang P, Brown E. Second harmonic properties of tumor collagen : determining the structural relationship between reactive stroma and healthy stroma. *Optics Express* 2008;16 (3):1846-59.
- [161] Hernest M, Pena AM, Strupler M, Beaurepaire E, Martin JL, Schanne-Klein MC, Tharoux PL. [New approach of fibrosis by multiphoton microscopy with second harmonic generation]. *Med Sci (Paris)* 2006;22 (10):820-1.
- [162] Strupler M, Pena A, Hernest M. Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues. *Optics Express* 2007;15 (7):4054-65.
- [163] Pena AM, Fabre A, Debarre D, Marchal-Somme J, Crestani B, Martin JL, Beaurepaire E, Schanne-Klein MC. Three-dimensional investigation and scoring of extracellular matrix remodeling during lung fibrosis using multiphoton microscopy. *Microsc Res Tech* 2007;70 (2):162-70.
- [164] Gauderon R, Lukins PB, Sheppard CJ. Optimization of second-harmonic generation microscopy. *Micron* 2001;32 (7):691-700.
- [165] Deng X, Wang X, Liu H, Zhuang Z, Guo Z. Simulation study of second-harmonic microscopic imaging signals through tissue-like turbid media. *J Biomed Opt* 2006;11 (2):024013.
- [166] Plotnikov S, Juneja V, Isaacson AB, Mohler WA, Campagnola PJ. Optical clearing for improved contrast in second harmonic generation imaging of skeletal muscle. *Biophys J* 2006;90 (1):328-39.
- [167] Raub CB, Suresh V, Krasieva T, Lyubovitsky J, Mih JD, Putnam AJ, Tromberg BJ, George SC. Noninvasive assessment of collagen gel microstructure and mechanics using multiphoton microscopy. *Biophys J* 2007;92 (6):2212-22.
- [168] Raub CB, Unruh J, Suresh V, Krasieva T, Lindmo T, Gratton E, Tromberg BJ, George SC. Image correlation spectroscopy of multiphoton images correlates with collagen mechanical properties. *Biophys J* 2008;94 (6):2361-73.
- [169] Liau Y, Untereiner A, Arnet D, Sherer N. Femtosecond-pulse Cavity-dumped solid-state oscillatir design and application to ultrafast microscopy. *Applied Optics* 1999;38 (36):7386-92.

