

Imagerie du collagène par microscopie multiphotonique.

Mathias Strupler

▶ **To cite this version:**

Mathias Strupler. Imagerie du collagène par microscopie multiphotonique.. Physique [physics]. Ecole Polytechnique X, 2008. Français. NNT : . pastel-00004540

HAL Id: pastel-00004540
https://pastel.hal.science/pastel-00004540

Submitted on 21 Jul 2010

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

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

Thèse de Doctorat de l'Ecole Polytechnique

Spécialité : Physique

Présentée par

Mathias STRUPLER

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Ecole Polytechnique

Imagerie du collagène par microscopie multiphotonique Application aux fibroses rénales

Soutenue publiquement le 27 novembre 2008 devant le jury composé de :

Antonello DE MARTINO	Président du jury
François AMBLARD	Rapporteur
Francesco PAVONE	Rapporteur
Patrick BRUNEVAL	Examinateur
Pierre-Louis THARAUX	Examinateur
Marie-Claire SCHANNE-KLEIN	Directrice de thèse

Table des matières

Remerciements **7**

Préambule **9**

1 Collagène et Fibrose **11**

1.1 Le Collagène 11

1.1.1 chaîne α 13

1.1.2 Synthèse 15

1.1.3 Assemblage 15

1.1.4 Dégradation du collagène 19

1.1.5 Régulation de la production du collagène 19

1.2 La transglutaminase 2 20

1.3 La fibrose 22

2 Techniques d'imagerie **25**

2.1 Techniques d'imagerie conventionnelles du collagène 25

2.1.1 Colorations histologiques 25

2.1.2 Microscopie de Fluorescence 28

2.1.3 Microscopie en lumière réfléchie 30

2.1.4 Microscopie électronique 31

2.1.5 Microscopie à force atomique 31

2.1.6 Diffraction de rayons-X 31

2.2 Microscopie multiphoton 32

2.2.1 Fluorescence sous excitation à deux photons 32

2.2.2 Génération de second harmonique 40

2.2.3 Montage expérimental . . . 43
2.2.4 Détectivité des canaux SHG et 2PEF . . . 49
2.2.5 Détectivité du canal spectral . . . 50
2.3 Signal de second harmonique du collagène . . . 52
2.3.1 Type de collagène et signal SHG . . . 53
2.3.2 Modèlisation de la génération de second harmonique du collagène . . . 55
2.3.3 Propriété du signal SHG et structure du collagène . . . 59
2.4 Comparaison entre les différentes méthodes . . . 74
2.4.1 Source du signal . . . 74
2.4.2 Sensibilité des différentes techniques . . . 75
2.4.3 Visualisation 3D . . . 77
2.4.4 Multimodalité . . . 77
2.4.5 Reproductibilité . . . 78
2.5 Conclusion . . . 78

3 Quantification des fibroses rénales **81**
3.1 Introduction . . . 81
3.1.1 Le rein . . . 81
3.1.2 La fibrose rénale . . . 88
3.1.3 Sources de contraste dans le rein . . . 90
3.2 Méthodologie . . . 95
3.2.1 Protocoles et méthodes : microscopie multiphoton . . . 95
3.2.2 Protocoles et méthodes : mesures conventionnelles . . . 105
3.2.3 Statistiques . . . 107
3.3 Validation de la méthode . . . 108
3.3.1 Modèle de fibrose : Angiotensine II . . . 108
3.3.2 Résultats . . . 109
3.3.3 Discussion . . . 119
3.3.4 Conclusion . . . 122
3.4 Conclusion . . . 124

4 Résultats Biologiques **125**
4.1 Rôle de la TG2 dans la fibrose rénale . . . 125

4.1.1 Principe de l'étude . . . 125
4.1.2 Résultats . . . 127
4.1.3 Conclusion . . . 133
4.2 rôle de la TG2 . . . 134
4.2.1 Présence de la tranglutaminase 2 . . . 134
4.2.2 Activité de la tranglutaminase 2 . . . 136
4.2.3 Conclusion . . . 139
4.3 Autres modèles de fibrose . . . 139
4.3.1 Modèle UUO . . . 140
4.3.2 Modèle de glomérulonéphrite rapidement progressive extracapillaire à croissant . . . 143
4.3.3 Etude préliminaire sur la possibilité de quantifier la fibrose *in vivo* . . . 145
4.3.4 Conclusion . . . 148
4.4 Biopsies de rein humain . . . 149
4.4.1 Principe . . . 149
4.4.2 Methodes . . . 150
4.4.3 Résultats et Discussion . . . 152
4.4.4 Conclusion . . . 158
4.5 Conclusion . . . 159
4.5.1 Pertinence de la microscopie SHG pour des études biomédicales . . . 159
4.5.2 Apports de la microscopie SHG sur la compréhension des mécanismes de la fibrose rénale . . . 160
4.5.3 Applications à l'Homme . . . 161

Conclusion **163**

5 Annexes **167**
5.1 Analyse statistique des scores de fibrose interstitielle au trichrome de Masson . 167
5.2 Profondeur de pénétration dans le rein . . . 168

Remerciements

Avant toute chose, je souhaite remercier les membres de mon jury, Antonello de Martino, François Amblard, Francesco Pavone, Patrick Bruneval et Pierre-Louis Tharaux, d'avoir étudié et évalué en détail mon travail de thèse.

Je tiens à remercier Jean-Louis Martin de m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour ses remarques toujours pertinentes. Merci à tous les membres du laboratoire, en particulier aux membres de l'équipe de microscopie, qui font de ces locaux un peu tristes un endroit chaleureux où l'on peut toujours trouver des personnes prêtes à répondre à ses interrogations.

Toute ma reconnaissance à la région Île-de-France qui m'a financé durant ces trois années.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le concours de nos collaborateurs du Centre de Recherche Cardiovasculaire Inserm-Lariboisière. Tout d'abord, Monica Hernest pour ton apport scientifique à cette thèse, pour ta gentillesse et surtout merci de t'être occupé des souris ; cela m'a évité bien des points de suture. Je suis aussi l'obligé de Pierre-Louis Tharaux qui m'aura beaucoup appris sur le rein, la fibrose et la façon de penser des médecins. Enfin Cécile Fligny pour avoir repris le flambeau de Monica et l'avoir emporté dans des terres irradiées.

Je remercie également Eric Thervet et Aude Servais du service de néphrologie de l'hôpital Necker ainsi que Jean-Christophe Olivo-Marin et Vannary Meas-Yeddid du Laboratoire d'Analyse d'Images Quantitative de l'Institut Pasteur. Notre collaboration m'a fait entrevoir toute la difficulté de l'application de notre technique à l'Homme.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance à Marie-Claire Schanne-Klein pour m'avoir

encadré durant ces 3 années de thèse. Ce travail ne serait rien sans ton aide, tes conseils et ton savoir, sache que tu m'auras marqué. Et merci d'avoir supporté et corrigé toutes mes fautes d'orthographe.

Merci à Ana-Maria qui m'aura initié au maniement du microscope et je souhaite bon courage à ceux qui me suivront : Ariane et Yannick.

À mes compagnons de galère : Thomas, Silvan, Paul, Caroline, Byung-kuk, Nicolas, Ariane, Liêm, Guillaume, Antoine, Edward, Andreaa, Latifa

À la Shaï'team grande pourvoyeuse de soirées

À Jean-Baptiste pour toutes nos discussions hors de l'espace et du temps

À Didier qui aura gangréné mon esprit et enfumé mes poumons

Au couple déconcertant Katya et Sacha

À mes amis Mariette, Raphaël et Matthieu

Aux souris mortes pour la science

À ma famille

Préambule

Le développement de nouveaux outils et de nouvelles techniques pour la biologie et la médecine a toujours été un moteur pour la recherche en microscopie. Les premiers microscopes permirent à Antoine Von Leeuwenhoek en 1677 de découvrir les bactéries, les spermatozoïdes et les globules rouges et aujourd'hui nous cherchons à visualiser les processus intracellulaires, l'interaction des protéines, l'interaction des cellules dans les tissus... Chaque année de nouvelles techniques apparaissent pour voir plus petit, plus spécifique, plus physiologique.

Le laboratoire d'optique et biosciences dans lequel j'ai effectué ma thèse s'intéresse plus particulièrement aux techniques de microscopie multiphoton. Ce type de microscopie, qui repose sur les interactions non linéaires entre la matière et la lumière, est principalement utilisé aujourd'hui pour suivre des marqueurs fluorescents dans les tissus grâce au processus de fluorescence sous excitation à deux photons. En cela, elle sert à suppléer la microscopie confocale pour visualiser des phénomènes à des profondeurs de pénétration qui lui sont inaccessibles, et permet ainsi de travailler sur l'ensemble d'un tissu. Toutefois, la microscopie multiphoton ne se borne pas à la fluorescence sous excitation à 2 photons ; elle donne aussi accès à des processus non linéaires comme la génération d'harmoniques ou l'émission Raman anti-Stockes stimulée. Ces interactions non linéaires sont encore peu utilisées en biologie et font l'objet de recherches dans notre laboratoire.

L'un des processus non linéaires étudiés au laboratoire est la génération de second harmonique (SHG). Celle-ci a été mise en évidence en 1961 par P. A. Franken[1] dans des cristaux non linéaires et s'utilise couramment pour doubler la fréquence des lasers. En 1979, ce processus a été appliqué en biologie par Samuel Roth et Isaac Freund[2] sur des tendons de rat où l'organisation du collagène permet d'obtenir l'effet non linéaire. Presque trente années se sont écoulées depuis cette expérience, mais la génération de second harmonique par le collagène reste mal comprise. De plus, même si de nombreuses études ont montré le potentiel de cette

technique, elle reste peu utilisée par les biologistes.

Cette thèse, sous la direction de Marie-Claire Schanne-Klein, veut répondre à plusieurs questions :

- Quel est le rôle de l'organisation submicrométrique du collagène dans la génération du signal de second harmonique ?
- Que peut apporter cette technique dans la visualisation du collagène par rapport aux autres techniques déjà existantes ?
- Quelle est la pertinence de cette technique pour répondre à des problématiques biologique ?

Nous nous sommes focalisés sur la fibrose qui est une accumulation anormale de collagène dans les tissus. Une thèse précédente réalisée dans notre laboratoire par Ana-Maria Pena avait déjà montré le potentiel de la génération de second harmonique pour évaluer la gravité de fibroses pulmonaires induites par la bléomycine. Toutefois, ces études réalisées en collaboration avec le service de pneumologie de l'hôpital Bichat sont restées à l'état de démonstration de principe. Nous avons alors engagé une collaboration étroite avec une équipe de néphrologues composée de Pierre Louis Tharaux, Monica Hernest et Cécile Fligny (Cardiovascular Research Center Inserm Lariboisière INSERM U689, France) qui travaillent sur les phénomènes de fibroses dans le rein, et nous avons appliqué la microscopie par génération de second harmonique à cette problématique biomédicale.

Dans ce manuscrit, le premier chapitre introduit les notions biologiques sur le collagène et la fibrose nécessaires à la compréhension de la suite. Le deuxième chapitre présente les diverses techniques de visualisation du collagène, insiste sur les principes et le dispositif de microscopie multiphoton et enfin développe une modélisation du signal de génération de second harmonique par le collagène observé en microscopie. Nous proposons ensuite dans le troisième chapitre une méthodologie pour quantifier la fibrose rénale, que nous validons sur un modèle murin de fibrose rénale. Enfin, le dernier chapitre est consacré à l'application de notre méthodologie à diverses problématiques biologiques liées à la fibrose rénale.

Chapitre 1

Collagène et Fibrose

1.1 Le Collagène

Avant d'entrer dans le vif du sujet, nous allons exposer quelques notions sur le collagène, la matrice extracellulaire et la fibrose. Les éléments présentés dans ce chapitre nous serviront ensuite à mieux comprendre les processus de génération de second harmonique par le collagène et la problématique biomédicale que nous avons cherchée à résoudre grâce à la microscopie multiphoton.

La matrice extracellulaire (ECM) est un ensemble complexe de molécules entourant les cellules dans les tissus des mammifères. Elle est principalement composée de molécules de collagène et d'élastine qui lui confèrent respectivement ses propriétés de rigidité et d'élasticité, mais aussi d'autres molécules comme la fibrilline, la fibronectine, la laminine ou encore les protéoglycanes qui servent de renfort aux deux premières protéines, mais aussi à créer des liens entre les cellules. Il ne faut pas voir la matrice extracellulaire comme un échafaudage dans lequel s'insèreraient les cellules, mais comme une structure active qui joue un grand rôle dans l'interaction des cellules entre elles. Elle peut, par exemple, servir à stocker des protéines et des facteurs de croissance pour les libérer en cas de besoin[3] ou encore à guider des cellules mobiles[4].

Le collagène est de loin la protéine la plus abondante chez les mammifères ; elle représente plus du quart des protéines du corps[5]. Mais en réalité, il ne faudrait pas parler du collagène, mais des collagènes. Il existe, en effet, toute une famille de molécules nommées collagènes, qui possèdent différentes structures moléculaires, différentes organisations macromoléculaires et

différentes fonctions. On compte jusqu'à présent 23 types de collagène, assemblés à partir de 41 chaînes α génétiquement distinctes[6]. Leur point commun est la présence d'un domaine en triple hélice qui leur donne un caractère inextensible et leur permet de résister à la traction. Les 2 grandes sous-familles de collagènes sont les collagènes fibrillaires (collagène I, II, III, V, XI) qui s'assemblent en fibrilles puis en fibre et les collagènes des membranes basales (collagène IV). Une liste avec les principaux collagènes avec leurs caractéristiques est donnée dans le tableau1.1.

Type et structure	**Distribution dans les tissus**	**Caractéristiques**
Collagènes fibrillaires		
I $[\alpha_1(I)]_2\alpha_2(I)$	Os, derme, tendons, ligaments, cornée ...	Le type le plus abondant
I $[\alpha_1(I)]_3$	Derme, dentine	forme mineure
II $[\alpha_1(II)]_3$	Cartilage, humeur vitrée, nucleus pulposus	Majoritaire dans le cartilage
III $[\alpha_1(III)]_3$	Derme, paroi des vaisseaux, intestin	Souvent associé au type I
V $\alpha_1(V), \alpha_2(V), \alpha_3(V)$	Poumons, cornée, os	Peut s'associer au type I
XI $\alpha_1(XI), \alpha_2(XI), \alpha_3(XI)$	Cartilage, corps vitré, nucleus pulpopsus	Associé au type II
Collagènes des membranes basales		
IV $[\alpha_1(IV)]_2\alpha_{1-6}(IV)$	Membrane basale	Forme des réseaux 2D
Collagènes microfibrillaires		
VI $\alpha_1(VI), \alpha_2(VI), \alpha_3(VI)$	Derme, cartillage, placenta, poumon, paroi des vaiseaux	s'organise en fibrilles formant un collier de perles
Fibrilles d'ancrage		
VII $[\alpha_1(VII)]_3$	Peau, jonction dermo-épidermique, muqueuse orale, cervix	
Réseaux hexagonaux		
VIII, X		
FACIT		
IX, XII, XIV, XIX, XX, XXI		
Collagènes tansmembranaires		
XIII, XVII		
Multiplexines		
XV, XVI, XVIII		

TABLE 1.1 – Tableau des différents types de collagène avec leur structure, leur distribution dans les tissus et quelques caractéristiques [source : Ricard-Blum *et coll.*[6]]

Le rôle du collagène est essentiel au maintien de l'intégrité des organes. Par exemple dans le scorbut, où une carence en vitamine C empêche la formation de la triple hélice de

collagène, la gaine de collagène qui entoure les vaisseaux sanguins est fragilisée et entraine de nombreuses hémorragies. Le collagène est aussi essentiel dans la cicatrisation puisque la baisse de tension sur les fibres de collagène lors d'une coupure est un signal d'activation des fibroblastes (cellules spécialisées dans la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire) qui vont ensuite synthétiser des fibres jusqu'à rétablir cette tension tissulaire et refermer la plaie[7;8].

1.1.1 chaîne α

Chaque molécule de collagène est constituée de l'assemblage de trois chaînes polypeptidiques, appelées chaînes α, qui sont arrangées en triple hélice. Chaque chaîne α présente un motif caractéristique en $[Gly - X - Y]$ répété n fois, où une glycine (Gly) est insérée tous les 3 acides aminés, tandis que X est fréquemment une proline (Pro), et Y une 4-hydroxyproline (Hyp).

Par exemple, la séquence primaire de la chaîne α_1(I) de collagène I est composée de la suite, du $13^{\text{ème}}$ au $66^{\text{ème}}$ acide aminé, suivante :

...Gly-Pro-Met-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Arg-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Hyp-Gly-Pro-Gln-Gly-Phe-Gln-Gly-Pro-Hyp-Gly-Glu-Hyp-Gly-Glu-Hyp-Gly-Ala-Ser-Gly-Pro-Met-Gly-Pro-Arg-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Lys-Asn-Gly-Asp-Asp...

L'hélice du collagène est une hélice de $1,5$ Å de rayon et de pas gauche (elle tourne en montant dans le sens des aiguilles d'une montre). Elle s'élève de $2,86$ Å par résidu et comporte $3,33$ résidus par tour[9]. On peut la comparer à l'hélice α qui est une hélice droite de $2,24$ Å de rayon et qui s'élève de $1,53$ Å par résidu et compte 3,6 résidus par tour[9]. L'arrangement de la triple hélice de collagène provient de la répulsion stérique entre les cycles pyrrolidines des résidus de proline. Une autre différence avec l'hélice α est que l'on ne retrouve pas de ponts hydrogènes entre les résidus d'une même hélice de collagène pour la stabiliser.

Trois chaînes α vont s'assembler pour former une hélice droite de $2,8$ Å de rayon et de $85,5$ Å de pas d'hélice[9][fig.1.1]. La chaîne latérale de la glycine est constitué d'un unique atome d'hydrogène qui pointe toujours vers l'intérieur alors que les résidus des autres acides aminés pointent vers l'extérieur, ce qui fait de la triple hélice un assemblage très compact. La stabilité de la triple hélice est assurée par les liaisons hydrogènes entre les résidus glycines d'une chaîne et les groupements carboxyles d'une autre, et est encore renforcée par l'hydroxylation

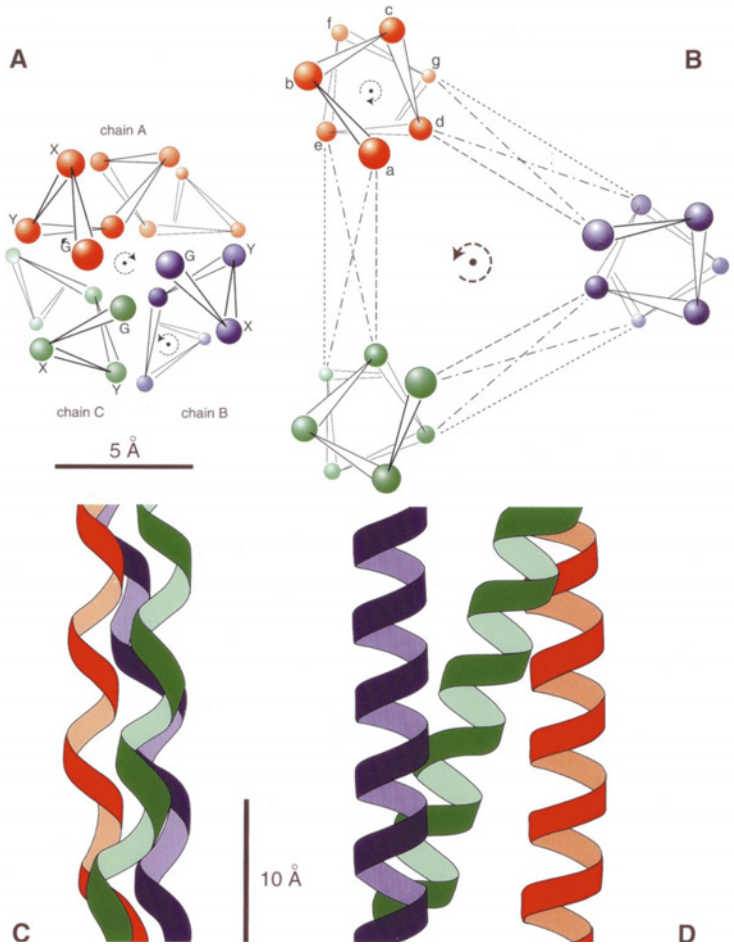


FIGURE 1.1 – Section transverse (A ;B) et longitudinale (C ;D) de la triple hélice de collagène (trois chaînes α) (A ;C) et d'une triple hélice composée de trois hélices α (B ;D) tracées à la même échelle. [source : Beck *et coll.*[9]]

des prolines grâce un effet stéréoélectronique.