- [170] Eggeling C, Brand L, Seidel CAM. Laser-induced fluorescence of coumarin derivatives in aqueous solution : Photochemical aspects for single molecule detection. *Bioimaging* 1997;5:105-15.
- [171] Niesner R, Roth W, Gericke KH. Photophysical aspects of single-molecule detection by two-photon excitation with consideration of sequential pulsed illumination. *Chemphyschem* 2004;5 (5):678-87.
- [172] Gibbs P, Turnbull LW. Textural analysis of contrast-enhanced MR images of the breast. *Magn Reson Med* 2003;50 (1):92-8.
- [173] Herlidou S, Grebe R, Grados F, Leuyer N, Fardellone P, Meyer ME. Influence of age and osteoporosis on calcaneus trabecular bone structure: a preliminary in vivo MRI study by quantitative texture analysis. *Magn Reson Imaging* 2004;22 (2):237-43.
- [174] Huisman A, Ploeger LS, Dullens HF, Jonges TN, Belien JA, Meijer GA, Poulin N, Grizzle WE, van Diest PJ. Discrimination between benign and malignant prostate tissue using chromatin texture analysis in 3-D by confocal laser scanning microscopy. *Prostate* 2007;67 (3):248-54.
- [175] Huisman A, Ploeger LS, Dullens HF, Poulin N, Grizzle WE, van Diest PJ. Development of 3D chromatin texture analysis using confocal laser scanning microscopy. *Cell Oncol* 2005;27 (5-6):335-45.
- [176] Haralick R, Shanmugam K, Dinstein I. Textural Features for Image Classification. *IEEE Transactions on systems, man, and cybernetics* 1973;3 (6):610-8.
- [177] Marcu L, Grundfest WS, Maarek JM. Photobleaching of arterial fluorescent compounds: characterization of elastin, collagen and cholesterol time-resolved spectra during prolonged ultraviolet irradiation. *Photochem Photobiol* 1999;69 (6):713-21.
- [178] Mertz J, Moreaux L. Second-harmonic generation by focused excitation of inhomogeneously distributed scatterers *Optics Communications* 2001;196 (1):325-30.
- [179] Mansfield J, Winlove P, Knapp K, Matcher S. Imaging articular cartilage using second harmonic generation microscopy. *Progress in biomedical optics and imaging* 2006;7 (12):1-8.
- [180] Youn I, Choi JB, Cao L, Setton LA, Guilak F. Zonal variations in the three-dimensional morphology of the chondron measured in situ using confocal microscopy. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14 (9):889-97.
- [181] Woolley D, Glanville R, Evanson J, Linderg A. Action of Rheumatoid Synovial Collagenase on Cartilage Collagen. *European Journal of Biochemistry* 1975;50 (2):437-44.
- [182] Brockbank KG, Maclellan WR, Xie J, Hamm-Alvarez SF, Chen ZZ, Schenke-Layland K. Quantitative second harmonic generation imaging of cartilage damage. *Cell Tissue Bank* 2008.
- [183] Dubertret B, Skourides P, Norris DJ, Noireaux V, Brivanlou AH, Libchaber A. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science* 2002;298 (5599):1759-62.
- [184] Boura C, Kerdjoudj H, Moby V, Vautier D, Dumas D, Schaaf P, Voegel JC, Stoltz JF, Menu P. Initial adhesion of endothelial cells on polyelectrolyte multilayer films. *Biomed Mater Eng* 2006;16 (4 Suppl):S115-21.
- [185] Boura C, Muller S, Vautier D, Dumas D, Schaaf P, Claude Voegel J, Francois Stoltz J, Menu P. Endothelial cell--interactions with polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials* 2005;26 (22):4568-75.
- [186] Kerdjoudj H, Boura C, Marchal L, Dumas D, Schaff P, Voegel JC, Stoltz JF, Menu P. Decellularized umbilical artery treated with thin polyelectrolyte multilayer films: potential use in vascular engineering. *Biomed Mater Eng* 2006;16 (4 Suppl):S123-9.

- [187] Arribas SM, Hinek A, Gonzalez MC. Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacol Ther* 2006;111 (3):771-91.
- [188] Briones AM, Xavier FE, Arribas SM, Gonzalez MC, Rossoni LV, Alonso MJ, Salaices M. Alterations in structure and mechanics of resistance arteries from ouabain-induced hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291 (1):H193-201.
- [189] Gonzalez JM, Briones AM, Starcher B, Conde MV, Somoza B, Daly C, Vila E, McGrath I, Gonzalez MC, Arribas SM. Influence of elastin on rat small artery mechanical properties. *Exp Physiol* 2005;90 (4):463-8.
- [190] McGrath JC, Deighan C, Briones AM, Shafaroudi MM, McBride M, Adler J, Arribas SM, Vila E, Daly CJ. New aspects of vascular remodelling: the involvement of all vascular cell types. *Exp Physiol* 2005;90 (4):469-75.

Annexe A : Comparaison des techniques d'imagerie médicale – Partie I



Table of comparison of medical imaging techniques.
Part I: Commonly used radiological imaging modalities

	Conventional X-ray	X-ray Computed Tomography (CT)	Radioisotope Imaging (Nuclear Medicine)	Magnetic Resonance Imaging (MRI)	Ultrasound Imaging (1 to 10 MHz)	Positron Emission Tomography (PET)
Projection/Tomography	Projection	Tomography	Both	Tomography	Tomography	Tomography
Mainly Anatomical / Functional	Anatomical	Anatomical	Functional	Both	Both	Functional
Interventional options?	Yes	No	No	Possible	Yes	No
Maximum imaging depth in soft tissue	Metres	Metres	Body thickness	Body thickness	Body thickness	Body thickness
Spatial resolution in plane of imaging (typical)	0.1 mm	0.25 mm	5 to 10 mm	0.5 mm	0.5 mm	5 to 10 mm
Slice thickness (typical)	n/a	1 to 5 mm	n/a or 5 to 10 mm	3 to 10 mm	1 mm	10 mm
Safety	Ionising radiation leads to a radiation dose	Ionising radiation leads to a higher radiation dose than for conventional x-rays	Ionising radiation leads to a moderately higher radiation dose than for conventional x-rays	A range of hazards arising from strong and time varying electromagnetic fields.	Thermal effects and cavitation	Ionising radiation leads to a moderately higher radiation dose than for conventional x-rays
Examination time	Short	Medium	Long	Long	Medium	Long
Physical property of tissue associated with image formation	Linear attenuation coefficient	Linear attenuation coefficient	Tracer isotope is involved in metabolic process; measure concentration	Proton density and nuclear magnetic resonance relaxation times.	Primarily acoustic impedance: differences lead to reflections at boundaries	Tracer isotope is involved in metabolic process; measure concentration
Relative capital cost*	Low	Fairly high	Fairly high	High	Medium	High
Relative cost per patient study*	Low	Medium	Medium to high	High	Low	High
Comments	Interventional studies such as cardiac catheterisation take longer and are costlier than radiographic studies	May be called CAT (Computerized axial tomography). Current interest in multi-detector CT.	Some gamma camera systems also have PET capability, but these have lower sensitivity than dedicated PET systems	Open systems or special facility needed for intra-operative use. Tailored sequences used for functional measures.	Blocked by bone. The Doppler effect is used for measuring the velocity of blood flow	A cyclotron is used to produce special isotopes; this must be located close by. Current interest in combined CT/PET systems and PET/MR

* Indicative only; medical imaging costs depend strongly upon the healthcare environment and method of economic analysis

This is the January 2006 download from www.voxelera.co.uk. © 2006 by Elizabeth Berry Ltd
 E&OE. This information is provided as an introductory guide. It is for educational or informational use only, and is not to be used for patient care.
 Part II of the table includes less commonly used modalities, those offering higher spatial resolution and those in the early stages of development.

Annexe B : Comparaison des techniques d'imagerie médicale – Partie II



Table of comparison of medical imaging techniques.

Part II: Less commonly used *in vivo* imaging modalities.(These have higher spatial resolution than those in Part I, and may be in the early stages of development for *in vivo* use)

	High frequency ultrasound	Fluorescence microscopy	Optical coherence tomography	<i>In vivo</i> confocal microscopy	Spectrophotometric intracutaneous analysis	Diffuse optical tomography	Terahertz pulsed imaging	High resolution MRI
Projection/Tomography	Tomography	Projection	Tomography	Tomography	Projection	Tomography	Both	Tomography
Mainly Anatomical / Functional	Anatomical	Functional	Anatomical	Anatomical	Both	Functional	Both	Anatomical
Maximum imaging depth in soft tissue	4 mm	0.5 mm	2 to 3 mm	400 μ m	2 mm	15 cm	Few mm	cm
Spatial resolution in plane of imaging (typical)	20 μ m	1 μ m	10 μ m	2 to 5 μ m	Up to 10 μ m	1 to 3 mm	350 μ m	100 μ m
Depth resolution (typical)	9 μ m	n/a	5 to 15 μ m	0.5 μ m	n/a	1 to 3 mm	40 μ m	100 μ m
Safety	Thermal effects and cavitations	May involve administration of fluorophores.	Consult special guidelines regarding use in eye	Consult special guidelines regarding use in eye		Thermal effects	Thermal effects	Hazards from strong and time varying electromagnetic fields
Physical property of tissue associated with image formation	Primarily acoustic impedance: differences lead to reflections at boundaries	Decay time of fluorescence induced by laser light, plus spectrum and intensity, give molecular environment	Refractive index. Interferometric techniques used to infer time of flight	Uses reflected light or fluorescence	Effect of the skin's chromophores (haemoglobin, melanin, collagen, dermal melanin)	Refractive index and scattering, chromophore content and absorption	Complex refractive index affecting pulses of radiation.	Proton density and nuclear magnetic resonance relaxation times
Comments	20-200 MHz. High frequency Doppler under development	e.g. FLIM – Fluorescence Lifetime Imaging. Visible light.	OCT. Can be used endoscopically. Visible light.	Accessible tissue surfaces, planes parallel to surface. Visible light.	SIAscopy – analytical version of dermatoscopy or ELM. Visible light & NIR.	Monitor tissue and blood oxygenation levels. Near infrared (NIR).	Also spectroscopy. mm-wave imaging is a passive technique at similar frequency.	Using special small coils in a 1.5-3T whole body scanner.

Note. We might also have included spectroscopic methods such as Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy and Raman spectroscopy, which were originally non-imaging laboratory tools. They are now being applied *in vivo* and with data mapping to generate images.