La différence entre les types de collagène se fait au niveau des domaines non collagéniques. D'une part, les collagènes fibrillaires sont quasi exclusivement composés du domaine en triple hélice. Le collagène I par exemple est constitué d'un domaine en triple hélice de 1050 acides aminés, auxquels s'ajoutent 150 acides aminés du côté N-terminal et 250 du côté C-terminal. Ces deux domaines servent à la reconnaissance des chaînes α entre elles pour former la triple hélice. D'autre part, les autres types de collagènes possèdent des interruptions de leurs domaines en triple hélice plus ou moins nombreuses. Celles-ci vont servir à réaliser des fonctions supplémentaires et permettent l'assemblage de ces collagènes selon des schémas complexes.

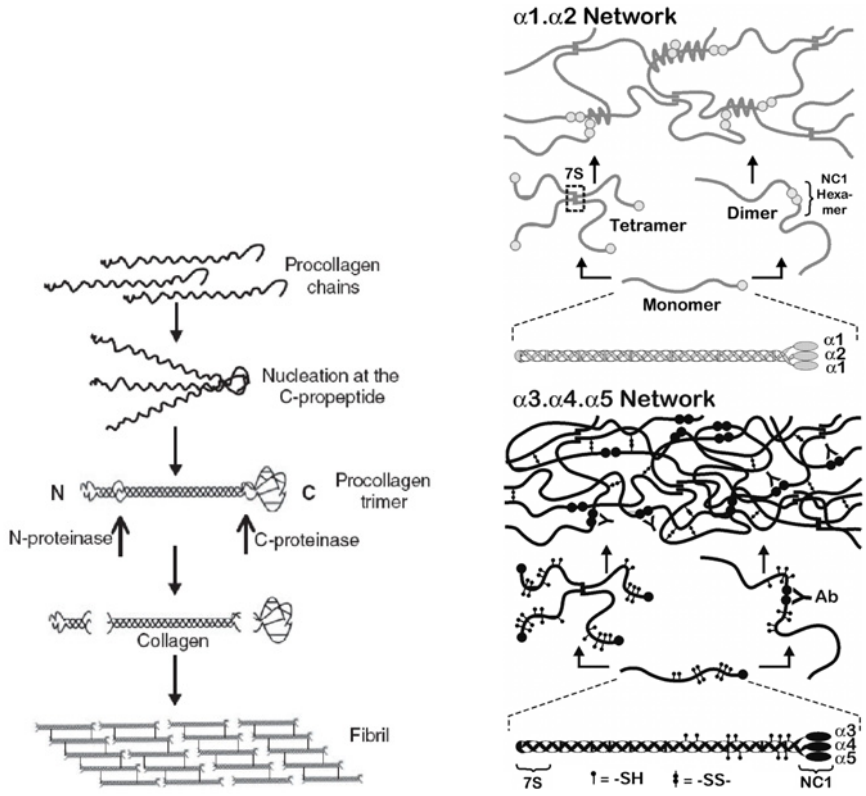
1.1.2 Synthèse

Les gènes codant le collagène possèdent un nombre variable d'exons (entre 3 et 17) séparés par des introns. Pour un gène donné, des sites différents d'initiation de la transcription ou bien des épissages alternatifs des introns peuvent donner naissance à différents types de collagènes. Un gène est donc associé à plusieurs chaînes α.

Une fois synthétisées au niveau des ribosomes, les chaînes α sont sécrétées dans la lumière du réticulum endoplasmique où elles vont subir d'importantes modifications posttraductionnelles. Le peptide signal attaché au propeptide N-terminal, dont la nature n'est pas connue à ce jour, est clivé, certains résidus prolines et lysines vont être hydrolysées, et certaines hydroxylysines glycolysées. Enfin, la formation de ponts disulfures entre les propeptides C-terminaux va aligner trois chaînes α qui vont s'enrouler comme une fermeture éclair en direction du N-terminus[10]. Les triples hélices de collagènes, appelées à ce stade procollagène, sont alors empaquetées dans des vésicules dans l'appareil de Golgi et excrétées à l'extérieur de la cellule.

1.1.3 Assemblage

L'assemblage du collagène suit le processus décrit dans la figure 1.2(a). Après exocytose, les peptides C et N terminaux sont coupés par des enzymes, la molécule est alors dénommée tropocollagène. La diminution de la solubilité liée à la perte des peptides terminaux enclenche le phénomène de fibrillogenèse. Les molécules de tropocollagènes (300 nm de long et $1,5$ nm de diamètre) vont s'aligner parallèlement et dans le même sens, mais avec un décalage de 67 nm. C'est ce décalage qui leur donne leur aspect strié si particulier en microscopie électronique ou



(a) Collagènes fibrillaires (b) Collagène IV

FIGURE 1.2 – (a) Processus d'assemblage des fibrilles : Les chaînes α sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique, assemblées en triples hélices grâce à l'interaction entre les parties C terminales. Il suit de nombreuses modifications posttraductionelles non représentées. A l'extérieur de la cellule, les propeptides sont coupés et les molécules de collagène peuvent alors s'assembler en fibrilles. La stabilisation des fibrilles est réalisée à l'aide de liens covalents entre les molécules de collagène d'une même fibrille. (b) Formation des membranes basales à partir du collagène IV : Trois chaînes α du collagène IV s'assemblent pour former une triple hélice. La structure supramoléculaire est ensuite formée par dimérisation des domaines C terminaux et par tetramérisation des domaines N terminaux. Lors de son développement, la membrane basale glomérulaire est d'abord composée d'un réseau $\alpha_1\alpha_2$(IV) qui est ensuite remplacé par un réseau possédant plus de ponts covalents $\alpha_3\alpha_4\alpha_5$ (IV) et qui est aussi caractérisé par des boucles et des enroulements superhélicoïdaux. [source : (a) Canty *et coll.*[11] ; (b) Boutaud *et coll.*[12]]

en AFM. Pour stabiliser l'ensemble, des lysines de la partie N-terminale d'une molécule sont pontées de façon covalente à d'autres lysines de la partie C-terminale d'une molécule voisine par l'action de la Lysyl oxydase. Cela permet aux molécules de tropocollagène de s'assembler en une fibrille de diamètre variable, entre quelques dizaines de nanomètres et des centaines de nanomètres, suivant les organes et leur composition dans les différents types de collagène. Les fibrilles elles-mêmes peuvent se regrouper en fibre de collagène dont le diamètre est compris entre 1 μm et 10 μm.

En fait, il existe de nombreux types d'organisation de collagènes fibrillaires, dont on peut donner quelques exemples :

- Dans la cornée, la taille des fibrilles est maintenue à environ 35 nm et celles-ci sont organisées en lamelles dans lesquelles toutes les fibrilles ont une même direction[13]. La direction des fibrilles tourne d'environ 90° entre chaque lamelle et reste toujours parallèle à la surface de la cornée, à la manière d'un contreplaqué [fig.1.3(a)]. Cette organisation très particulière est une des raisons de la transparence de la cornée.
- Dans le derme, les fibres ont des diamètres variables, ne sont pas parallèles entre elles et ne sont pas rectiligne. L'ensemble des fibres va former une sorte de pelote de fils qui va donner à la peau ces propriétés de résistance à la tension mais aussi certaine propension à pouvoir s'étirer.[14] [fig.1.3(b)].
- Dans l'aorte, les fibres de collagène de l'adventice ne sont pas cylindriques, mais ressemblent à des rubans qui entourent la média. Le collagène de l'adventice est là pour soutenir les cellules musculaires lisses et leur offrir une structure rigide sur laquelle s'appuyer.[14] [fig.1.3(c)].
- Dans les tendons, les fibres sont parallèles entre elles et, à un âge donné, ont des diamètres assez proches. Toutefois, leur diamètre varie avec l'âge du tendon (ce qui est surement aussi le cas dans d'autres tissus). Chez la souris, à 4 jours les fibres font 64 ± 12 nm, à 10 jours 102 ± 37 nm, à 1 mois 195 ± 62 nm et à 3 mois 223 ± 82 nm[15] [fig.1.3(d)].

Dans d'autres types de collagènes, les domaines non collagéniques, c'est à dire qui ne s'assemblent pas en triple hélice, empêchent la formation de fibrilles. Quelques exemples :

- Le collagène IV s'assemble grâce à ses domaines non collagéniques pour former un réseau complexe qui sera stabilisé ensuite par des liaisons entre les parties collagéniques[fig.1.2(b)].

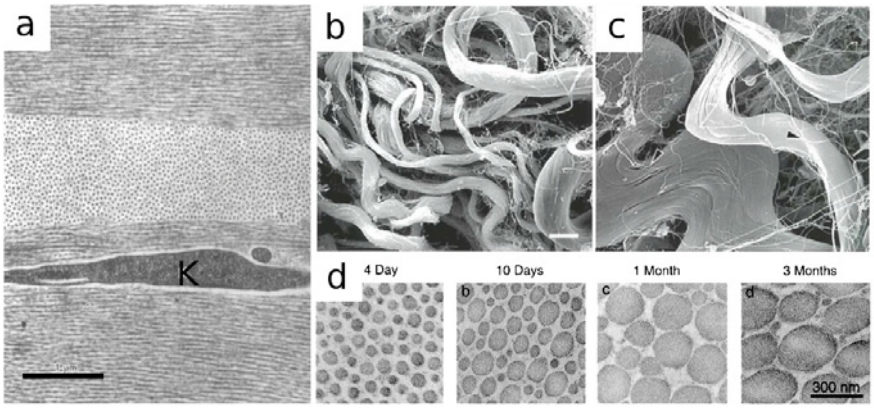


FIGURE 1.3 – Organisation des fibrilles dans différents organes : (a) image TEM du stroma cornéen humain : toutes les fibrilles ont la même direction dans une même lamelle et un diamètre constant d'environ 35 nm (K = keratocyte, barre d'échelle = 1 μm) ; (b) image SEM des fibres de collagène dans le derme humain : les fibres ont des diamètres variables (barre d'échelle 5 μm) (c) image SEM des fibres de collagène de l'adventice d'une aorte de rat : les fibres sont en ruban ; (d) image TEM de la structure des fibrilles durant le développement (4 jours, 10 jours, 1 mois, 3 mois) d'un tendon de souris : les fibrilles sont cylindriques et leur diamètre augmente avec le temps (barre d'échelle 300 nm) [source : (a) Komai *et coll.*[13] ; (b-c) Ushiki *et coll.*[14] ; (d) Ezura *et coll.*[15]]

- Les collagènes IV et VII vont former des complexes, les plaques d'ancrage, pour relier la membrane basale entre l'épiderme et le derme avec les collagènes fibrillaires du derme[16]
- Les collagènes transmembranaires ont un domaine N-terminal intracellulaire, un court domaine transmembranaire, puis un domaine extracellulaire lui-même composé de plusieurs domaines en triple hélice. Ces collagènes servent à relier les cellules entre elles et à la membrane basale. Si leur partie extracellulaire est séparée de la partie intracellulaire par l'action d'enzymes, elle sert alors de protéine de signalisation[17]

On voit par ces quelques exemples toute la diversité d'organisation macromoléculaire que peut avoir le collagène, et ce, même à l'intérieur d'une sous-famille comme les collagènes fibrillaires. C'est aussi cette diversité qui rend complexe la compréhension de la génération de second harmonique par le collagène comme nous le verrons dans le chapitre 2.3.

1.1.4 Dégradation du collagène

La dégradation des collagènes, ou d'autres molécules de la matrice extracellulaire, est réalisée essentiellement par une famille d'enzymes : les métalloprotéases[18]. Dans cette famille on remarque essentiellement la MMP-1, ou collagènase, qui digère spécifiquement les collagènes fibrillaires (I, II, et III) et dont le mode d'action est encore inconnu. Les MMP-2 et MMP-9, quant à elles, ne digèrent que les collagènes déjà dénaturés.

1.1.5 Régulation de la production du collagène

Pendant le développement embryonnaire, le collagène de type I est synthétisé à un niveau relativement élevé, cette synthèse se ralentit ensuite au cours de la vie pour atteindre chez l'adulte un niveau assez faible. Il semble que le renouvèlement des fibres de collagène chez l'adulte soit extrêmement lent et il suffit probablement d'un petit déséquilibre dans la synthèse de collagène pour entrainer l'apparition progressive d'une fibrose. Il est donc essentiel que les mécanismes de régulation de la synthèse de collagène I soient extrêmement précis. Le lecteur pourra trouver dans un article de revue écrit par Rossert *et coll.* en 2003 une description plus détaillée de la régulation du collagène I[19] que celle que nous allons donner ici.

La régulation de la synthèse du collagène se fait avant tout au niveau transcriptionnel, mais aussi au niveau de son assemblage et de sa dégradation. Bien qu'il reste beaucoup à découvrir sur les mécanismes de régulation transcriptionnelle, certaines molécules sont connues pour

modifier le niveau d'expression des collagènes[20].

Le TGF-β (Transforming Growth Factor) augmente la transcription des gènes correspondants aux protéines de la matrice extracellulaire[21;22], mais rend aussi plus stable les ARNm du collagène, stimule la prolifération de fibroblastes et inhibe les métalloprotéases. Cette protéine est sécrétée par de nombreuses cellules, y compris les macrophages, les lymphocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales, et certaines cellules rénales comme les cellules mésangiales, les cellules tubulaires proximales et les cellules du canal collecteur. Le PDGF (Platelet-derived growth factor), l'angiotensine II, les produits de peroxydation liquides ou l'hypoxie augmentent la synthèse du TGF-β et ont donc un effet profibrosant. Les effets du TGF-β sur la production de matrice extracellulaire par les cellules fibroblastiques ont pu être confirmés *in vivo* dans plusieurs modèles[23].

L'interféron γ (IFN-γ) est quant à lui une cytokine produite à la fois par les lymphocytes T auxiliaires de type Th1 et par les cellules NK. L'IFN-γ diminue à la fois la prolifération des fibroblastes et la synthèse de collagène de type I par ces cellules[21].

Le TNF-α (Tumor necrosis factor α) et l'interleukine-1 sont deux autres cytokines régulant la production de collagène et toutes les deux sont produites par les macrophages. Bien que leurs mécanismes d'action soit différents, leurs résultats sont proches : ils stimulent la prolifération des fibroblastes, mais inhibent la production de collagène de type I et augmentent la production de collagénases interstitielles et donc la dégradation du collagène[21].

Pour compléter le tableau, on peu encore citer la prostaglandine E2, les interleukines 4 et 10, l'oncostatine M, les cortocoïdes, l'acide rétinoïque, la vitamine C, l'epidermal growth factor, l'insulin growth factor 1, le fibrobalst growth factor ... On voit bien ici toute la complexité du mécanisme de régulation du collagène et les nombreuses cascades de signalisation qui contrôlent la synthèse du collagène. On peut tout de même voir la forte relation entre la production de collagène et le développement cellulaire, l'inflammation et la cicatrisation.

1.2 La transglutaminase 2

La famille des transglutaminases est composée d'enzymes acyl-transférases, dépendantes du calcium, qui catalysent le transfert du groupement carboxamide d'un résidu glutaminyl sur le résidu lysyl d'une protéine (réticulation) ou sur une amine. Le lecteur pourra trouver un article de revue de Griffin *et coll.*[24], sur les différentes enzymes composant cette famille.

Nous ne traiterons ici que de la transglutaminase 2 (TG2), ou transglutaminase tissulaire, puisque parmi ses substrats se trouvent de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine, fibrinogène, vitronectine ...) ou des protéines liées à la mobilité cellulaire et aux interactions cellule-matrice. La TG2 a plusieurs rôles :

Fonction physiologique La TG2 pourrait être impliquée dans la prolifération cellulaire[25].

Apoptose Il a été suggéré que la TG2 joue un rôle important dans la stabilisation des cellules apoptotiques, en liant les compartiments cellulaires pour éviter la perte de ceux-ci avant la phagocytose. La TG2 empêche donc le relargage des protéines de la cellule en apoptose dans l'espace interstitiel ce qui serait néfaste pour les cellules environnantes[26].

Matrice extracellulaire Avant de pouvoir interagir avec la matrice extracellulaire, la TG2 doit être externalisée. Après sécrétion, la TG2 se retrouve majoritairement dans l'espace péricellulaire par interaction avec des protéines de la membrane, mais une petite partie est larguée dans l'espace interstitiel et va réagir avec la matrice extracellulaire. Dans ce dernier cas, elle renforce la stabilité des protéines de l'ECM[27], c'est-à-dire leur résistance protéolytique, chimique et mécanique, en créant de nouvelles liaisons covalentes entre elles. Dans un second temps, elle augmente aussi l'adhésion et la mobilité cellulaires[28]. Il a aussi été montré que la TG2 pouvait servir de protéine d'adhésion indépendante entre la cellule et la fibronectine.

Toutes ces propriétés montrent bien l'importance de la TG2 dans les processus d'apoptose, de cicatrisation et de renforcement de la matrice extracellulaire. Elle intervient ainsi dans de nombreuses maladies, dont la fibrose qui nous intéresse tout particulièrement.

L'équipe du Prof. Griffin est pionnière dans l'étude de l'expression et des fonctions physiologiques et pathologiques de la TG2 dans le tissu rénal[29;30;31;32;33;34]. En 1997, Johnson *et coll.* démontrent que la TG2 est faiblement exprimée dans le tissu rénal sain chez le rat, et que les liaisons covalentes ϵ-(γ-glutamiyl) lysines qui proviennent de son activité sont peu nombreuses[29]. La TG2 ainsi que les protéines liées par la TG2 sont alors détectées dans les cellules tubulaires, majoritairement dans le compartiment intracellulaire. En revanche, dans un modèle aggressif de fibrose rénale chez le rat (néphrectomie subtotale), l'activité enzymatique et l'expression de la TG2 sont significativement augmentées dans les cellules tubulaires. La quantité de liaisons covalentes ϵ-(γ-glutamiyl) lysines générées est alors augmentée d'un facteur 5, 90 jours après la néphrectomie et d'un facteur 29 au bout de 120 jours. La majorité

des liaisons covalentes crées par la TG2 se situe alors au niveau du compartiment intracellulaire, mais également, en plus faible proportion, au niveau de l'espace interstitiel péritubulaire, particulièrement au niveau des lésions fibrotiques[29].

En utilisant le même modèle de fibrose rénale chez le rat, les auteurs ont par la suite montré par la technique d'hybridation *in situ*, que la TG2 était exprimée majoritairement au niveau du cortex rénal, par les cellules tubulaires proximales, et distales dans une moindre mesures[30]. Une surexpression plus modérée de la TG2 est également détectée dans la médulla. Cette équipe a démontré une corrélation forte entre l'expression et l'activation de la TG2 et la progression de la fibrose[31]. Ils ont finalement mis en évidence, dans une étude réalisée sur des cultures de cellules tubulaires proximales, que l'inhibition de la TG2 réduisait l'accumulation de matrice extracellulaire et ne semblait pas modifier la synthèse de matrice extracellulaire et de TGF-β dans un modèle de fibrose induite par la glucose[32].

Notre hypothèse de travail sera que la TG2 ne régule pas directement la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire, mais que son inhibition empêche l'accumulation de fibres de collagène. Cette inhibition pourrait avoir plusieurs origines :

- L'inhibition de l'activité de création de liaisons covalentes entre les protéines de la matrice extracellulaire, rendrait cette dernière plus sensible à la digestion par les métalloprotéases qui pourraient alors détruire les molécules de collagène en excès.
- L'inhibition de la TG2 diminuerait la formation de fibrilles de fibronectine qui est son substrat de prédilection. Or le réseau de fibronectine est très important lors de l'assemblage des fibres de collagène et l'on aurait alors une inhibition de l'assemblage des molécules de collagènes en fibrilles.
- La TG2 aurait aussi un rôle dans le stockage et l'activation du TGF-β et son inhibition pourrait alors réduire la réponse inflammatoire et par suite la sécrétion de collagène en cas d'agression du tissu.

On voit tout l'intérêt pharmacologique que pourrait avoir l'inhibition de la TG2 dans le cadre de la fibrose et c'est pourquoi nous nous y sommes intéressés.

1.3 La fibrose

La fibrose est une lésion du tissu conjonctif qui est définie par l'augmentation des constituants fibrillaires de la matrice extracellulaire dans un tissu ou un organe. Elle est souvent

liée à l'inflammation, mais peut aussi intervenir dans d'autres conditions (pathologies vasculaires, métaboliques, tumorales). La fibrose est le résultat d'une rupture de l'équilibre entre la synthèse, l'assemblage et la dégradation des constituants de la matrice extracellulaire.