This is the May 2006 download from www.voxelera.co.uk. © 2006 by Elizabeth Berry Ltd

E&OE. This information is provided as an introductory guide. It is for educational or informational use only, and is not to be used for patient care.

Part I of the table includes the more commonly used radiological imaging modalities. It was the January 2006 download from www.voxelera.co.uk.

Liste des Travaux et Publications

a- Publications dans des revues internationales :

E Werkmeister, H Kerdjoudj, L Marchal, JF Stoltz, D Dumas. Multiphoton microscopy for blood vessel imaging: new non-invasive tools (Spectral, SHG, FLIM). *Clinical Hemorheology and microcirculation* (2007) 37:77–88.

E Werkmeister, N de Isla, L Marchal, JF Stoltz, D Dumas. Interest of Second Harmonic Generation Imaging for diagnosis in thick and opaque tissue. *Biorheology*. IOS Press.

D Dumas, E Werkmeister, L Marchal, JF Stoltz. New fluorescence molecular tools of bio-imaging to monitor membrane potential in multiphoton mode. *Actas de Bioquímica* (2006) 7:73-79.

E Werkmeister, N de Isla, L Marchal, D Mainard, JF Stoltz, D Dumas
Interest of second harmonic generation imaging to study collageneous matrix modification in osteoarthritis disease.
Proceedings – Society of Photo-Optical Instrumentation Engineer (SPIE) (2008). Strasbourg, France. 6995-20

MA d'Hallewin, D Kochetkov, Y Viry-Babel, E Werkmeister, D Dumas, S Gräfe, V Zorin, F Guillemin, L Bezdetnaya
Photodynamic Therapy with intratumoral administration of lipid-based mTHPC in a model of breast cancer recurrence.
Laser Surgery and Medicine (2008). IOS Press

b- Publications dans des ouvrages scientifiques et des comptes rendus de congrès :

D Dumas, E Werkmeister, B Riquelme, A Kadi, JF Stoltz. New modality of Imaging using Multi-photon fluorescence Microscopy to study molecular events applied to vascular tissue. 4th International Symposium on "Cardiovascular Biology" - First Meeting "Endothelial cell in Health and Hypertension". June 30th – July 1st, 2006. Praha, Czech Republic

c- Communications Orales Internationales :

11^{ème} congrès annuel de l'AFC Association Française de Cytométrie (collaboration de l'Association Belge de Cytométrie). 18-20 Octobre 2006. Oud Sint-Jan de Bruges, Belgique.
Imagerie multimodale appliquée à l'étude de la vascularisation tumorale et la diffusion de photosensibilisant en PDT.

E Werkmeister, L Marchal, Y Viry-Babel, JF Stoltz, L Bolotine, D Dumas

7^{ème} colloque international francophone SFO CMOI. 20-24 Novembre 2006. Mulhouse, France.

Concentration temporelle des énergies impulsionnelles en microscopie multiphotonique : intérêt d'un EOM ou Cavity Dumper en biologie.

E Werkmeister, C Spriet, L Marchal, L Hélot, JF Stoltz, D Dumas

Focus On Microscopy 2007. April 12-14, 2007. Valencia, Spain.

Two-photon microscopy in thick tissue: Absorption efficiency and penetration depth dependent on excitation parameters.

E Werkmeister, C Spriet, L Marchal, L Héliot, JF Stoltz, D Dumas

4^{ème} Colloque International en Bioingénierie et Biothérapies. 3^{ème} réunion scientifique du Pôle Lorrain d'Ingénierie du cartilage. 26-28 Septembre 2007. Faculté de Médecine de Nancy, France.

Interest of Multimodal Imaging in Tissue Engineering.

E Werkmeister, D Dumas, N de Isla, L Marchal, JF Stoltz

8^{ème} colloque international francophone. Méthodes et Techniques Optiques pour l'Industrie. 7^{ème} colloque international francophone. Club CMOI. 19-23 Novembre 2007. Arcachon, France.

Etude de l'arrangement des fibres de collagène au sein de la matrice extracellulaire du cartilage soumis à des contraintes mécaniques et/ou biochimiques: analyse texturale d'images SHG.

E Werkmeister, N de Isla, L Marchal, D Mainard, JF Stoltz, D Dumas

SPIE Photonics Europe. April 7-10, 2008. Strasbourg, France.