Pour bien comprendre, nous allons nous intéresser à un processus dans lequel une forte synthèse de fibres est nécessaire chez l'adulte : la cicatrisation. Comme l'explique bien l'article de revue de Stramer *et coll.*[35], l'évolution semble avoir sélectionnée un processus de réparation rapide et robuste après une blessure, mais qui en contrepartie dépose parfois de la matrice extracellulaire en excès et de façon peu ordonnée. La cicatrisation normale se fait en trois phases :

Détersion Elle débute avec l'apparition de phénomènes inflammatoires et la sécrétions de protéine, d'anticorps et de cellules à partir des vaisseaux sanguins et des vaisseaux lymphatiques. La thrombine va provoquer la coagulation en transformant le fibrinogène, protéine de plasma sanguin, en fibrine. Les anticorps, leucocytes et autres macrophages se déplacent dans la zone concernée pour la nettoyer des tissus nécrosés, corps étrangers et microbes. Les leucocytes et les macrophages vont aussi sécréter des facteurs activant la prolifération des fibroblastes.

Bourgeonnement L'organisme commence à combler la lésion en générant un nouveau tissu, le tissu de granulation, par mitose des cellules avoisinantes. Les fibroblastes dont le nombre a fortement augmenté vont synthétiser de grande quantité de molécules de collagène qui vont s'assembler pour former une nouvelle matrice de collagène. Cette phase est aussi accompagnée d'une importante angiogenèse pour assurer la nutrition du nouveau tissu. La formation du tissu de granulation se fait par couches successives.

Epithélialisation Les fibres de collagènes vont arriver à leur diamètre et longueur définitive. L'action contractile des myofibroblastes va leur permettre d'acquérir leur tension finale pour donner ses qualités mécaniques aux tissus. Le tissu va aussi s'appauvrir en eau et les vaisseaux superflus vont être détruits ce qui rend le tissu de granulation plus ferme. Enfin, la surface de la plaie est colonisée par mitose et migration de cellules épidermiques des bords de la plaie.

Cependant, un nombre croissant d'études ont montré que les leucocytes avaient aussi leurs aspects plus négatifs et étaient en partie responsables de la fibrose. En effet, les facteurs qu'ils sécrètent peuvent induire une surproduction de collagène qui résultera en une zone fibreuse,

plus communément appelée cicatrice. Il a d'ailleurs été montré, en partie, qu'il était possible de cicatriser sans la réponse inflammatoire et qu'alors la fibrose était réduite.

Ce schéma de fibrose liée à l'inflammation n'existe pas seulement dans le cas de la peau, mais aussi dans d'autres organes. Par exemple, la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine va d'abord déclencher une réaction inflammatoire aigüe suivie de l'apparition d'une fibrose. Ce processus a été étudié dans une thèse précédente au laboratoire[36]. Toutefois, toutes les fibroses ne sont pas liées à l'inflammation, par exemple les fibroses pulmonaires idiopathiques se développent alors que l'inflammation est très faible[37].

On voit ici que la synthèse de fibres est souvent utile et permet à l'organisme de se réparer. Toutefois, le moindre déséquilibre dans la production de matrice extracellulaire peut avoir des conséquences dramatiques à long terme et détruire des organes comme les poumons, les reins, le foie... Il est donc indispensable d'avoir des outils pour suivre la production de fibres de collagène, visualiser le collagène et évaluer l'efficacité de traitements contre la fibrose. C'est dans ce cadre que se place cette thèse qui veut évaluer la pertinence de la génération de second harmonique du collagène pour visualiser le collagène et étudier les processus de fibrose.

Chapitre 2

Techniques d'imagerie

Il existe de nombreuses techniques permettant de visualiser le collagène. La première partie de ce chapitre n'a pas pour prétention d'être exhaustive, mais veut présenter brièvement les techniques les plus couramment utilisées. La seconde partie du chapitre se focalise sur la microscopie multiphoton et plus particulièrement sur la génération de second harmonique par le collagène. Enfin nous essaierons de comparer les différentes techniques entre elles en ce qui concerne l'imagerie et la quantification du collagène.

2.1 Techniques d'imagerie conventionnelles du collagène

2.1.1 Colorations histologiques

Les colorations restent les techniques de référence pour évaluer l'état pathologique des tissus. Elles utilisent des colorants qui vont se fixer préférentiellement à certaines molécules. Il suffit ensuite d'observer l'échantillon au microscope en lumière blanche pour en révéler la structure. Nous traiterons ici des trois techniques les plus utilisées dans le cas du diagnostique de la matrice extracellulaire. Ces techniques s'appliquent presque exclusivement à des coupes minces et obligent ainsi à travailler *ex vivo*.

La procédure standard pour observer des lames histologiques est la suivante. Tout d'abord, pour préserver au maximum l'échantillon, celui-ci est plongé juste après son prélèvement dans une solution à base de formol qui va créer des liaisons covalentes entre les molécules. Cela va empêcher l'autolyse du tissu et le rendre plus rigide. L'échantillon ainsi préparé est ensuite inclus dans un bloc de paraffine avant d'être coupé en tranches de moins de 10 μm

à l'aide d'un microtome. Les coupes réalisées seront collées sur une lame de microscope avec de l'albumine. C'est sous cette forme que sont conservées les lames histologiques jusqu'à leur future coloration. Lorsque les lames doivent être colorées, il faut au préalable les déparaffiner et les réhydrater. Il est alors possible de les plonger successivement dans des bains de colorants dilués dans des solutions tampon puis dans des bains de rinçage. La coupe est alors recouverte d'une lamelle de verre pour la protéger avant d'être observée au microscope.

Les protocoles détaillés de ces techniques sont disponibles sur les pages Internet suivantes :

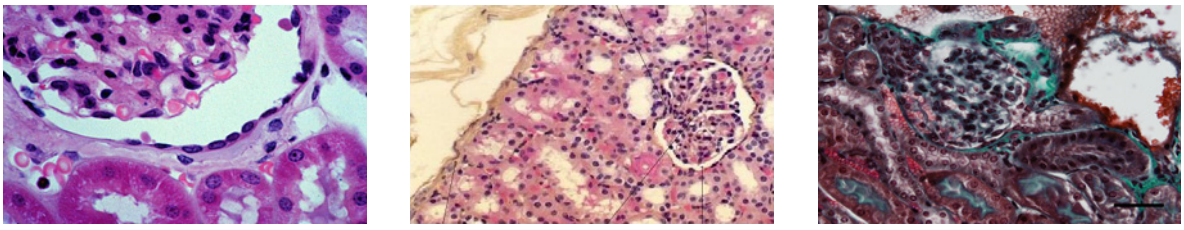
- IHCworld `http://www.ihcworld.com/knowledge-center.htm`
- AnapthWEB `http://www.anapath.necker.fr/`
- Stains'Files `http://stainsfile.info/StainsFile/jindex.html`

Hématoxyline Eosine Safran

La coloration à l'hématoxyline sert à marquer les noyaux cellulaires. Elle provient d'un arbre tropical, le Campêche (*Haematoxylum campechianum*), que l'on trouve en Amérique centrale et aux Antilles. Le principe colorant, l'hématine, produit de l'oxydation de l'hématoxyline, était déjà connu par les aztèques pour teindre les vêtements. Même si la technique avait déjà été utilisée avec plus ou moins de succès avant, c'est Böhmer[38] qui en 1865, prenant exemple sur l'industrie textile, ajouta un mordant métallique et marqua efficacement les tissus biologiques. Le mordant, un cation métallique, souvent du Fe(III) ou de l'Al(III), va former un complexe avec l'hématine. C'est cet ion qui va ensuite réagir avec les acides nucléiques et colorer en bleu-violet les noyaux des cellules et les parties du cytoplasme riches en ARN.

Le colorant hématoxyline est associée à l'éosine, un colorant rose-rouge provenant de la réaction de la bromine sur la fluorescéine. Cette combinaison a été utilisée la première fois par Wissowzky en 1876. L'éosine réagit essentiellement par force électrostatique avec les acides aminés basiques tels que l'histidine, l'arginine ou encore la lysine. Ainsi c'est tout le cytoplasme, la matrice extracellulaire, les fibres musculaires et les globules rouges qui seront marqués en rouge. L'utilisation des deux colorants simultanément permet de bien rendre compte de la morphologie des tissus comme le montre la figure 2.1(a). Afin d'améliorer le contraste du tissu conjonctif, on peut ajouter un troisième colorant le Safran qui provient de la fleur du *crocus sativus*. Le mode d'action du safran est analogue à celui de l'éosine. Par un choix habile des tampons et des solutions de rinçage, il est possible de marquer préférentiellement

la matrice extracellulaire avec le safran. Elle apparait alors en jaune-orangé comme on peut le voir dans la figure 2.1(b).



(a) H&E (b) HES (c) Trichrome de Masson

FIGURE 2.1 – (a) Coupe de rein colorée hématoxyline-éosine [source : Histology Learning System, Boston University] ; (b) Coupe de rein colorée hématoxyline-éosine-safran [source : Laboratoire Histotox La Rochelle] ; (c) Coupe de rein colorée au trichrome de Masson - Barre d'echelle 50 μm

Trichrome de Masson

Le trichrome de Masson est une technique de coloration permettant de visualiser la matrice extracellulaire plus spécifiquement. Elle a été mise au point par Masson[39] en 1929 et depuis il en existe de nombreuses variantes. Habituellement, le trichrome de Masson utilise les colorants suivants :

- L'hématoxyline pour les noyaux.
- La fuschine acide, un colorant synthétique violet, mis au point par Renard frères et Franc qui colore le cytoplasme selon un principe similaire à l'éosine.
- Pour le tissu conjonctif, on utilise le vert lumière, le bleu d'aniline ou des dérivés toujours dans les couleurs bleu-vert pour un meilleur contraste. C'est l'affinité de ces molécules, qui sont des acides forts, pour les groupes cationiques du collagène qui est mise à profit.

La figure 2.1(c) montre l'intérêt de cette technique par rapport à la coloration HES pour visualiser la matrice extracellulaire ; le contraste entre le vert et le rouge du trichrome de Masson est bien meilleur que le contraste entre le jaune et le rose de la coloration HES.

Des recherches sont menées pour automatiser la lecture des coupes colorées au trichrome de Masson, notamment par l'équipe d'analyse d'image quantitative de l'Institut Pasteur[40]. Nous en reparlerons plus en détail dans la partie 4.4.

Picro-Sirius ou rouge Sirius

Cette technique utilisant le colorant rouge Sirius F3B dilué dans de l'acide picrique, a été décrite par Sweat en 1964[41]. Elle colore en rouge la matrice extracellulaire et quelques autres structures (amyloïdes, grains de keratohyaline) sur un fond jaune [fig. 2.2(a)]. Comme les molécules de rouge Sirius s'alignent le long des fibres de collagène et augmentent leur biréfringence[42], il est possible de visualiser spécifiquement le collagène fibrillaire[43] avec un système de polariseurs croisés [fig. 2.2(b)].

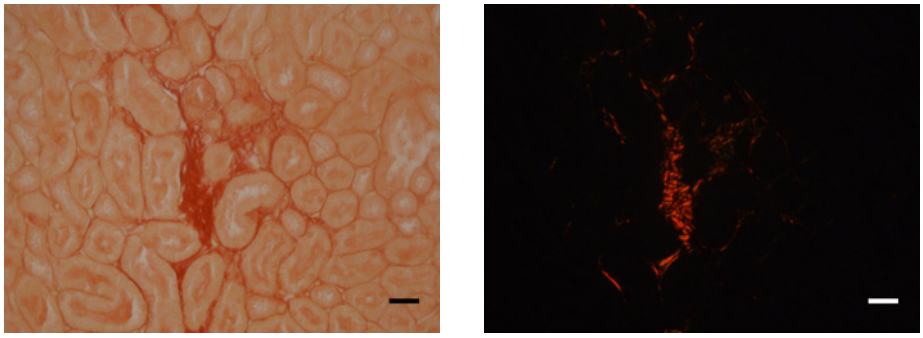
Le rouge Sirius en plus d'être biréfringent, absorbe les petites longueurs d'onde du spectre visible ce qui fait que les couleurs observées ne sont pas celle des teintes de Newton en lumière blanche. De plus, tout porte à croire que l'organisation du collagène sub-micrométrique va déterminer la concentration locale de molécule de rouge Sirius qui vont s'aligner sur ces fibrilles : plus le rapport surface/volume de collagène sera grand, plus la coloration au rouge Sirius sera forte. Ainsi, les déphasages induits par la biréfringence et l'absorption d'une partie du spectre par le colorant, qui dépendent essentiellement du diamètre des fibres et du type de collagène, détermine la couleur à laquelle apparaissent les fibres[44].

Le contraste des fibres sera fonction de l'orientation de celles-ci par rapport à la polarisation incidente. Pour s'affranchir partiellement de la dépendance à l'orientation des fibres, il est possible d'utiliser de polariseurs circulaires.

Sa spécificité et son contraste font de cette technique un bon outil pour la visualisation du collagène fibrillaire[45;46]. Toutefois, il semble difficile d'utiliser cette technique pour obtenir des informations quantitatives sur le nombre de molécules de collagène fibrillaire présentes dans l'échantillon, car la relation entre l'image obtenue et le contenu de l'échantillon est complexe.

2.1.2 Microscopie de Fluorescence

La fluorescence peut être observée avec diverses techniques de microscopie : des techniques plein champ, des techniques d'endoscopie ou des techniques qui permettent une localisation tridimensionnelle comme la microscopie confocale. On adjoint souvent aux microscopes de fluorescence des modules de détection résolues spectralement ou temporellement qui permettent des études spectroscopiques et facilitent la différentiation des molécules fluorescentes.



(a) Picrosirius en lumière non polarisée (b) Picrosirius entre polariseurs circulaires croisés

FIGURE 2.2 – (a) Coupe de rein colorée au picrosirius en lumière non polarisée ; (b) Même coupe mais entre polariseurs circulaires croisés - Barre d'echelle 50 μm

Fluorescence Endogène

Il est possible de visualiser les fibres de collagène grâce à leur fluorescence intrinsèque bien qu'il semble que ce soit plus les liaisons covalentes entre les molécules, que les molécules elles-mêmes, qui soient fluorescentes. Richards-Kortum et Sevick-Muraca[47] notent pour du collagène en poudre des maxima d'excitation et d'émission respectifs aux longueurs d'onde suivantes : 280 et 310 nm, 265 et 385 nm, 330 et 390 nm, 450 et 530 nm. Le pic d'absorption à 330 nm, le plus intense, a été attribué aux liaisons hydroxylysyles pyridinolines et lysyles pyridinolines. L'origine des autres pics d'absorption n'a pas encore été identifiée.

L'utilisation de longueurs d'ondes aussi décalées vers l'UV peut poser des problèmes : d'une part ces longueurs d'ondes sont nettement plus absorbées et diffusées par les tissus, ce qui limite la profondeur de pénétration, d'autre part elles sont plus phototoxiques. L'étude du signal de fluorescence émis par le collagène ne demande pas de préparation préalable des tissus observés et peut être réalisée *in vivo, in situ*. Cependant, il existe de nombreuses autres molécules fluorescentes (NAD(P)H, élastine, dérivées porphyriniques ...) dans les tissus et il n'est pas toujours évident, même par une analyse spectrale, de différencier le signal émis par le collagène de celui émis par les autres molécules fluorescentes présentes dans l'échantillon.

Fluorophores exogènes

Pour visualiser plus spécifiquement le collagène on peut avoir recours à des fluorophores exogènes qui vont se fixer au collagène. Il existe différents types de marqueurs : la dichloro-

triazinyle aminofluoresceine (DTAF), des fluorophores construits à partir de protéines se liant au collagène, des anticorps.

DTAF La dichlorotriazinyle aminofluoresceine est une petite molécule qui a été utilisé pour marquer le collagène *in vivo*[48;49]. Cette molécule se fixe de manière covalente aux liaisons amines et, à pH neutre, aux carbohydrates. C'est donc un fluorophore peu spécifique du collagène.

Domaines de liaison au collagène fluorescents Une équipe de l'université de Eindhoven[50] a récemment mis au point des nouveaux marqueurs fluorescents du collagène. Ces marqueurs sont basés sur des protéines d'adhésion bactérienne ou des intégrines qui se lient naturellement au collagène. Après avoir extrait le domaine de liaison au collagène de ces protéines, ils l'ont couplé avec des fluorophores. Ces sondes plus petites que les anticorps et plus spécifiques que la DTAF pourraient se révéler très utiles dans le futur pour les études du collagène *in situ* par fluorescence.

Immunohistochimie Même s'il est possible d'utiliser des anticorps dans des conditions physiologiques, leur coût et leur pénétration limitée dans les tissus entraînent qu'ils sont quasi exclusivement utilisés sur des sections fixées. Comme les anticorps reconnaissent la structure des protéines, il n'est pas possible d'utiliser une fixation au formol. Dans ce cas, les échantillons sont congelés et les coupes sont réalisées au cryomicrotome. Une fois décongelées, on utilise de l'acétone qui agit en dénaturant les protéines ; ce type de fixation ne permet pas de conserver les échantillons sur de longues périodes (plusieurs semaines). Une fois décongelé et fixé, le tissu est incubé avec un ou plusieurs anticorps succesivement. Souvent, un anticorps primaire sert à reconnaître le collagène et un anticorps secondaire, couplé à une molécule fluorescente, reconnaît l'anticorps primaire. Avec cette technique il est possible de marquer spécifiquement un type de collagène particulier. La qualité du marquage est déterminée par la spécificité et l'affinité des anticorps utilisés.

2.1.3 Microscopie en lumière réfléchie

Un autre moyen de visualiser le collagène est de mesurer la fraction de la lumière que les fibres réfléchissent. Les techniques de microscopie utilisant la lumière réfléchie (OCT, microscopie confocale) ne nécessitent aucune préparation de l'échantillon, permettent une

visualisation tridimensionnelle et ont des vitesses d'acquisition vidéo. Bien que ces techniques n'aient aucune spécificité, elles ont été utilisées pour étudier la fibrillogénèse in vitro[51]. Le couplage de ces techniques avec des mesures polarimétriques permet d'en améliorer la spécificité. Malheureusement, le collagène n'est pas une molécule assez biréfringente pour être détecté directement et il est nécessaire d'ajouter du rouge Sirius pour augmenter l'effet sur la polarisation[52].

2.1.4 Microscopie électronique

La microscopie électronique sert essentiellement à étudier la structure des fibrilles, ainsi qu'à analyser leur formation[53;54]. Elle permet de s'affranchir de la limite de résolution optique. Elle utilise des électrons dont la longueur d'onde est beaucoup plus petite que celle des photons visibles. Les meilleurs microscopes électroniques atteignent aujourd'hui des résolutions inférieures à l'angström. Par contre les échantillons doivent passer par de nombreuses étapes de préparation (cryofixation, déshydratation, inclusion, coloration avec des métaux lourds) avant de pouvoir être imagés.

2.1.5 Microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique permet d'étudier la structure et les propriétés mécaniques du collagène[55;56;57]. Elle est basé sur la déflection d'une pointe, le cantilever, lorsque celle-ci parcourt l'échantillon. Les résolutions obtenues sont similaires à celle de la microscopie électronique, toutefois, son champ de vue est plus petit et la hauteur maximale accessible de l'échantillon ne peut excéder le micromètre. Il est aussi possible d'utiliser des modes capables de mesurer les propriétés mécaniques des échantillons. Contrairement à la microscopie électronique, la microscopie à force atomique ne nécessite pas une préparation délicate de l'échantillon et peut même travailler en milieu liquide sur des échantillons vivants[58].

2.1.6 Diffraction de rayons-X

La figure de diffraction des rayons-X par un cristal artificiel de molécules de synthèse reproduisant la triple hélice permet de déterminer la structure 3D de la molécule de collagène et les paramètres de la triple hélice[59]. Mais il est aussi possible de mesurer la diffraction des

rayon-X par un ensemble de fibrilles. Dans ce cas, elle permet d'accéder à l'organisation des molécules de collagène dans une fibrille[60;61;62].

2.2 Microscopie multiphoton

La microscopie multiphoton utilise les interactions non-linéaires entre la lumière et la matière comme source de contraste. Le processus non-linéaire à l'origine du développement de la microscopie multiphoton est l'absorption à deux photons et la fluorescence qui en découle (2PEF), démontré théoriquement par Maria Goeppert-Mayer en 1929 lors de sa thèse. Il a fallu ensuite 30 années et le développement des lasers pour le mettre en évidence expérimentalement puis attendre 1990 pour que Winfried Denk, Jim Strickler et Watt W. Webb[63] l'applique à la microscopie. Par la suite, la microscopie multiphoton s'est enrichie en utilisant de nouveaux modes de contraste. Tout d'abord, la génération de second harmonique (SHG) mise en évidence par P. A. Franken[1] et appliquée à la microscopie par Samuel Roth et Isaac Freund[2]. Ce n'est qu'une dizaine d'années plus tard, que le groupe de Yaron Silberberg[64] a mis en oeuvre la génération de troisième harmonique (THG). Enfin, même si elle fut utilisée pour la première fois en 1982 par Michael D. Duncan, John Reintjes, et Thomas J. Manuccia[65], la diffusion Raman anti-Stokes cohérente (CARS) n'a pris son essor que récemment.