Interest of Second Harmonic Generation imaging to study collageneous matrix modification in osteoarthritis disease.

E Werkmeister, N de Isla, L Marchal, D Mainard, JF Stoltz, D Dumas.

16th Mediterranean Conference on Control and Automation. June 25-27, 2008. Ajaccio, Corsica, France.

Cartilage Tissue Engineering and Multimodality in Two-photon Microscopy.

D Dumas, E Werkmeister, JF Stoltz

d- Communications Orales Nationales :

Réunion du PTIBC (PLATEAU TECHNIQUE D'IMAGERIE ET DE BIOPHYSIQUE CELLULAIRE). 24 Novembre 2006. Vandoeuvre-les-Nancy, France.

Les contraintes en Imagerie Tissulaire et Imagerie par Génération de Seconde Harmonique (SHG).

E Werkmeister

e- Affiches :

3^{ème} Colloque international en "Ingénierie Médicale et Therapie". 15-16 Mai 2006. Vandoeuvre-les-Nancy, France.

Spectral, FLIM, SHG : Useful tools applied to blood vessels in multiphoton microscopy.

E Werkmeister, L Marchal, JF Stoltz, D Dumas

4th International Symposium on "Cardiovascular Biology" - First Meeting "Endothelial cell in Health and Hypertension". June 30th – July 1st, 2006. Praha, Czech Republic.

Bioimaging of blood vessels :MPE, Spectral, FLIM, SHG mode.

E Werkmeister, L Marchal, JF Stoltz, D Dumas

Ecole Thématique Inter-disciplinaire "Microscopie Fonctionnelle en Biologie 2006". 21-26 Septembre 2006. La Grande Motte, France.

Imagerie tissulaire en excitation pulsée : Mode Spectral et FLIM.

E Werkmeister, L Marchal, JF Stoltz, D Dumas

7^{ème} colloque international francophone SFO CMOI. 20-24 Novembre 2006. Mulhouse, France.

Concentration temporelle des énergies impulsionsnelles en microscopie multiphotonique : intérêt d'un EOM ou Cavity Dumper en biologie.

E Werkmeister, C Spriet, L Marchal, L Héliot, JF Stoltz, D Dumas

11^{ème} congrès annuel de l'AFC Association Française de Cytométrie (collaboration de l'Association Belge de Cytométrie). 18-20 Octobre 2006. Oud Sint-Jan de Bruges, Belgique.

Imagerie multimodale appliquée à l'étude de la vascularisation tumorale et la diffusion de photosensibilisant en PDT.

E Werkmeister, L Marchal, Y Viry-Babel, JF Stoltz, L Bolotine, D Dumas

Focus On Microscopy 2007. April 12-14, 2007. Valencia, Spain.

Interest of SHG imaging for diagnosis in thick and opaque tissue.

E Werkmeister, N De Isla, H Kerdjoudj, JF Stoltz, D Dumas

5th International Symposium "Mechanobiology of cartilage and chondrocyte". May 11-12, 2007. Athens, Greece.

Interest of second harmonic generation imaging for diagnosis in thick and opaque tissue.

E Werkmeister, N De Isla, H Kerdjoudj, JF Stoltz, D Dumas

1^{er} Forum du Cancéropôle du Grand-Est. 19 Octobre 2007. Vittel, France.

Imagerie multimodale appliquée à l'étude de la vascularisation tumorale et la diffusion de photosensibilisant en PDT.

E Werkmeister, L Marchal, Y Viry-Babel, JF Stoltz, L Bolotine, D Dumas

Regenerative Medicine: Advancing to Next Generation Therapies. March 12-15, 2008. Hilton Head, South Carolina.

Interest of SHG to study extracellular matrix modification in cartilage.

E Werkmeister, D Dumas, N de Isla, L Marchal, D Mainard, JF Stoltz

ISACB 11th Biennial Meeting. September 17-20, 2008. Bordeaux, France.

Interest of Multiphoton and Second Harmonic Generation for blood vessel imaging.

E Werkmeister, H Kerdjoudj, JF Stoltz, D Dumas

OARSI World Congress on Osteoarthritis. September 18-21, 2008. Rome, Italy.

Second Harmonic Generation imaging and collageneous matrix modification in osteoarthritis disease.

E Werkmeister, N de Isla, D Bensoussan, D Mainard, JF Stoltz, D Dumas