Dans la suite de ce chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement aux processus 2PEF et SHG dont les principes physiques ainsi que la mise en oeuvre pratique dans un microscope à balayage seront exposés. Enfin, nous insisterons sur la SHG du collagène.

2.2.1 Fluorescence sous excitation à deux photons

Principe

Les microscopes de fluorescence conventionnelle (1PEF) reposent sur l'absorption d'un photon dont l'énergie va faire passer le fluorophore de son état fondamental (S0) à un état électronique d'énergie supérieure dans un état vibrationnel excité. Pour que cette transition ait lieu, l'énergie du photon incident doit être supérieur à l'énergie de la transition moléculaire entre S0 et le premier niveau d'énergie excité, S1. Une fois dans cet état excité, la molécule va relaxer pour arriver au plan vibrationnel, puis vers son niveau fondamental S0, soit par l'émission d'un photon de fluorescence, soit par un effet non radiatif [fig.2.3]. Dans certain

cas, la molécule peut passer dans un état triplet, avant de retourner au niveau fondamental, et on parle alors de phosphorescence. La probabilité d'un fluorophore de réémettre un photon après excitation se nomme rendement quantique. Au final, l'intensité de fluorescence est proportionnelle à l'intensité du faisceau excitateur et à la concentration locale de fluorophores. Les chromophores utilisés habituellement en biologie s'excitent dans le proche UV ou le bleu alors que leur fluorescence est plutôt dans la partie verte à rouge du spectre.

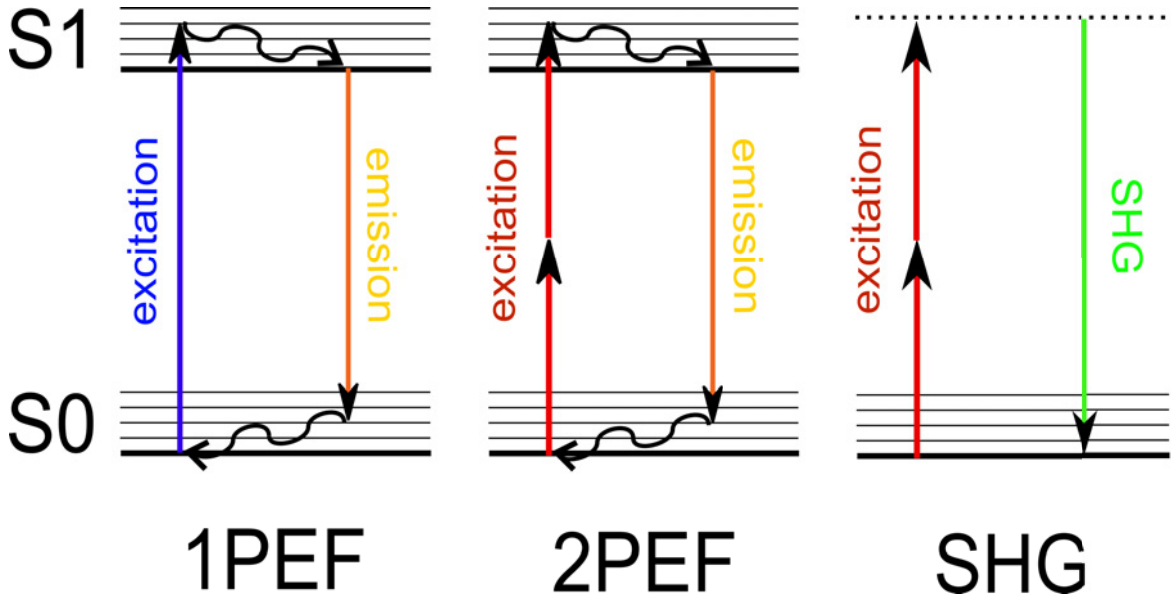


FIGURE 2.3 – Diagramme illustrant les différents processus de fluorescence et de génération d'harmoniques

Dans le cas de la fluorescence sous excitation à 2 photons, ce n'est pas un seul mais deux photons qui vont être absorbés simultanément par la molécule, chacun des deux photons apportant la moitié de l'énergie nécessaire à la transition électronique [fig.2.3]. Ce processus, décrit pour la première fois par Göppert-Mayer[66] en 1931, est amplement détaillé dans les livre de Shen[67] et Boyd[68]. Dans ce cas, le signal varie avec le carré de l'énergie incidente et de cette dépendance non-linéaire résulte le confinement de l'excitation au volume focal comme on peut le voir sur la figure 2.4. Le phénomène d'absorption à 2 photons est peu efficace et oblige à concentrer l'énergie temporellement, c'est à dire à utiliser des impulsions femtosecondes, pour augmenter l'intensité du signal tout en conservant une puissance moyenne compatible avec des échantillons biologiques.

La comparaison de la microscopie multiphoton avec la microscopie de fluorescence confo-

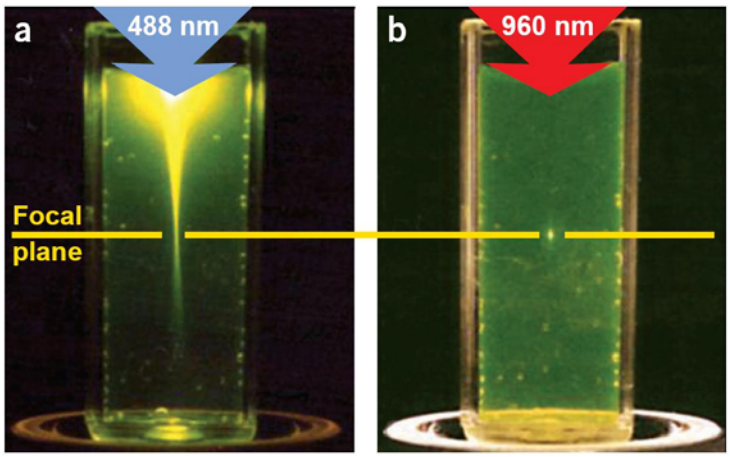


FIGURE 2.4 – Distribution spatiale de l'excitation dans le cas (a) d'une absorption à 1 photon et (b) dans le cas d'une absorption à 2 photons [source : Zipfel *et coll.* [69]]

cale est la suivante :

- **Résolution**

  La résolution tridimensionnelle de la microscopie confocale est obtenue en filtrant par un diaphragme les rayons provenant du point focal, alors que dans le cas de la microscopie multiphoton, la résolution tridimensionnelle provient directement du caractère non-linéaire du phénomène. Dans les 2 cas, la taille du volume focal est donnée par le carré de la réponse impulsionnelle de l'objectif. Les formules donnant la largeur totale à mi-hauteur du volume focal (pour une ouverture numérique inférieur à $0,8$) sont les suivantes :

  $$\Delta x_{3dB} \approx \frac{0,37\lambda}{NA} \; ; \; \Delta z_{3dB} \approx \frac{1,24n\lambda}{NA^2} \tag{2.1}$$

  où λ est la longueur d'onde de la lumière, n l'indice du milieu, NA l'ouverture numérique de l'objectif. Cependant les longueurs d'ondes utilisées en microscopie confocale sont environ deux fois plus petites et la résolution théorique est donc, à système équivalent deux fois meilleure. En pratique, dans le cas d'échantillons épais, pour collecter plus de photon et augmenter le rapport signal sur bruit, le rayon du diaphragme utilisé pour filtrer les photons est légèrement agrandi, ce qui réduit la résolution. Au final dans des échantillons épais, la résolution des 2 types de microscopie est équivalente.

- **Profondeur de pénétration**

  La profondeur de pénétration est altérée par 3 phénomènes : la diffusion, l'absorption

et les aberrations créées lors de la propagation de la lumière dans l'échantillon. Ces phénomènes affectent autant la lumière incidente que les photons de fluorescence émis par les fluorophores.

Du point de vue spectral, les fluorophores classiquement employés en biologie ou dans le domaine biomédical absorbent entre 350 et 600 nm. Dans le cas d'une excitation à 2 photons, les photons seront 2 fois moins énergétiques et par conséquent les longueurs d'ondes d'excitation à 2 photons sont située de 700 à 1200 nm.

L'utilisation de longueurs d'ondes décalées dans l'infrarouge procure un avantage. En effet, dans le régime de Rayleigh, la diffusion varie en $1/\lambda^4$, elle est donc plus faible dans l'infrarouge. De plus, il existe une fenêtre entre 800 nm et $1,3$ μm, dite fenêtre thérapeutique, pour laquelle l'absorption des tissus est minimale.

En microscopie multiphoton, la fluorescence ne provient que du point focal, on peut ainsi collecter tous les photons qu'ils aient été diffusés ou non. Au contraire en microscopie confocale, les photons provenant d'autres plans peuvent par diffusion être sélectionnés par le diaphragme confocal. Ils créent un bruit de fond de plus en plus intense à mesure que l'on pénètre plus profondément dans les tissus.

La microscopie multiphoton permet ainsi de pénétrer plus profondément dans les tissus, tout en conservant une bonne résolution tridimensionnelle. Il est difficile de donner des valeurs numériques car la profondeur de pénétration reste très dépendante des caractéristiques du tissu. Pour des tissus peu diffusants et peu absorbants, tels que la cornée ou le cerveau, il est possible d'atteindre des profondeurs de l'ordre du millimètre, alors que dans le rein il sera difficile de dépasser les 100 μm.

Il faut aussi souligner l'effort réalisé en instrumentation pour appliquer à la microscopie les techniques d'optique adaptative, développées pour les télescopes en astronomie. Ces techniques permettront à terme de limiter les aberrations créées par l'échantillon et de préserver la résolution des microscopes multiphoton à des profondeurs encore plus grandes.

– **Phototoxicité et photoblanchiment**

La phototoxicité provient principalement de la création d'espèces oxygénées réactives suite à un transfert d'énergie non radiatif d'un fluorophore vers une autre molécule. Ces radicaux libres peuvent provoquer rapidement la mort cellulaire en provoquant des réactions chimiques dommageables à la cellule. Afin de pouvoir observer des échantillons

vivants sur de longues durées, il faut veiller à utiliser une puissance d'excitation assez faible pour limiter la création de ces espèces très réactives. Comme une absorption multiphoton significative ne se produit que dans le volume focal, la phototoxicité sera restreinte à la zone observée alors qu'en microscopie confocale c'est tout le cône d'excitation qui est affecté. Les mêmes arguments sont valables pour le photoblanchiment, les effets thermiques, et les photodommages en général.

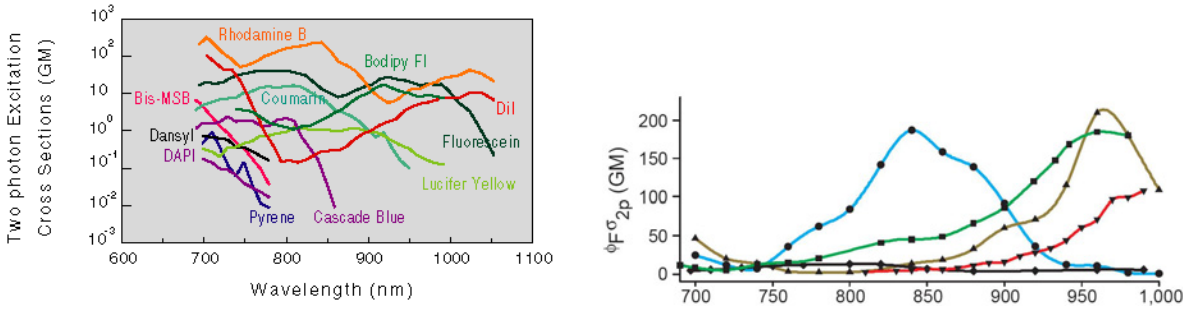
L'utilisation d'impulsions brèves implique des énergies crêtes élevées confinées sur une très faible surface. Au delà d'un certain seuil, l'intensité va provoquer la formation d'un plasma. Si en imagerie il est nécessaire d'éviter ce phénomène, il est possible d'en tirer parti pour faire de la micro-ablation[70]. Cette capacité étend encore les possiblités offertes par la microscopie multiphoton.

– **Diversité des modes de contrastes**

Un autre avantage de la microscopie multiphoton est la possibilité d'utiliser simultanément différents modes de contraste en particulier de combiner 2PEF et SHG. La fluorescence permet d'évaluer la concentration et la localisation de fluorophores exogènes ou endogènes. La génération de second harmonique quant à elle provient des structures denses non-centrosymétriques et permet de visualiser, entre autre, les fibres de collagène comme nous le verrons par la suite. Il faut noter qu'il existe bien d'autres modes de contrastes parfaitement compatibles avec la microscopie 2PEF et SHG, mais qui ne seront pas abordés dans ce manuscrit. Par exemple, la génération de troisième harmonique (THG) permet d'observer les interfaces et les inhomogénéités optiques submicrométriques[71]. La microscopie par diffusion cohérente anti-Stokes stimulés (CARS) est, quant à elle, sensible aux vibrations moléculaires et donc à l'espèce chimique.

Fluorophores exogènes

La microscopie de fluorescence a été initialement basée sur l'utilisation de fluorophores exogènes, tels que des fluorophores organiques (Alexa, Fluoresceine, ...), des protéines recombinées-GFP (GFP, CFP, YFP ...) ou encore des nanoparticules fluorescentes. Les spectres d'absorptions des principaux marqueurs exogènes sont donnés dans la figure 2.5.



(a) Fluorophores organiques (b) Protéines fluorescentes

FIGURE 2.5 – Sections efficaces d'excitation à deux photons : (a) de différents fluorophores organiques [source : Xu *et coll.*[72]] ; (b) de protéines fluorescentes : Vert - eGFP / Bleu - CFP / Rouge - DsRed / Noir - wtGFP [source : Zipfel *et coll.*[69]]

Fluorophores endogènes

Le souci d'être le moins invasif possible a conduit certains groupes de recherche à utiliser les fluorophores endogènes. Leur utilisation permet de s'affranchir de toute préparation des échantillons et rend la technique applicable directement sur n'importe quel échantillon *in vivo*. Ces fluorophores permettent d'obtenir des informations structurelles, morphologiques et fonctionnelles au niveau de la cellule ou du tissu. Mais pour différencier les fluorophores ou suivre des modifications spectroscopiques liées à un processus biologique, il est souvent nécessaire de combiner la microscopie multiphoton avec des techniques de spectroscopie[73]. Il faut toutefois noter que les spectres des fluorophores endogènes sont souvent large ce qui rend délicat une déconvolution fiable.

La fluorescence endogène provient principalement de trois familles de molécules : des dérivées d'acides aminés aromatiques (tryptophanes, tyrosine, phénylanaline), des dérivées de vitamines et des dérivés porphyriques. On peut trouver une liste des principales molécules avec leur longueur d'onde d'excitation et leur section efficace d'absorption à deux photons dans un article publié en 2003 par Zipfel *et coll.* [74]. Dans le cas de certaines molécules, les spectres d'absorption à deux photon n'ont pas encore été mesurés, il nous faut alors nous référer aux spectres d'absorption à un photon [fig.2.7]. Même si les spectres d'absorption à 2 photons ne sont pas simplement les spectres à 1 photon avec une échelle en longueur d'onde doublée, cela nous donne une première idée des positions des bandes d'absorption des différentes molécules. Quant aux spectre d'émission, ils sont généralement très proches.

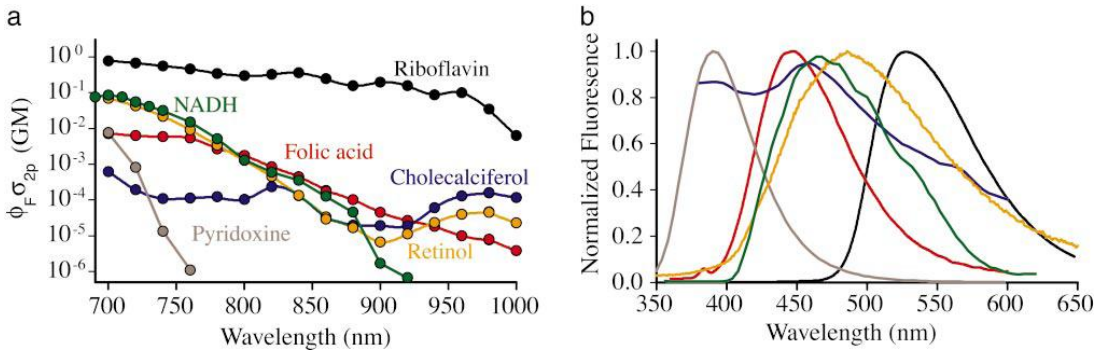
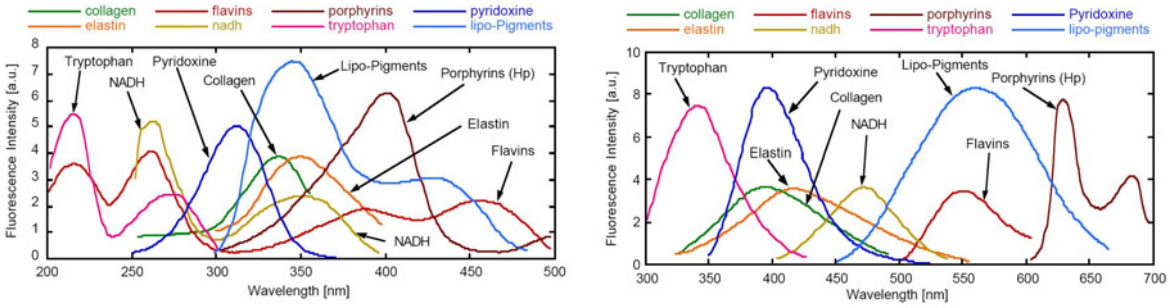


FIGURE 2.6 – (a) Section efficace de fluorescence (section efficace d'absorption multipliée par l'efficacité quantique) de six molécules responsables de la fluorescence sous excitation à deux photons intracellulaire [Unité : 1 GM (Göppert-Mayer)= 10^{-50} $cm^4 s$]. Les mesures ont été effectuées dans l'éthanol pour le rétinol et le cholécalciférol (vit. D) et dans une solution saline à pH 7,2 pour les autres molécules. (b) Spectres d'émission de fluorescence de ces mêmes molécules mesurées dans les mêmes conditions. [source : Zipfel *et coll.* [74]]



(a) Spectre d'absorption de molécules biologiques (b) Spectre d'émission de molécules biologiques

FIGURE 2.7 – Spectre d'absorption et d'émission à un photon de fluorophores endogènes [source : Wagnières *et coll.* [75]]

Un des principaux fluorophores au niveau cellulaire est le NAD(P)H : la nicotanamine adénine dinucléotide ou sa forme phosphatée. Ce cofacteur, dérivée de la vitamine PP, se trouve dans le cytoplasme et les mitochondries des cellules et sert au transfert des électrons pendant lors des réactions enzymatiques d'oxydo-réduction. Sa forme oxydée, le NAD+/NADP+, présente un très faible coefficient d'extinction molaire. Le NAD(P)H présente un pic d'émission à 460 nm pour une excitation à 2 photons optimale vers 710 nm [fig.2.6].

La riboflavine (vitamine B_2) et ces dérivés les cofacteurs FMN (flavine mononucléotide) et FAD (flavine adénine dinucléotide) catalysent de nombreuses réactions d'oxydoréduction et sont essentiels à la production d'énergie dans les cellules. Ces flavines ont une émission maximale vers 530 nm pour une excitation à 2 photons dans le même domaine spectral que le NADH, soit vers 700 nm [fig.2.6]. Comme seules les flavines oxydées et le NAD(P)H réduit sont fluorescents et que ces molécules ont des dynamiques opposées dans le cycle de l'énergie, elles forment un couple idéal pour servir d'indicateur métabolique[76].

La kératine est une protéine présente dans l'épiderme pour assurer son imperméabilité et sa solidité. C'est aussi le constituant de base des cheveux et des ongles. Dans une étude sur la spectroscopie sous excitation à 2 photons de la peau, nous avons montré que la kératine était responsable d'une partie de la fluorescence endogène de l'épiderme. Toutefois, son pic d'absorption à deux photons est en dessous de 700 nm, c'est à dire en dehors des longueurs d'ondes accessibles par le laser Ti :Sa[77], son excitation n'est donc pas optimale.

La fluorescence endogène extracellulaire est essentiellement du à l'élastine et au collagène. L'élastine, principal constituant des fibres ou lames élastiques, donne leur élasticité aux tissus. On en trouve, par exemple, dans la paroi des vaisseaux, la peau, ou les poumons. La fluorescence de l'élastine provient des liaisons covalentes entre les différentes molécules, ces liaisons covalentes étant des dérivés de la vitamine B6. L'élastine, qui a une absorption dans l'UV à un photon, est excitée de façon optimale entre 700 et 750 nm avec un laser Ti :Sa pour une émission aux alentours de $450 - 500$ nm.

Le spectre du collagène, légèrement décalé vers l'UV par rapport à celui de l'élastine, provient lui aussi des liaisons covalentes entre les molécules de collagène. Comme les fibres de collagène produisent un fort signal de SHG, bien plus intense que celui de sa fluorescence[78] excitée entre 700 et 990 nm, la visualisation du collagène fibrillaire se fait généralement par microscopie de génération de second harmonique.

2.2.2 Génération de second harmonique

Principe

La génération de second harmonique est un processus cohérent du deuxième ordre, où par diffusion non-linéaire un faisceau incident de longueur d'onde ω donne naissance à un faisceau de fréquence harmonique 2ω. Au niveau moléculaire, ce processus est lié à l'oscillation d'électrons polarisables dans un puits de potentiel anharmonique. Au niveau macromoléculaire, les champs électriques des différents dipôles induits vont interférer. Ainsi, pour obtenir un important signal de second harmonique, l'organisation tridimensionnelle des différentes molécules à l'échelle du volume focale est déterminante.

Niveau Moléculaire

Considérons un électron d'une molécule isolée, le modèle atomique de Lorentz traite le potentiel dans lequel il évolue comme un potentiel d'oscillateur harmonique. Lorsqu'une onde électromagnétique va interagir avec l'électron, celui-ci se met à osciller. Pour un puits harmonique, la fréquence d'oscillation de l'électron, donc la fréquence de l'onde rayonnée par cette oscillation, est la même que celle de la lumière d'excitation : c'est la diffusion Rayleigh[79].

Dans le cas réel, ce potentiel n'est pas parfaitement parabolique [fig.2.8] et on peut observer la création de fréquences harmoniques de la fréquence d'excitation : c'est le processus de génération d'harmoniques. Les paramètres locaux du puits de potentiel ainsi que l'amplitude, la fréquence et la polarisation du champ excitateur vont déterminer le mouvement du nuage d'électrons et produire plus ou moins efficacement des ondes aux fréquences ω, 2ω, 3ω, 4ω, ... Dans le cas où le potentiel est symétrique, son développement en série de Taylor annule tous les termes impairs, ce qui implique que seules les harmonique multiples impaires de la longueur d'onde seront générés. Pratiquement cela veut dire qu'une molécule centrosymétrique ne pourra pas générer de second harmonique.

$$\vec{p} = [\alpha]\,\vec{E} + [\beta]\,\vec{E}\vec{E} + [\gamma]\,\vec{E}\vec{E}\vec{E} + ... \tag{2.2}$$

où α désigne la polarisabilité linéaire, β et γ les hyperpolarisabilités du premier et second ordre (tenseur de rang 3 et 4 respectivement). avec

$$\vec{E} = \vec{E_0}e^{-i\omega t} + cc \tag{2.3}$$

où ω est la pulsation de l'onde electromagnétique et cc le complexe conjugué

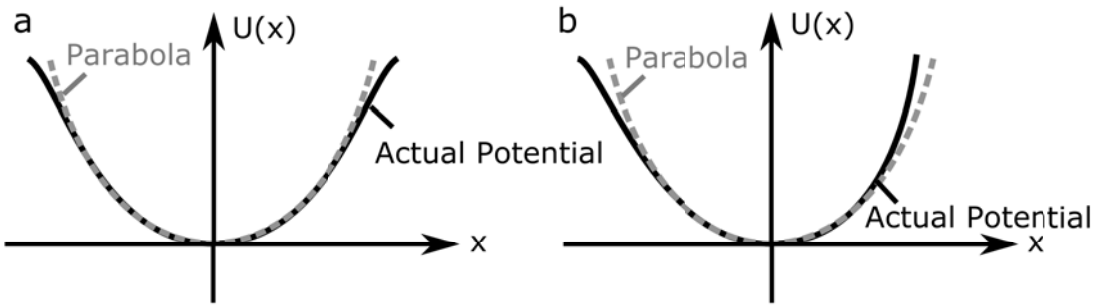


FIGURE 2.8 – Fonction énergie potentielle pour un système (a) centrosymmétrique (b) non-centrosymétrique

Niveau Macro-moléculaire

Considérons cette fois, deux molécules non-centrosymétriques, situées à une distance petite par rapport à la longueur d'onde incidente, de façon à ce que l'on puisse considérer qu'elles voient la même onde : même intensité, même phase. Si elles sont alignées parallèlement et dans la même direction [fig.2.9(b)], la polarisation d'ordre 2, $p^{(\vec{2})}$, sera la même pour les 2 molécules :

$$p^{(\vec{2})}(2\omega) = [\beta]\,\vec{E}(\omega)\vec{E}(\omega) \tag{2.4}$$

Le champ à 2ω, diffusé par chacun des dipôles induits à 2ω, sera donc le même, et le champ total le double de celui d'un dipôle unique. L'intensité diffusée étant le carré du champ, on obtient ainsi un facteur 4 par rapport au cas d'une seule molécule [fig.2.9(a)].

Par contre si l'on considère le cas défavorable, où les 2 molécules sont parallèles mais de sens opposé, les polarisations induites seront de signe opposé, et les champs émis à 2ω en opposition de phase : leur somme sera alors nulle [fig.2.9(c)].

La situation la plus courante en microscopie multiphoton n'est pas celle où l'on regarde une molécule unique, mais celle où tout un ensemble de molécules sont présentes dans le volume focal. Leur nombre, leur répartition et leur direction respectives vont être déterminants dans le processus de génération de second harmonique. Si les molécules ont des orientations aléatoires les unes par rapport aux autres, la partie cohérente des signaux harmoniques va s'annuler et il ne restera qu'une somme incohérente de l'intensité de second harmonique qui varie linéairement avec le nombre de molécules présentes dans le volume focal. Dans ce cas, on ne parlera pas de génération de second harmonique mais de diffusion hyper-Rayleigh. C'est

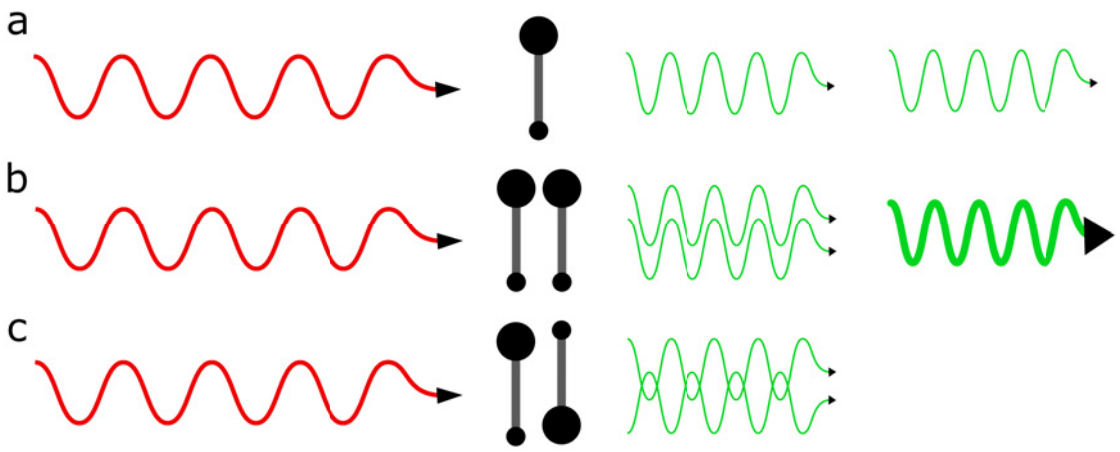


FIGURE 2.9 – Diffusion de second harmonique pour (a) une molécule unique (b) 2 molécules parallèles (3) 2 molécules anti-parallèles

uniquement lorsque les molécules sont organisées les unes par rapport aux autres de façon à ce que les champs diffusés par les différentes molécules s'additionnent de façon cohérente, que l'on parle de génération de second harmonique. Le signal dépend alors du carré du nombre de molécules.

Il faut noter que le rayonnement SHG ne sera pas émis de manière isotrope. Chaque dipôle induit dans le volume focal va rayonner de manière anisotrope. Leur répartition et leur orientation dans le volume focal va créer des interférences constructives dans certaines directions et destructives dans d'autres. Pour des raisons d'accord de phase entre le faisceau incident et le faisceau harmonique, la longueur de cohérence est plus longue dans le sens de propagation du faisceau excitateur, ce qui rend en général la génération de second harmonique plus efficace vers l'avant.

Sources endogènes et exogènes

Comme nous venons de le voir, la génération de second harmonique repose sur 3 critères : une molécule avec une polarisabilité du second ordre élevée, une grande densité de molécules dans le volume focal et une organisation de ces molécules adéquate. De fait, peu d'entités biologiques présentent ces caractéristiques.

Les microtubules sont observables par microscopie SHG[80;81] ; toutefois pour que le si-

gnal soit assez intense pour être détecté, il faut que ces microtubules soient alignés comme au moment de la mitose par exemple. Les fibres musculaires et plus précisément les filaments de myosine consituent également une source de signal SHG endogène. D'un point de vue morphologique, ces derniers font partie du sarcomère, unité contractile fondamentale du muscle[80;82;83]. Leur distribution dans une fibre musculaire fait apparaître une alternance de bandes sombres et brillantes qui permet de mesurer la longueur des sarcomères avec une précision de 20 nm[84]. Cette précision permet d'étudier la dynamique de contraction musculaire par microscopie SHG[85] et de réaliser de l'imagerie fonctionnelle sur le muscle squelettique[86]. Chez les végétaux, les arrangements quasi-cristallins d'amidon génèrent très efficacement un signal de second harmonique[87].

Néanmois, la plus importante source de second harmonique dans les tissus reste le collagène fibrillaire, protéine majeure de la matrice extracellulaire. Ce signal de SHG a été mis en évidence par Freund et Roth en 1979 dans des études réalisées sur des tendons de queue de rat[2]. Toutefois, il n'a été véritablement exploité que depuis la mise au point de la microscopie multiphoton à balayage. Nous reviendrons plus en détail sur l'origine et les caractéristiques de ce signal dans le chapitre 2.3.

Enfin, il est également possible d'avoir recours à des harmonophores exogènes développés pour la microscopie SHG. Il s'agit principalement de sondes du potentiel électrique membranaire[88;89;90;91]. La difficulté mais aussi l'intérêt d'avoir recours à ce type de sondes est qu'il n'est possible de générer un signal de second harmonique que si les molécules exogènes s'insèrent de façon unidirectionnelle dans la membrane cellulaire.

2.2.3 Montage expérimental

Pour les études menées au cours de ce travail, nous utilisons un microscope droit à balayage non commercial qui a été conçu par Emmanuel Beaurepaire. Un schéma de notre microscope est donné sur la figure 2.11 : une source laser dont l'intensité est modulable grâce à un atténuateur, va être défléchie par des miroirs galvanométriques. La variation de l'angle d'incidence du faisceau sur la pupille arrière de l'objectif permet de déplacer le point de focalisation du laser dans l'échantillon. Pour une position du spot laser donnée, les signaux de fluorescence sous excitation à deux photons et de génération de second harmonique sont collectés, soit en transmission, soit en épidétection. Une image est alors réalisée en balayant point par point la

zone d'intérêt. L'ensemble du système est commandé par un logiciel développé au laboratoire sous `Labview`. Plus précisément, le montage expérimental comporte les éléments suivants :

Laser Le système est basé sur un laser femtosceconde Titane :Sapphire (Tsunami pompé par un Millenia 5 W, Spectra-Physics) accordable dans une gamme de longueurs d'onde allant de 700 à 990 nm. Les impulsions délivrées en sortie du laser avec un taux de répétition de 82 MHz posèdent une largeur temporelle d'environ 130 fs . L'énergie moyenne en sortie de laser varie entre 500 mW à 700 nm et 150 mW à 970 nm, en passant par 1 W à son maximum vers 790 nm [fig.2.10]. Le diamètre du faisceau à $1/e^2$ en sortie du laser est inférieur à 2 mm pour un angle total de déviation inférieur à 1 $mrad$.

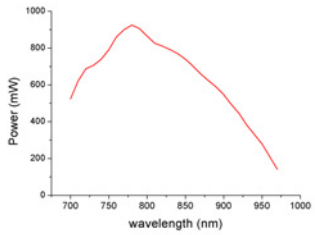


FIGURE 2.10 – Puissance Moyenne en sortie de la cavité laser (Tsunami pompé par un Millenia 5 W, Spectra-Physics) en fonction de la longueur d'onde

Atténuation L'intensité du laser au niveau de l'échantillon est modulée par un prisme de Glan couplé à une lame demi-onde dont la rotation est motorisée. La lame demi-onde change la direction de la polarisation du laser et modifie la part du faisceau transmise par le prisme de glan. Celui-ci est positionné pour qu'une polarisation incidente parallèle à un axe neutre du cristal soit totalement réfléchie.

Ce système permet une extinction totale du faisceau pour toutes les longueurs d'onde mais pas une transmission totale (100%) sauf à 860 nm (la longueur d'onde pour laquelle est taillée la lame demi-onde).

Obturateur Un obturateur mécanique bloque le faisceau et ne s'ouvre que le temps de l'acquisition d'une image pour limiter les photodommages et le photoblanchiment et ainsi mieux préserver l'échantillon étudié.

Balayage Des miroirs placés sur des moteurs galvanométriques (GSI-Lumonics Mini Sax) permettent de défléchir le faisceau laser. En modifiant l'angle d'incidence du faisceau

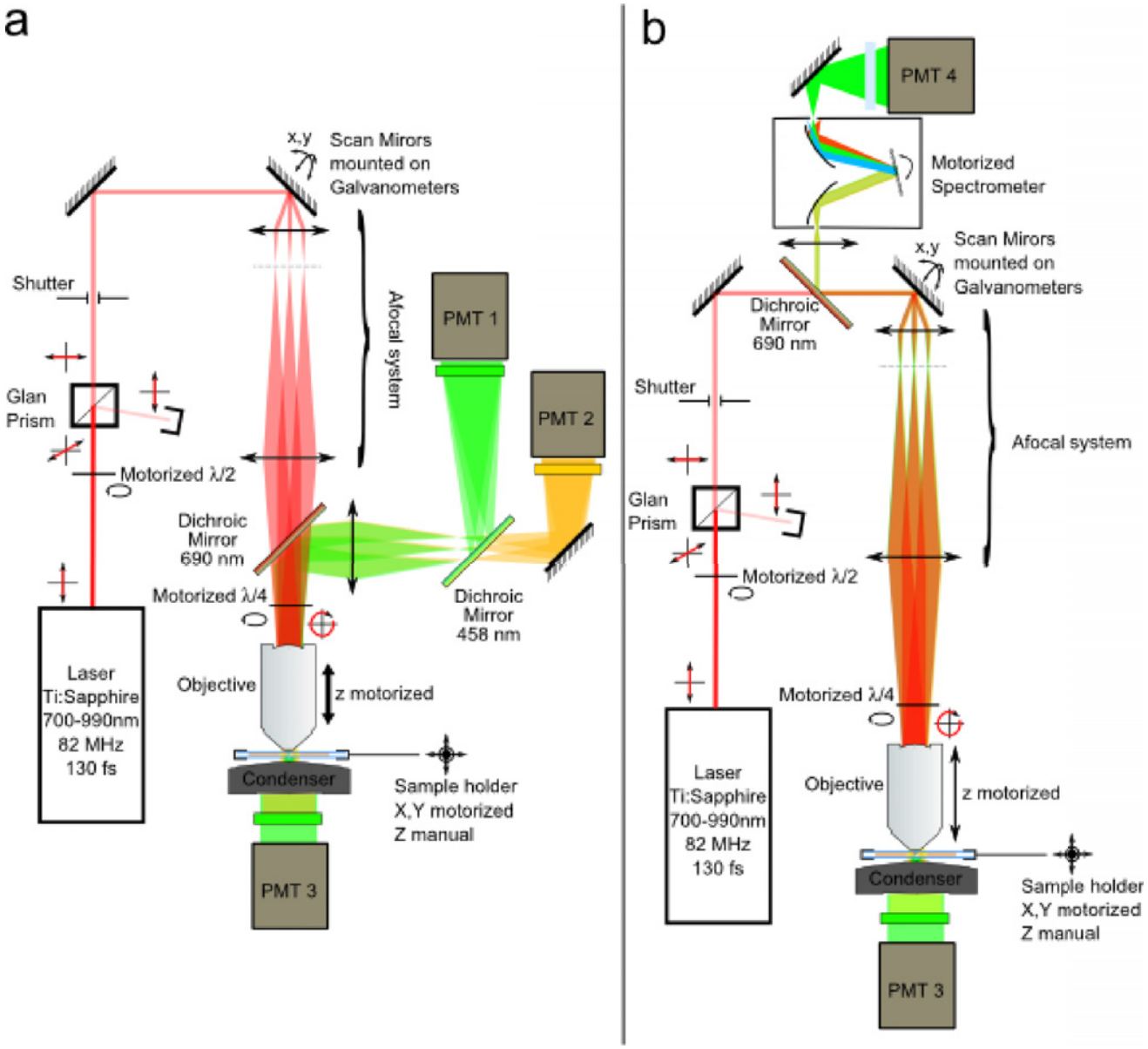


FIGURE 2.11 – Schéma du microscope multiphoton à balayage - Les états de polarisation sont indiqués à côté du faisceau : (a) Montage usuel (b) Montage avec un module de détection résolu spectralement

sur la pupille arrière de l'objectif, ils permettent de changer la position où le faisceau sera focalisé et de balayer l'échantillon. L'angle de déviation maximum des miroirs est de $\pm 22°$.

Système Afocal Un système afocal augmente le diamètre du faisceau laser pour couvrir toute la pupille de l'objectif et obtenir une résolution maximale. Comme le grandissement angulaire est l'inverse du grandissement transverse, il faut trouver un compromis entre résolution et champ de vue. Pour que le faisceau reste toujours centré sur la pupille arrière de l'objectif, celle-ci est conjuguée avec les miroirs de balayage par le système afocal.

Dans notre cas le système afocal augmente la taille du faisceau d'un facteur 7 pour couvrir les 2 cm de diamètre de la pupille arière de l'objectif Olympus XLUMPFL 20x W/IR 0,95NA. Nous obtenons alors un champ de vue de 512×512 μm^2.

Polarisation Une lame quart d'onde, placée avant l'objectif, permet de modifier la polarisation du laser et de la rendre circulaire. Ce type de polarisation permet de s'affranchir en partie de la dépendance en polarisation de la génération de second harmonique. La lame quart d'onde peut être combinée avec une lame demi-onde pour étudier les effets de la polarisation incidente sur la SHG.

Objectif Le faisceau est focalisé sur l'échantillon par un objectif. Pour des échantillons biologiques épais, les objectifs à immersion et à grande distance de travail sont privilégiés. Pour un effet non-linéaire efficace l'objectif doit avoir une grande ouverture numérique, typiquement supérieure à $0,6$. Enfin les objectifs pour la microscopie multiphoton doivent être corrigés du chromatisme et être transparent jusqu'à des longueurs d'onde de 1 μm.

L'objectif que nous utilisons habituellement est un Olympus XLUMPFL 20x W/IR 0,95NA dont la distance de travail est de 2 mm. Cet objectif sera utilisé dans toutes les expériences présentées par la suite sauf mention contraire. Sa particularité est de posséder une grande ouverture numérique qui permet d'avoir une résolution FWHM axiale de $1,6$ μm et latérale de 410 nm pour une longueur d'onde d'excitation de 860 nm, combinée avec un faible grandissement qui permet d'avoir un grand champ de vue et de collecter très efficacement les signaux de fluorescence et de SHG.

La position axiale de focalisation dans l'échantillon est contrôlée grâce à un moteur

(Physik Instrumente M-126 DG) qui déplace l'objectif. Son pas minimal de déplacement selon l'axe Z est de $0,2\ \mu m$.

Déplacement de l'échantillon En plus du dispositif de balayage du faisceau laser, nous disposons d'une platine porte-échantillon motororisée. Le déplacement s'effectue à l'aide de micro-positionneur (Physik Instrumente M-111.1 DG) et permet de réaliser des mosaïques d'images pour acquérir des champs de vue allant jusqu'à $1,2 \times 1,2\ cm^2$.

Détection – Mode Image [fig.2.11(a)]

Le microscope possède trois voies de détection, une voie en transmission utilisable lorsque l'échantillon n'est pas trop épais ou trop diffusant, et deux voies en épidétection. La voie en transmission collecte la fluorescence et la SHG grâce à un condenseur positionné au plus près de l'échantillon. Les filtres positionnés en amont du détecteur sélectionnent l'un ou l'autre des deux signaux. Comme l'émission de SHG est souvent plus intense en transmission qu'en épidétection, il est avantageux, quand cela est possible, de mesurer le signal SHG sur cette voie.

Un filtre dichroïque (Chroma 695 DCXRU), situé juste après l'objectif pour améliorer la collection du système, réfléchit les photons en dessous de 690 nm vers les 2 canaux en épidétection. Il permet ainsi de séparer le signal émis par l'échantillon de l'excitation réfléchi par celui-ci. Un deuxième miroir dichroïque sépare le signal SHG de l'émission de fluorescence et permet de mesurer ces 2 signaux simultanément. Pour améliorer la spécificité de chacune des voies, des filtres spécifiques à chaque signal sont placés devant chacun des photomultiplicateurs. Pour assurer une collection maximale des photons, la pupille du système est conjuguée sur chacun des détecteurs par une lentille convexe. Nous avons privilégié ce mode de détection car c'est celui utilisé pour la microscopie *in vivo in situ*, où l'épidétection est la seule possibilité.

Dans la plupart des expériences présentées dans ce manuscrit, nous utilisons une excitation à 860 nm et les deux canaux en épidetection. La séparation entre les 2 signaux est réalisée par un filtre dichroïque (SemRock BrightLine F458-Di01) à 458 nm puisque la génération de second harmonique est alors centré à 430 nm. Un filtre passe-bande interférentiel (Chroma HQ430/20) centré à 430 nm combiné à un filtre passe-bas (Chroma E700SP-2P) à 700 nm, sélectionnent le second harmonique et permet de s'affranchir du rayonnement laser réfléchi résiduel. Sur l'autre voie, le même filtre (Chroma E700SP-2P) atténue le laser, tandis que deux filtres colorés

(Schott GG455) de 2 mm d'épaisseur sélectionne la partie du spectre supérieure de 455 nm, c'est à dire la fluorescence. La détectivité de ces deux voies sera détaillée plus loins (cf. [fig.2.12]). C'est cette configuration qui sera utilisée par la suite, sauf mention contraire.

– **Mode Image & Spectre** [fig.2.11(b)]

Dans cette configuration, nous sommes en mesure de sélectionner une partie précise du spectre émis par l'échantillon ce qui nous permet de réaliser des images résolues spectralement.

Le miroir dichroïque séparant le signal réémis par l'échantillon de l'excitation du laser est cette fois positionné juste avant les miroirs de balayage. Il est préférable de le positionner le plus près possible des miroirs de balayage pour une meilleure collection. Le faisceau réémis subi la déflection inverse du laser incident, en se réfléchissant sur les miroirs galvanométriques. La position et la direction du faisceau sont alors constantes et son spectre peut être analysé par un monochromateur (Jobin-Yvon, H10 Vis, 1200$trouts/mm$). Les signaux avec lesquels nous travaillons sont peu intenses et pour améliorer le rapport signal sur bruit, les fentes du monochromateur sont ouvertes au maximum. La résolution spectrale n'est alors plus que de 10 nm sur une plage allant de 350 nm à 600 nm avec une détectivité qui sera détaillée plus loin (cf. [fig.2.13]).

Photomultiplicateurs Nous utilisons 2 types de photomultiplicateurs comme détecteurs. Ceux de la voie en transmission (Electron Tubes, P25PC03, bialkali) et de la voie SHG en épidétection (Electron Tubes, P25PC08, bialkali) sont sensibles sur une bande allant de 300 nm à 550 nm, alors que ceux de la voie du spectromètre (Electron Tubes, P25PC13, bialkali green-enhanced) et de la voie de fluorescence en épidetection (Electron Tubes, P25PC13, bialkali green-enhanced) sont sensibles jusqu'à 600 nm.

Les photomultiplicateurs incluent un module de comptage de photon et fonctionnent à une fréquence de 100MHz, supérieure au taux de répétition du laser afin de compter chaque photon. Pour rester dans le domaine du comptage de photon, le taux de comptage doit typiquement être inférieur à 1 photon pour 5 impulsions laser. L'électronique d'acquisition intègre le nombre de photon détecté pour chaque pixel durant 10μs, soit une fréquence pixel typique de 100 kHz. Cette fréquence est un bon compromis entre le rapport signal sur bruit et la rapidité d'acquisition : il faut alors $3,9$ s pour acquérir une image de 512 par 512 pixels. Le système peut cependant fonctionner jusqu'à 400 kHz

pour suivre des processus rapides, ou 1 kHz pour intégrer le signal plus longtemps lorsque les signaux à détecter sont faibles.

Interface Le système est commandé par un programme d'acquisition développé sous LabVIEW (LabVIEW 6 National Instruments) au sein du laboratoire. Il permet de contrôler tous les éléments du microscope, de synchroniser les différents modules et d'acquérir jusqu'à deux canaux simultanément dans sa version actuelle.

2.2.4 Détectivité des canaux SHG et 2PEF

Pour la quantification de la fibrose rénale, principale application de ce travail de thèse, nous nous sommes placés à une excitation de 860 nm. La fluorescence et le signal SHG sont mesurés en épidétection (2.2.3). Dans ce cas, nous pouvons calculer la détectivité spectrale de chacune des voies en multipliant la détectivité de chacun des filtres qui les composent. La réponse spectrale de ceux-ci est soit mesurée directement, quand cela est possible grâce à un spectrophotomètre commercial(Cary UV-Vis-NIR Varian), soit connue à partir des spécifications du constructeur.

Pour la fluorescence, la succession de filtres est la suivante :

- réflexion sur un filtre dichroïque Chroma 695 DCXRU (spécification)
- transmission par un filtre dichroïque SemRock BrightLine F458-Di01 (spécification)
- transmission à travers un filtre passe-bas Chroma E700SP-2P (mesuré)
- transmission à travers un filtre passe-haut, 2×2 mm de verre coloré Schott GG455 (mesuré)
- détection par le photomultiplicateur Electron Tubes, P25PC13, bialkali green-enhanced (spécification)

ET pour la génération de second harmonique :

- réflexion sur un filtre dichroïque Chroma 695 DCXRU(spécification)
- réflexion sur un filtre dichroïque SemRock BrightLine F458-Di01(spécification)
- transmission à travers un filtre passe-bas Chroma E700SP-2P(mesuré)
- transmission à travers un filtre passe-bande Chroma HQ430/20(mesuré)
- détection par le photomultiplicateur Electron Tubes, P25PC08, bialkali(spécification)

On obtient alors les courbes de détectivité spectrale tracées dans la figure 2.12. En théorie il faudrait rajouter à cette liste la réponse spectrale de l'objectif et celle des miroirs en argent

servant à dévier le faisceau jusqu'aux détecteurs. Dans le cas des miroirs en argent, leur réponse est plate sur la plage qui nous intéresse. Quant à l'objectif sa transmission chute en dessous de 350 nm, mais varie peu sur le reste du spectre, car il a été conçu pour le rayonnement infrarouge.

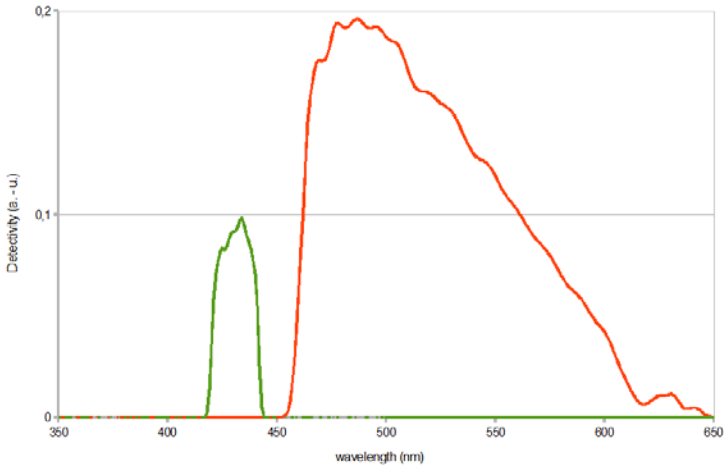


FIGURE 2.12 – Detectivité calculée en épidétection à partir des spectres des filtres, des dichroïques et de la détectivité des photomuliplicateurs : Canal SHG (vert) et Canal Fluorescence (Rouge) pour une excitation à 860 nm. C'est cette configuration qui sera utilisée par la suite, sauf mention contraire

2.2.5 Détectivité du canal spectral

Lors de notre étude sur la fibrose rénale, le canal de détection résolu spectralement nous a notamment permis de mesurer les spectres de fluorescence endogène. Dans le cas d'expériences menées avec des marqueurs exogènes, ce canal nous sert aussi à vérifier que le signal de fluorescence détecté provient bien du fluorophore exogène étudié et non pas de fluorophores endogènes. Enfin, cette voie permet de distinguer un signal de génération de second harmonique d'un signal de fluorescence lorsqu'il existe un doute sur l'origine du signal.

La réponse spectrale de cette voie a été déterminée à l'aide d'une lampe calibrée (Quartz Tungsten Halogen, Lamp standars of spectral irradiance, Oriel Instruments) dont l'intensité émise en fonction de la longueur d'onde est connue. La lumière provenant de cette lampe placée au niveau de l'échantillon traverse tous les éléments optiques jusqu'au détecteur du canal spectral. La mesure de l'intensité lumineuse sur le photomultiplicateur permet alors de

déduire la détectivité de la voie spectrale [fig.2.13].

Pour un profil fréquentiel gaussien et une phase spectrale linéaire, la largeur spectrale de l'impulsion doublée est $\sqrt{2}$ fois plus petite que celle de l'impulsion d'origine :

$$\Delta\lambda_{2\omega} = \frac{1}{\sqrt{2}}\Delta\lambda_{\omega} \tag{2.5}$$

où $\Delta\lambda_{2\omega}$ et $\Delta\lambda_{\omega}$ sont respectivement les largeurs spectrales de l'impulsion doublée et de l'impulsion incidente.

Il suffit alors de connaître la largeur spectrale de l'impulsion incidente et de connaître la largeur de l'impulsion doublée donnée par le spectromètre pour en connaitre la résolution. En effet, en considérant que la résolution du spectromètre a une forme gaussienne la formule suivante s'applique :

$$\Delta\lambda_{spectro} = \sqrt{\Delta^2\lambda_{2\omega,mesuree} - \Delta^2\lambda_{2\omega,theorique}} \tag{2.6}$$

où $\Delta\lambda_{2\omega,mesuree}$ et $\Delta\lambda_{2\omega,theorique}$ sont respectivement les largeurs spectrales de l'impulsion doublée mesuré par le spectromètre et calculée. $\Delta\lambda_{spectro}$ est la résolution du spectromètre. Nous obtenons alors une résolution de 10 nm environ.

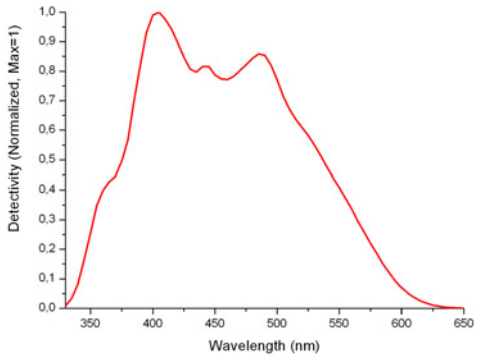


FIGURE 2.13 – Détectivité du canal résolu spectralement mesurée à l'aide d'une lampe spectrale calibrée ; la résolution spectrale est quant à elle de 10 nm

Cette résolution médiocre est due à la largeur des fentes que nous utilisons sur le spectromètre. En fait, nous avons choisi volontairement de dégrader la résolution pour améliorer le rapport signal sur bruit. Comme les spectres de fluorescence que nous mesurons sont souvent

très larges (plus de 100 nm à mi-hauteur), nous ne sommes pas gênés par ce manque relatif de résolution.

2.3 Signal de second harmonique du collagène

La génération de second harmonique par le collagène pose tout d'abord des problèmes de vocabulaire. En effet, la théorie a été construite pour des cristaux non-linéaires composés de petites molécules. La réponse non-linéaire microscopique du second ordre associée à une molécule se dénomme l'hyperpolarisabilité, notée β. A partir des tenseurs des molécules et de leur arrangement dans le cristal, il est possible de définir une réponse macroscopique, la susceptibilité, notée $\chi^{(2)}$, qui est une moyenne du tenseur β sur un ensemble de molécules. Comme la molécule de collagène a une longueur d'environ 300 nm, sa taille n'est pas négligeable devant la longueur d'onde et on ne peut plus rigoureusement parler de β. D'après les données que nous possédons à ce jour, c'est le domaine en triple hélice qui est responsable de la génération de second harmonique. Il est peu probable que la délocalisation des électrons se fasse sur toute la longueur de la molécule. Comme la triple hélice présente une structure répétitive, il est tentant de définir un tenseur non-linéaire relatif à une sous-partie de la triple hélice : un triplet $\mathrm{Gly}-\mathrm{X}-\mathrm{Y}$ ou bien un pas de l'hélice.

Le tenseur macroscopique est lui aussi mal défini. D'une part la façon dont les molécules de collagène s'assemblent entre elles pour former des fibrilles n'est pas parfaitement connue, plusieurs modèles coexistent : structures quasi-cristalline, enroulement en supra-hélice, ... Ensuite, il faudrait que l'arrangement des molécules de collagène à une échelle encore petite devant la longueur d'onde soit toujours le même. Or, il existe une variabilité à la fois inter et intra tissulaire de la taille et d'organisation des fibrilles. La cornée est par exemple constituée de petites fibrilles d'un diamètre de 35 nm espacées d'environ 50 à 80 nm, tandis que le tendon est formé de fibrilles d'un diamètre de quelques centaines de nanomètres et que dans la peau, les tailles des fibres sont très variables.

En résumé, il faudrait connaître la position et l'orientation de la sous-unité du collagène responsable du signal SHG à toutes les échelles jusqu'à la taille du volume focal, c'est à dire environ 2 μm, pour pouvoir interpréter totalement le signal SHG du collagène, tâche extrêmement ardue. Toutefois, des modèles simplifiés nous permettent déjà d'appréhender certaines caractéristiques de la génération de second harmonique par le collagène.

2.3.1 Type de collagène et signal SHG

Comme nous l'avons dit précédemment, la partie de la molécule de collagène responsable de la génération de second harmonique est très certainement son domaine en triple hélice. Ainsi, comme cette triple hélice est le point commun de toutes les protéines de la famille des collagènes, tous les types de collagène devraient générer du signal de second harmonique. Des travaux menés antérieurement par Pena *et coll.* ont d'ailleurs démontré que les molécules de collagène de type I et celles de type IV présentaient des signaux non-linéaires du même ordre de grandeur[92] lorsqu'ils étaient agencés sous forme de film mince. Cependant l'organisation tridimensionnelle des molécules de collagène est elle aussi très importante pour que les champs rayonnés par les différents dipôles interfèrent constructivement. Or il existe deux principales sous-familles de collagène, les collagènes fibrillaires (type I,II,III,V,...) et les collagènes qui forment les membranes basales (types IV,...). Pour mesurer l'efficacité à produire un signal SHG de ces deux sous-familles de collagène, nous avons réalisé des marquages immunohistochimiques du collagène I et du collagène IV sur des coupes sériées de rein de souris (7 μm) congelées et fixées à l'acétone pendant 7 minutes. Après avoir été séchées, les coupes ont été lavées avec du PBS puis trempées dans du PBS-BSA 1% pendant 15 minutes. Les coupes ont ensuite été mises en contact avec un premier anticorps et incubée à température ambiante pendant 1h30. L'anticorps primaire est un anticorps polyclonal de lapin anti-collagen I (Chemicon AB765P dilué à 1/100) ou anti-collagen IV (Chemicon AB756P dilué à 1/200) selon le marquage voulu. Les coupes qui n'ont pas été marquées par l'anticorps primaire servent de contrôle pour évaluer le niveau de la fluorescence endogène et du marquage non spécifique. Après avoir préalablement lavé les différentes coupes avec du PBS - BSA 1%, l'anticorps secondaire a été appliqué pendant 30 minutes à température ambiante. Celui-ci est un anticorps de chèvre anti-lapin couplé à de la fluorescéine (Vector Laboratories FI-1000 dilué à 1/200). Après 3 lavages dans du PBS, les coupes ont été montées entre lame et lamelle avec un milieu de montage adapté à la fluorescence (VECTASHIELD Mounting Medium, Vector Laboratories).

L'étude de chacune de ces coupes par microscopie multiphoton a montré que le signal de SHG était seulement colocalisé avec le signal de fluorescence provenant du marquage anti-collagène I [fig.2.14]. Ce résultat était attendu car l'organisation du collagène IV dans les membranes basales est moins dense que celle des collagènes fibrillaires et surtout les molé-

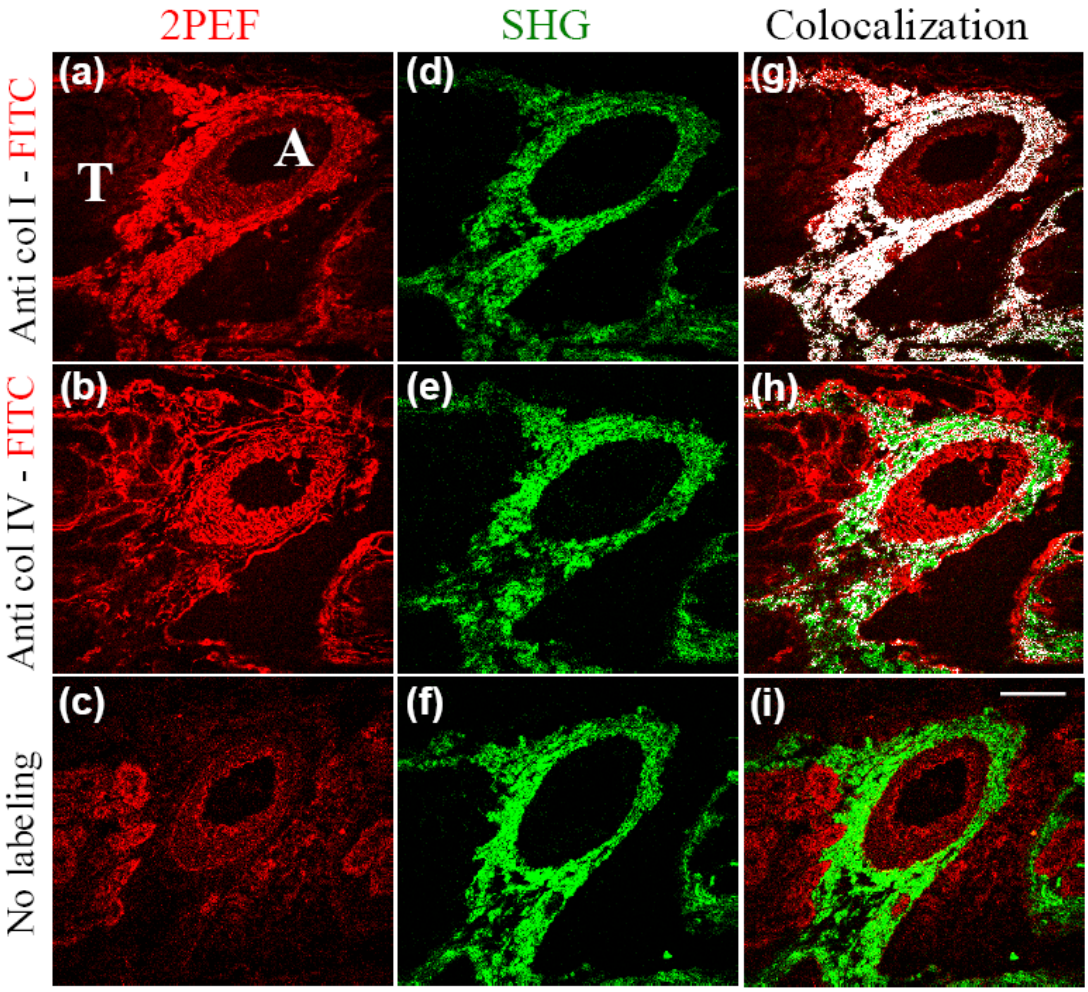


FIGURE 2.14 – Comparaison entre la SHG et le marquage immunohistochimique du collagène I ou IV sur des cryo-sections ($4,5\ \mu m$) sériées de rein de souris. (A) Artères (T) Tubules. (a-c) Signal 2PEF : (a) anticorps anti-collagène I couplés au FITC (b) anticorps anti-collagène IV couplés au FITC (c) Fluorescence endogène. (d-f) Signal SHG. (g-h) Colocalisation (blanc) du signal 2PEF (rouge) avec la SHG (vert) (i) Superposition de (c) et (f) montrant la distribution du signal endogène ; Conditions d'excitation : 25 mW à 800 nm, objectif 20x 0.9 NA ; barre d'échelle : 100 μm

cules s'organisent de façon centrosymétrique. La différence observée entre les collagènes I et IV ne se situe donc pas au niveau moléculaire, mais plutôt au niveau de leur organisation macromoléculaire qui détermine leur efficacité à générer un signal de second harmonique. La principale similitude moléculaire entre le collagène IV et le collagène I est le domaine en triple hélice qui est présent dans tous les collagène. Si c'est le domaine en triple hélice qui est responsable au niveau moléculaire de la génération de second harmonique et que l'organisation macromoléculaire détermine l'efficacité de l'effet non-linéaire pour la microscopie, le signal SHG généré par le collagène est spécifique des collagènes fibrillaires.

2.3.2 Modèlisation de la génération de second harmonique du collagène

Le modèle le plus ancien a été proposé par Freund *et coll.* [2;93;94;95;96] lors des premières expériences réalisées sur la génération de second harmonique par le collagène. Deux hypothèses sont formulées. La première est que le tenseur non-linéaire macroscopique du collagène, $\chi^{(2)}$, possède une symétrie cylindrique C_∞. Elle s'obtient à partir des images du collagène au microscope électronique où l'on remarque que les molécules de collagène s'alignent pour former des fibrilles de forme cylindrique. La symétrie C_∞ implique que le tenseur $\chi^{(2)}$ est invariant quel que soit la rotation autour de l'axe de la fibrille (z).

En effet, une rotation quelconque qui transforme un repère (x', y', z') en un repère (x, y, z), transforme le tenseur $\chi^{(2)}$ de la manière suivante :

$$\chi^{(2)}_{(i,j,k)} = \sum_{i',j',k'} cos(\theta_{i,i'})cos(\theta_{j,j'})cos(\theta_{k,k'})\chi^{(2)}_{(i',j',k')} \tag{2.7}$$

où i, j et k valent alternativement x, y et z ; i', j' et k' valent alternativement x', y' et z' ; $\theta_{i,i'}$ est l'angle entre i' et i.

Les invariances par rotation dues à la symétrie C_∞ font que le tenseur $\chi^{(2)}$ se réduit aux coefficients suivants :

$$d^{(2)} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & b & a & 0 \\ 0 & 0 & 0 & a & -b & 0 \\ m & m & n & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \tag{2.8}$$

où a,b,m,n sont 4 coefficients indépendants[97] et $d^{(2)}$ la version contractée du tenseur $\chi^{(2)}$ avec $d^{(2)}_{i,s}(2\omega, \omega) = \chi^{(2)}_{(i,j,k)}(2\omega, \omega, \omega)$ tel que s, j, k respectent la relation suivante :

$k \backslash j$	x	y	z
x	1	6	5
y	6	2	4
z	5	4	3

TABLE 2.1 – Tableau de correspondance entre les matrices $d_{i,s}$ et $\chi^{(2)}_{(i,j,k)}$

Cette simplification du tenseur $\chi^{(2)}$ de 27 à 18 coefficients est possible car $\chi^{(2)}_{(i,j,k)}(2\omega,\omega,\omega) = \chi^{(2)}_{(i,k,j)}(2\omega,\omega,\omega)$ pour la génération de second harmonique.

La deuxième hypothèse utilisée est la symétrie de Kleinman valable si les fréquences utilisées sont éloignées des fréquences des transitions électroniques de la molécule. Comme le pic principal d'absorption du collagène se situe aux alentour de 300 nm et que les longueurs d'onde harmoniques se situent vers $350 - 500$ nm, en première approximation l'hypothèse est vérifiée. Il en découle que :

$$\chi^{(2)}_{(i,j,k)} = \chi^{(2)}_{(i,k,j)} = \chi^{(2)}_{(j,k,i)} = \chi^{(2)}_{(j,i,k)} = \chi^{(2)}_{(k,i,j)} = \chi^{(2)}_{(k,j,i)} \tag{2.9}$$

Ceci entraine une forme très simple de la matrice $d^{(2)}$ avec seulement 2 coefficients indépendants m et n :

$$d^{(2)} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & m & 0 \\ 0 & 0 & 0 & m & 0 & 0 \\ m & m & n & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \tag{2.10}$$

Afin de vérifier expérimentalement la symétrie du tenseur $\chi^{(2)}$, différents groupes ont étudié l'efficacité de génération de second harmonique en fonction de l'angle de la polarisation incidente. Pour une fibre de collagène alignée selon l'axe z, avec le plan (x, z) orthogonal à l'axe optique y [fig.2.15], on peut mesurer l'anisotropie de polarisation du signal SHG du collagène. Le rapport des deux coefficients $\rho = \frac{n}{m} = \frac{\chi_{zzz}}{\chi_{zxx}}$ détermine la réponse en polarisation du collagène. La valeur trouvée pour ρ varie entre $0,8$ pour des tendons immatures mesurés par Freund[2] en 1979 avec un système très peu résolu, à $2,6$ pour Zipfel[98] mesuré sur des tendons adultes, en passant par des valeurs intermédiaires[99;100]. Ces variations sont certainement dues aux différences entre les tissus, mais aussi aux différents systèmes d'imagerie utilisés. En effet, en 1979, le système de Roth et Freund est incapable de résoudre les fibrilles individuelles et moyenne la valeur de ρ sur de grandes zones où l'alignement des tendons n'est pas parfait.

Les valeurs expérimentales données par ce type d'expériences sont bien en accord avec les hypothèses de symétrie C_∞ et Kleinman. Par contre, il n'est pas possible de tester tous les coefficients du tenseur $\chi^{(2)}$ avec ces techniques et il n'est donc pas possible de répondre définitivement à la question de la symétrie du tenseur. Quoi qu'il en soit, ce formalisme donne un cadre de travail intéressant pour analyser la réponse du collagène.

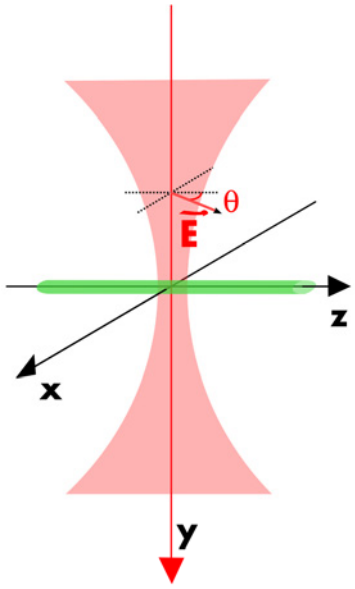


FIGURE 2.15 – Schéma de principe de la mesure d'anisotropie de polarisation du signal SHG du collagène : fibrille alignée sur l'axe z ; axe y : direction de propagation du laser ; polarisation incidente dans le plan (x,z) faisant un angle θ avec l'axe z

Plus récemment, Plotnikov *et coll.*[83] ont proposé un autre modèle, issu du travail de Shen[67] pour expliquer la génération de second harmonique par le collagène. Leur modèle est basé sur la façon dont se construit le tenseur d'hyperpolarisabilité macroscopique à partir des réponses des différentes liaisons polarisables de la molécule.

La susceptibilité dans le repère (x, y, z) d'un ensemble de molécules orientées selon (x', y', z') s'obtient par la formule suivante :

$$\chi^{(2)}_{(i,j,k)} = \sum_{i',j',k'} \langle cos(\theta_{i,i'}) cos(\theta_{j,j'}) cos(\theta_{k,k'}) \rangle \, \beta^{(2)}_{(i',j',k')} \tag{2.11}$$

où les $\langle\rangle$ représentent une moyenne sur toutes les molécules.

Leur hypothèse est que le signal SHG du collagène est généré au niveau moléculaire par le squelette d'acides aminés de la triple hélice. Ils considèrent des groupements polarisables,

avec un seul axe d'hyperpolarisabilité $\beta_{z',z',z'}$, réparti toujours avec le même angle $\theta_{z,z'} = \theta_{col}$ par rapport à l'axe de l'hélice et dont l'azimut ϕ_{col} est distribué aléatoirement. Comme ces hypothèses vérifient également les symétries C_∞ et Kleinman, on retrouve les 4 coefficients n, m, a, b précédents, mais cette modélisation donne un sens au rapport $\rho = \frac{\chi_{zzz}}{\chi_{zxx}}$ qui est directement relié à θ par les formules suivantes :

$$\begin{aligned} n &= N cos(\theta_{col})^3 \beta \\ m &= \tfrac{N}{2} cos(\theta_{col}) sin(\theta_{col})^2 \beta \\ a &= \tfrac{N}{2} cos(\theta_{col}) sin(\theta_{col})^2 \beta = m \\ b &= N cos(\theta_{col}) sin(\theta_{col})^2 \langle sin(\theta_{col}) cos(\theta_{col}) \rangle \beta = 0 \end{aligned} \tag{2.12}$$

où N est le nombre de molécules.

Les valeurs expérimentales trouvées par Plotnikov, à partir de l'anisotropie de polarisation du collagène, donnent un angle θ_{col} de $50,7°$, assez proche de la valeur de l'angle de l'hélice de la molécule de collagène qui est de $45,3°$. Cette étude semble donc indiquer que la génération de second harmonique par le collagène est liée aux groupements formant le squelette de la molécule et non à ceux des chaînes latérales. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, la valeur mesurée de ρ varie et ce modèle demandera certainement certains ajustements pour expliquer les valeurs de ρ observées expérimentalement par d'autres groupes.

Plus généralement, comme nous le faisions remarquer en introduction, la génération de second harmonique par le collagène ne peut sûrement pas être expliquée en totalité par une modélisation aussi simple. En 2OO2, Campagnola[80] évoquait la possibilité que la structure en hélice de la molécule de collagène, qui fait d'elle une molécule chirale, puisse être responsable d'une partie de l'effet non linéaire du second ordre. Or, les composantes chirales sont considérées comme nulles par la symétrie de Kleinman alors que Pena *et coll.* ont montré un effet non négligeable de la chiralité dans la génération de second harmonique du collagène[92] par des expériences sur des films minces de molécules de collagène. Même si d'après ces expériences, la génération de second harmonique est augmentée au maximum d'un facteur 2 par les composantes chirales, il est nécessaire d'utiliser un tenseur chiral pour modéliser correctement la réponse non-linéaire du collagène.

Les expériences résolues en polarisation ne permettant d'accéder qu'à un nombre de coefficients du tenseur limité, il sera nécessaire de développer d'autres techniques complémentaires. Une voie prometteuse est celle des expériences très récentes de Rocha-Mendoza *et coll.*[101]

qui ont utilisé la spectroscopie vibrationnelle par somme de fréquence pour obtenir des informations sur les groupements responsables de la génération de second harmonique dans le collagène. Pour eux, ce sont les liaisons $C-H$ des groupes méthylènes situés sur les cycles pyrrolidines des acides aminés proline et hydroxyproline qui sont responsables de l'importante contribution achirale du signal SHG du collagène. De plus, ils observent une contribution chirale significative provenant de l'arrangement en spirale des groupes $CO-$ sur le squelette de la protéine.

Toutes ces considérations montrent que l'origine moléculaire du signal de second harmonique du collagène reste encore un sujet de controverse. La complexité de son assemblage et la taille de la molécule elle-même rendent difficiles les approches traditionnelles utilisées pour l'étude des cristaux ou des molécules non-linéaires. Mais c'est par la compréhension plus fine de ce processus que nous pourrons espérer un jour faire de la microscopie de second harmonique un outil plus quantitatif.

2.3.3 Propriété du signal SHG et structure du collagène

Le champ incident et le champ rayonné sont directement reliés par la susceptibilité non-linéaire du matériau. Ainsi, si l'on connait la susceptibilité, il est possible de calculer les propriétés du signal de second harmonique à partir de celles du champ incident. A l'inverse, la connaissance des champs rayonné et incident peuvent nous donner des informations sur le tenseur de susceptibilité et ainsi sur la structure sub-micrométrique de l'échantillon. Cette partie traitera le problème direct en utilisant un modèle simple de susceptibilité du collagène, et s'intéressera au problème indirect et aux informations qu'il est envisageable d'obtenir.

Effet de la polarisation

Comme nous l'avons vu précédemment l'efficacité de génération de second harmonique dépend de l'orientation relative entre le collagène et la polarisation incidente. Si l'on reprend le schéma de la figure 2.15 et le formalisme de Freund l'intensité varie de la façon suivante :

$$\begin{aligned} I_{2\omega,x} &\propto I_{\omega}^{2}\left[sin(2\theta)\right]^{2} \\ I_{2\omega,z} &\propto I_{\omega}^{2}\left[\rho\ cos^{2}(\theta)+sin^{2}(\theta)\right]^{2} \end{aligned} \tag{2.13}$$

où $\rho = \frac{\chi_{zzz}}{\chi_{zxx}}$, θ l'angle entre la polarisation incidente et la fibre, I_{ω} l'intensité incidente et $I_{2\omega}$ l'intensité du signal SHG.

Cette dépendance en polarisation va permettre de détecter la direction des fibrilles de collagène dans des systèmes sensibles à la polarisation[102] sans même avoir accès à la résolution nécessaire pour distinguer les fibrilles individuellement.

Comme l'intensité de génération de second harmonique est plus efficace lorsque la direction de la fibre et la polarisation sont parallèles, les fibres dont l'axe n'est pas dans le plan d'imagerie ne sont pas excitées de façon optimale. Pour contrer ce handicap, des faisceaux incidents présentant des distributions de polarisation atypiques et des objectifs à forte ouverture numérique peuvent créer une polarisation perpendiculaire au plan d'imagerie. Plus précisément, un faisceau dont la polarisation est radiale au niveau de la pupille, lorsqu'il est fortement focalisé, crée une polarisation selon l'axe de propagation au niveau du volume focal[103;104;105]. Dans ce cas, on améliore la détectivité du système pour les fibres non parallèles au plan d'imagerie.

Diagramme d'émission

Une autre caractéristique de la SHG est son diagramme d'émission anisotrope qui est directement lié au tenseur d'hyperpolarisabilité, à la structure du champ électrique incident et à la répartition des fibrilles dans le volume focal.

Nous allons traiter un cas simple dans lequel toutes les molécules générant du second harmonique sont alignées selon la direction $\hat{\mathbf{z}}$ et ont un tenseur non-linéaire dont seul le coefficient $\beta_{zzz} = \beta$ est non nul. Le champ incident sera celui d'un faisceau focalisé selon l'axe y et polarisé linéairement selon $\hat{\mathbf{z}}$ [fig.2.16]. Cette configuration revient à étudier le diagramme de rayonnement de fibrilles de collagène alignées selon z pour une polarisation incidente selon z puisque seul le coefficient β_{zzz} du tenseur sera sondé si l'on considère que le tenseur du collagène respecte la symétries de Kleinman et la symétrie C_∞. Pour cela, nous nous baserons sur le formalisme développé par Moreaux *et coll.*[106] pour l'analyse de la génération de second harmonique par des molécules insérées dans une membrane cellulaire.

Dipôle unique

Comme nous l'avons vu dans l'équation 2.4, la polarisation à 2ω induite, par un champ polarisé selon z, pour une molécule dont seule la composante $\beta_{zzz} = \beta$ est non nulle, est :

$$\vec{p_{2\omega}} = \beta \; E_\omega^2 \; \hat{\mathbf{z}} \tag{2.14}$$

où le champ d'excitation est E_ω et $\hat{\mathbf{z}}$ un vecteur unitaire selon z.

Le dipole rayonne alors un champ à 2ω. Dans une direction donnée par le vecteur d'onde $\vec{k_{2\omega}}$ à une distance d'observation r grande devant λ, on a :

$$\vec{E_{2\omega}}(\vec{k_{2\omega}}) = p_{2\omega}\frac{\omega^2}{\pi\epsilon_0 c^2}\frac{sin(\psi)}{r}e^{-i(2\omega t - k_{2\omega}r)}\hat{\psi} \tag{2.15}$$

où ϵ_0 est la permitivité du vide, c la vitese de la lumière, r la distance d'observation, $k_{2\omega}$ la norme du vecteur d'onde à 2ω, $\hat{\psi} = \frac{(\vec{k_{2\omega}}\wedge\hat{\mathbf{z}})\wedge\vec{k_{2\omega}}}{\left\|(\vec{k_{2\omega}}\wedge\hat{\mathbf{z}})\wedge\vec{k_{2\omega}}\right\|}$, $\psi = angle(\hat{\mathbf{z}}, \vec{k_{2\omega}})$ [fig.2.16]. On note pour la suite $\eta = \frac{\omega^2}{\pi\epsilon_0 c^2}$.

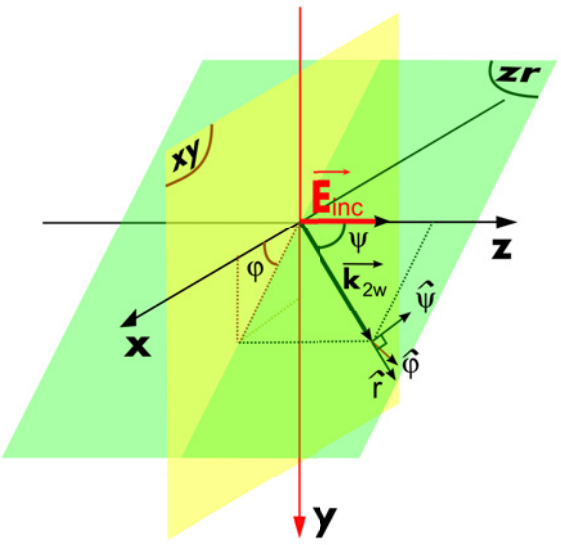


FIGURE 2.16 – Système de coordonnées pour le calcul du diagramme d'émission d'un ensemble d'harmonophores dont l'hyperpolarisabilité est restreinte à $\beta_{zzz} = \beta$. Le faisceau incident se propage selon y et est polarisé selon z. On observe le champ à 2ω émis dans la direction $\vec{k_{2\omega}}$ qui fait un angle ψ avec l'axe z et dont la projection sur le plan (xy) fait un φ avec l'axe x. Le repère en coordonnées sphérique associé à $\vec{k_{2\omega}}$ est $[\hat{r}, \hat{\psi}, \hat{\varphi}]$

Ensemble de molécules

Nous considérons maintenant un ensemble de molécules. Le champ total rayonné sera la somme de tous les champs élémentaires. Pour un volume dV petit devant la longueur d'onde mais assez grand pour inclure de nombreux harmonophores, on note $N_s(x, y, z)$ le nombre d'harmonophores compris dans le volume dV centré au point $M(x, y, z)$. Nous pouvons alors définir une concentration d'harmonophores $c(M)$ au point M :

$$c(M)dV = N_s(M) \tag{2.16}$$

On peut alors calculer la polarisation induite sur tout le sous-ensemble de molécules situées au point M. Comme chacun des diffuseurs non-linéaires compris dans dV voit le même champ incident, leur polarisation induite est :

$$d\vec{p_{2\omega}}(M) = c(M)\beta E_{\omega}^{2}(M)dV\,\hat{\mathbf{z}} \tag{2.17}$$

et le champ lointain rayonné dans la direction $\vec{k_{2\omega}}$ à une distance d'observation r par le sous-ensemble de molécules située au point M est (le point O est l'origine du repère) :

$$d\vec{E}_{2\omega}(\vec{k_{2\omega}}, M) = dp_{2\omega}(M)\eta\frac{sin(\psi)}{r}e^{-i(2\omega t - k_{2\omega}r)}e^{-i\vec{k_{2\omega}}.\vec{OM}}\ \hat{\psi} \tag{2.18}$$

$$d\vec{E}_{2\omega}(\vec{k_{2\omega}}, M) = c(M)E_{\omega}^{2}(M)\beta\eta\frac{sin(\psi)}{r}e^{-i(2\omega t - k_{2\omega}r)}e^{-i\vec{k_{2\omega}}.\vec{OM}}\hat{\psi}dV \tag{2.19}$$

Il reste à intégrer $d\vec{E}_{2\omega}(\vec{k_{2\omega}}, M)$ sur tout l'espace V pour trouver le champ total rayonné dans une direction $\vec{k_{2\omega}}$:

$$\vec{E_{2\omega}}(\vec{k_{2\omega}}) = \beta\eta\frac{sin(\psi)}{r}e^{-i(2\omega t - k_{2\omega}r)}\hat{\psi}\int_{V} c(M)E_{\omega}^{2}(M)e^{-i\vec{k_{2\omega}}.\vec{OM}}dV \tag{2.20}$$

$$\vec{E_{2\omega}}(\vec{k_{2\omega}}) = \vec{E_{2\omega}^{(0)}}(\vec{k_{2\omega}})\int_{V} c(M)\frac{E_{\omega}^{2}(M)}{E_{\omega}^{2}(O)}e^{-i\vec{k_{2\omega}}.\vec{OM}}dV \tag{2.21}$$

où $\vec{E_{2\omega}^{(0)}}(\vec{k_{2\omega}})$ est le champ rayonné par un dipôle unique placé à l'origine $O(0,0,0)$. Dans la suite nous noterons $f(M) = \frac{E_{w}^{2}(M)}{E_{w}^{2}(0)}$ la fonction donnant l'amplitude au carré du champ incident normalisé.

Si on décompose le vecteur d'onde $\vec{k_{2\omega}}$ dans ces composantes $(k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y}, k_{2\omega,z})$ on obtient la formule suivante :

$$\vec{E_{2\omega}}(k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y}, k_{2\omega,z}) = \vec{E_{2\omega}^{(0)}}(k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y}, k_{2\omega,z})\int_{V} c(x,y,z)f(x,y,z)e^{-i(k_{2\omega,x}.x + k_{2\omega,y}.y + k_{2\omega,z}.z)}dxdydz \tag{2.22}$$

On reconnait ici l'opérateur transformée de Fourier tridimensionnel. Dans la suite nous noterons $\tilde{G}(k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y}, k_{2\omega,z})$ la transformée de Fourier de $g(x,y,z)$ définit par :

$$\tilde{G}(k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y}, k_{2\omega,z}) = \left(\frac{1}{\sqrt{2\pi}}\right)^{3}\int\int\int g(x,y,z)e^{-i(k_{2\omega,x}.x + k_{2\omega,y}.y + k_{2\omega,z}.z)}dxdydz \tag{2.23}$$

On a alors :

$$\vec{E_{2\omega}}(k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y}, k_{2\omega,z}) = (2\pi)^{3/2}\ \vec{E_{2\omega}^{(0)}}(k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y}, k_{2\omega,z})\tilde{A}(k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y}, k_{2\omega,z}) \tag{2.24}$$

où $\tilde{A}$ est la transformée de Fourier du produit de $c(x,y,z)$ par $f(x,y,z)$.

Le produit $c(x,y,z)f(x,y,z)$ dans l'espace direct peut être remplacé par un produit de convolution dans l'espace des fréquences spatiales multiplié par un coefficient de normalisation $\left(\frac{1}{\sqrt{2\pi}}\right)^3$:

$$\vec{E_{2\omega}}(k_{2\omega,x},k_{2\omega,y},k_{2\omega,z}) = \vec{E_{2\omega}^{(0)}}(k_{2\omega,x},k_{2\omega,y},k_{2\omega,z}) \left[\tilde{C}(k_{2\omega,x},k_{2\omega,y},k_{2\omega,z}) \otimes \tilde{F}(k_{2\omega,x},k_{2\omega,y},k_{2\omega,z})\right] \tag{2.25}$$

On peut déjà tirer un certain nombre d'enseignement de la formule 2.25 :

- Le diagramme de rayonnement ne donne accès qu'à une partie limitée de l'espace des fréquences spatiales. Nous sommes restreints à la surface de la sphère tel que $k_{2\omega,x}^2 + k_{2\omega,y}^2 + k_{2\omega,z}^2 = k_{2\omega}^2$. Cela veut dire qu'il est impossible d'utiliser la transformée de Fourier inverse pour obtenir $c(x,y,z)$ puisqu'un grand nombre de fréquences spatiales sont perdues.
- Le diagramme de rayonnement ne permet pas directement d'obtenir les fréquences spatiales de c mais celle de son produit de convolution avec $\tilde{F}$ qui mélange et déplace les fréquences spatiales de l'échantillon dans l'espace réciproque.
- La fonction de réponse d'un diffuseur unique $\vec{E_{2\omega}^{(0)}}$ joue le rôle d'un filtre passe bas par rapport à $k_{2\omega,z}$ puisque $sin(\psi) = \sqrt{1 - \frac{k_{2\omega,z}^2}{k_{2\omega}^2}}$. Il sera donc impossible d'accéder aux hautes fréquences spatiales en z.

Modélisation du champ incident

Pour aller plus loin, il faut maintenant modéliser la fonction f qui donne l'amplitude normalisée du carré du champ incident. Le champ au foyer d'un objectif de grande ouverture numérique, tel que ceux utilisés en microscopie multiphoton, ne peut pas se calculer en utilisant l'approximation paraxiale. En fait, il n'existe pas de fonction analytique simple permettant de représenter un tel champ. On pourra trouver le calcul exact du champ électrique au foyer d'un objectif dans le livre de Born et Wolf[79] et plus récemment dans un livre de Novotny et Hecht avec un chapitre consacré au problème de focalisation en microscopie[107]. Dans le cadre de l'étude de la génération d'harmonique, il a été montré que l'on pouvait donner une bonne approximation du champ en utilisant des fonctions gaussiennes pour l'amplitude du champ à la fois dans la direction transverse et axiale et une phase linéaire par rapport à la direction de propagation. Ce modèle adapté pour la microscopie multiphoton par Moreaux *et*

coll.[106] conduit à la formule suivante pour un champ polarisé selon z se propageant selon y :

$$\vec{E_\omega}(x,y,z) = -i\ E_{\omega 0}\ e^{-\frac{x^2+z^2}{\omega_r^2}-\frac{y^2}{\omega_a^2}-ik_w\xi y}\ \hat{\mathbf{z}} \tag{2.26}$$

où $E_{\omega 0}$ est l'amplitude du champ incident à l'origine, ω_r et ω_a sont respectivement les rayons à $1/e$ du champ dans la dimension radiale et la dimension axiale, k_ω la norme du vecteur d'onde à ω, $\xi = 1 - \frac{2}{k_\omega^2 \omega_r^2}$ un facteur lié à la phase de Gouy.

On peut alors calculer $f(x,y,z)$:

$$f(x,y,z) = \ e^{-2(\frac{x^2+z^2}{\omega_r^2}+\frac{y^2}{\omega_a^2})} e^{-2ik_\omega \xi y} \tag{2.27}$$

Comme $2k_\omega = k_{2\omega}\frac{n_\omega}{n_{2\omega}}$ où n_ω et $n_{2\omega}$ sont les indices du milieu aux fréquences ω et 2ω respectivement, on pose $\xi' = \xi\frac{n_\omega}{n_{2\omega}}$ pour obtenir la formule :

$$f(x,y,z) = \ e^{-2(\frac{x^2+z^2}{\omega_r^2}+\frac{y^2}{\omega_a^2})} e^{-ik_{2\omega} \xi' y} \tag{2.28}$$

et sa transformée de Fourier que l'on peut décomposer en un produit de convolution de 2 fonctions :

$$\tilde{F}(k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y}, k_{2\omega,z}) = \left(\frac{1}{\sqrt{2\pi}}\right)^3 \tilde{H}(k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y}, k_{2\omega,z}) \otimes \left(\sqrt{2\pi}\right)^3 \delta(k_{2\omega,x}^2, k_{2\omega,y}^2 - k_{2\omega}\xi', k_{2\omega,z}^2) \tag{2.29}$$

$$\tilde{H}(k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y}, k_{2\omega,z}) = \frac{\omega_r^2 \omega_a}{8} e^{-\frac{1}{8}\left(\omega_r^2(k_{2\omega,x}^2+k_{2\omega,z}^2)+\omega_a^2 k_{2\omega,y}^2\right)} \tag{2.30}$$

δ est la distribution de Dirac et $\tilde{H}$ la transformée de Fourier de la norme de f, c'est à dire de l'intensité normalisée du faisceau incident.

On réintroduit l'équation 2.29 dans l'équation 2.25 et comme l'opération de convolution est associative, on obtient :

$$\vec{E_{2\omega}} = \vec{E_{2\omega}^{(0)}} \left[\delta_{(0,k_{2\omega}\xi',0)} \otimes \left(\tilde{H} \otimes \tilde{C}\right)\right] \tag{2.31}$$

On voit ici que :

- La fonction $\tilde{H}$ joue le rôle d'un flou gaussien appliqué dans l'espace des fréquences spatiales. Ainsi plus le faisceau est focalisé plus le contenu fréquentiel de l'échantillon est dégradé.
- La convolution de $\tilde{C} \otimes \tilde{H}$ par la distribution de Dirac tri-dimensionnelle centrée en $(0, \xi' k_{2\omega}, 0)$ va translater cette fonction dans la direction de propagation y. Tout se

passe alors comme si nous avions 2 origines, la première O liée au vecteur d'onde $k_{2\omega}$ qui donne la direction du champ réémis, l'autre O' décalée de $\xi' k_{2\omega}$ selon l'axe y qui est l'origine des fréquences spatiales de l'échantillon $(h(x,y,z).c(c,y,z))$ (voir plus loin sur la figure 2.20(a)). On a une situation analogue à celle de la sphère d'Ewald en cristallographie.

- Si on ne tient pas compte du flou lié à $\tilde{H}$, dans une direction d'observation donnée $(k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y}, k_{2\omega,z})$, on sonde la fréquence spatiale de l'échantillon $(k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y} - \xi' k_{2\omega}, k_{2\omega,z})$. Ainsi selon l'axe y et dans la direction de propagation du laser, on sonde la fréquence spatiale (0,$(1-\xi')k_{2\omega}$,0), alors que dans le sens contre-propagatif c'est la fréquence (0,$(1+\xi')k_{2\omega}$,0) qui est observée. Pour des objectifs à immersion et à une longueur d'onde incidente de 860 nm, ξ' décroit de $0,97$ à $0,88$ pour des ouvertures numériques variant de $0,4$ à 1. Les fréquences spatiales sondées par l'émission dans le sens propagatif sont bien plus petites que celles responsables de l'émission dans le sens contrapropagatif.
- La longueur de cohérence Δl est liée à la distance sur laquelle le signal émis par les différents harmonophores est en phase.

$$\Delta l = 2\pi / \sqrt{k_{2\omega,x}^2 + (k_{2\omega,y} - \xi' k_{2\omega})^2 + k_{2\omega,z}^2} \tag{2.32}$$

  Deux harmonophores distants de la longueur de cohérence émettront des champs avec un déphasage de 2π. La figure 2.17 donne la longueur de cohérence pour une direction donnée en fonction de l'angle α qu'elle fait avec l'axe de propagation y. On voit que la longueur de cohérence est nettement plus grande dans le sens propagatif que contrapropagatif. Le signal se construira donc de façon cohérente sur de plus grandes distances dans cette direction.
- On remarque que, sauf si ξ' vaut 1, le point de fréquence spatiale nulle n'est pas accessible. Or la valeur de $\tilde{C} \otimes \tilde{H}$ en ce point est la valeur moyenne de $c(x,y,z)h(x,y,z)$, c'est à dire la concentration de molécules dans le volume focal.

Fibrilles dont l'extension en z est infinie

Pour continuer, nous allons faire l'hypothèse que les fibres ont une extension en z grande par rapport à la longueur d'onde et que l'on peut considérer que $c(x,y,z) = c(x,y)$. La transformée de Fourier tridimensionnelle de $c(x,y)$ est $\tilde{C} = \tilde{C}_{xy}(k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y}) \ . \ \sqrt{2\pi}\delta_z(k_{2\omega,z})$, où $\tilde{C}_{xy}$ est la transformée de Fourier bidimensionnelle selon x et y de $c(x,y)$. Comme $\tilde{H}$ est elle

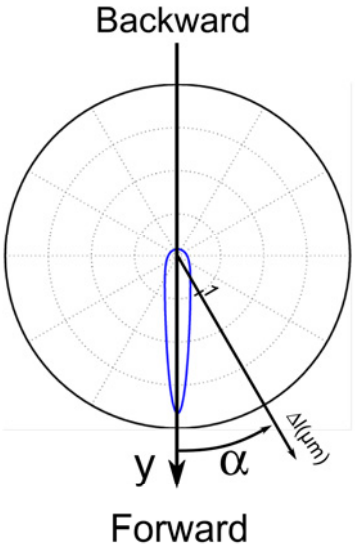


FIGURE 2.17 – Longueur de cohérence dans une direction d'observation faisant un angle α avec la direction de propagation $\hat{\mathbf{y}}$ du laser incident. Courbe calculée à partir des mesures de profil d'intensité au foyer pour notre objectif à immersion d'ouverture $0,95NA$ à une longueur d'onde de 860 nm : $\xi' = 0,92$; $\omega_a = 1,95\ \mu m$; $\omega_r = 510\ nm$

aussi séparable en 2 fonctions $\tilde{H} = \tilde{H}_{xy}(k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y})\ .\ \tilde{H}_z(k_{2\omega,z})$, on reprend alors la formule 2.31 pour obtenir :

$$\vec{E_{2\omega}}(k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y}, k_{2\omega,z}) = \sqrt{2\pi}\vec{E_{2\omega}^{(0)}}(k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y}, k_{2\omega,z})\tilde{H}_z(k_{2\omega,z}) \left[\delta_{(0,k_{2\omega}\xi')} \otimes \left(\tilde{H}_{xy} \otimes \tilde{C}_{xy}\right)\right](k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y}) \tag{2.33}$$

$$\tilde{H}_z(k_{2\omega}, z) = \frac{\omega_r}{2} e^{-\frac{1}{8}\omega_r^2 k_{2\omega,z}^2} \tag{2.34}$$

$$\tilde{H}_{xy}(k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y}) = \frac{\omega_r \omega_a}{4} e^{-\frac{1}{8}\left(\omega_r^2 k_{2\omega,x}^2 + \omega_a^2 k_{2\omega,y}^2\right)} \tag{2.35}$$

Comme $k_{2\omega,z}^2 = k_{2\omega}^2 - (k_{2\omega,x}^2 + k_{2\omega,y}^2)$ et que les fonctions $\vec{E_{2\omega}^{(0)}}$ et $\tilde{H}_z$ sont paires par rapport à $k_{2\omega,z}$, on peut se limiter aux $k_{2\omega,z}$ positifs et réduire la formule précédente aux seules variables $(k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y})$ et à des transformées de Fourier bidimensionnelles.

$$\vec{E_{2\omega}}(k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y}) = \vec{E_{2\omega}^{(0)}}(k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y})\tilde{H}_z(k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y}) \left[\delta_{(0,k_{2\omega}\xi')} \otimes \left(\tilde{H}_{xy} \otimes \tilde{C}_{xy}\right)\right](k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y}) \tag{2.36}$$

On voit ici que :

- Le produit de la fonction $E_{2\omega}^{(0)}$ par H_z atténue très fortement le rayonnement dont la direction n'est pas normale à l'axe des fibres z [fig.2.18].
- La résolution dans l'espace des fréquences est donnée par $\tilde{H}_{xy}$ dont les largeurs totales à mi-hauteur en $k_{2\omega,x}$ et $k_{2\omega,y}$ sont respectivement $\sigma_{FWHM,k_{2\omega,x}}$ et $\sigma_{FWHM,k_{2\omega,y}}$

$$\sigma_{FWHM,k_{2\omega,x}} = \frac{4\sqrt{2ln\ 2}}{\omega_r} = 0,47k_{2\omega} \tag{2.37}$$

$$\sigma_{FWHM,k_{2\omega,y}} = \frac{4\sqrt{2ln\ 2}}{\omega_a} = 0,12k_{2\omega} \tag{2.38}$$

  Les applications numériques sont réalisées pour une ouverture numérique de $0,95\ NA$ et une longueur d'excitation de 860 nm, ce qui correspond à la situation que nous employons couramment dans nos expériences. Au final, nous ne sommes sensibles qu'aux fréquences spatiales dans la direction y.
- La fréquence spatiale nulle de l'échantillon pondérée par l'intensité d'excitation est située en $(k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y}) = (0, k_{2\omega}\xi')$. Dans notre cas, cette direction correspond à $(\psi = 64°; \varphi = 0°)$, et sera atténuée d'environ un facteur 10 par $E_{2\omega}^{(0)}H_z$.

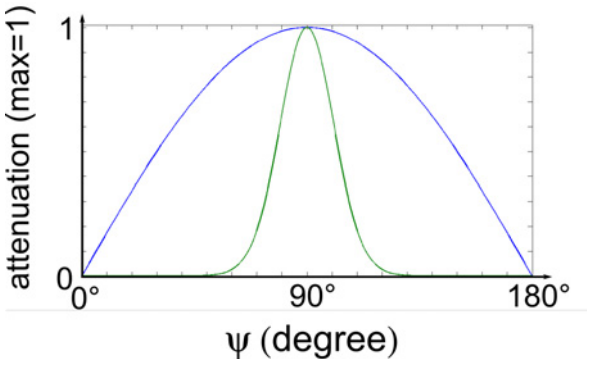


FIGURE 2.18 – Fonctions $E_{2\omega}^{(0)}$ (bleu) et H_z (vert) normalisées et tracées en fonction de l'angle ψ entre la direction d'observation et l'axe z des fibres ; Courbes calculées à partir des mesures de profil d'intensité au foyer pour notre objectif à immersion d'ouverture $0,95NA$ à une longueur d'onde de 860 nm : $\xi' = 0,92$; $\omega_a = 1,95\ \mu m$; $\omega_r = 510\ nm$

Au final, on voit que le diagramme donne accès à quelques informations sur la structure du collagène à l'intérieur du volume focal mais que les différentes fréquences sont brouillées entre elles et qu'à moins d'utiliser un faisceau bien moins focalisé, le système est surtout sensible aux fréquences spatiales selon la direction de propagation du laser. Grossièrement, la

partie du signal qui se propage dans le même sens que le faisceau (vers l'avant) correspond aux fréquences spatiales allant de la fréquence nulle à $k_{2\omega}\xi'$ alors que la partie vers l'arrière correspond aux fréquences allant de $k_{2\omega}\xi'$ à $k_{2\omega}(1+\xi')$, c'est-à-dire des distances caractéristiques supérieures à $\lambda_{2\omega}/(n_{2\omega}\xi')$ vers l'avant et comprise entre $\lambda_{2\omega}/(n_{2\omega}\xi')$ et $\lambda_{2\omega}/(n_{2\omega}(1+\xi'))$ vers l'arrière. Ceci a été confirmé expérimentalement. La figure 2.19 montre, par exemple, la grande différence d'aspect qu'il peut y avoir entre des images collectées vers l'avant ou vers l'arrière sur une cornée humaine. Cette différence se retrouve aussi dans le tendon comme le montre Legare *et coll.*[108].

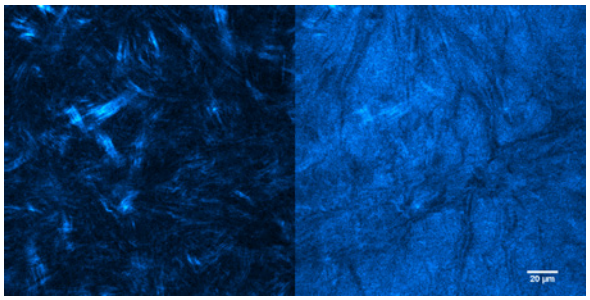


FIGURE 2.19 – Image d'une cornée 5h environ après son prélèvement. Excitation laser à 860 nm avec une puissence de 60 mW sur l'échantillon aplani entre 2 lamelles ; (gauche) image SHG en transmission ; (droite) image SHG en épidétection. Sur ces images, le rapport du signal moyen transmis sur le signal moyen en épidétection, corrigé de la différence de détectivité entre les 2 voies, est de 2,7.

Il est donc possible en mesurant le diagramme de rayonnement d'obtenir des informations sur l'organisation des fibrilles de collagène dans le volume focal. Pour des raisons d'intensité du signal et de simplicité du dispositif, c'est souvent le rapport, noté (F/B), de l'intensité émise dans la direction de propagation du laser incident (Forward) sur l'intensité émise en contrapropagatif (Backward) qui est mesuré. Si on veut relier le paramètre (F/B) à nos calculs, il suffit d'intégrer l'équation (2.36) sur les domaines des angles d'ouverture avant et arrière du dispositif. Il faut tout de même faire attention à décomposer la direction de polarisation de l'onde émise, $\hat{\psi}$ dans un repère invariant par rapport à $k_{2\omega}$ avant d'effectuer cette somme. Il n'est malheureusement pas possible de donner des expressions analytiques simples pour ces intégrales dans le cas général.

Exemple

Pour terminer par un exemple concret, nous traiterons le cas d'un réseau hexagonal de

fibrilles toutes identiques de $2R = 200\ nm$ de diamètre, espacées de 250 nm. Le diamètre des fibrilles et leur espacement ont été choisis pour ressembler à l'organisation d'un tendon. Toutefois, dans un tendon réel, la taille des fibres n'est pas rigoureusement constante et surtout, même si la distance entre 2 fibres est à peu près constante, l'organisation des fibrilles est très loin de ressembler à un réseau hexagonal. Si l'on voulait traiter un cas plus proche du réel, il faudrait utiliser une approche statistique, proche de celle utilisée en interférométrie de speckle, et définir les propriétés statistiques de la distribution des fibrilles dans un tendon (valeur moyenne, moments, autoconvolution, ...). Il faudrait ensuite calculer la valeur moyenne du champ électrique rayonné, de l'intensité et leurs premiers moments.

Le cas simple que nous traitons est donc constitué de fibrilles pleines toutes identiques arrangées selon un réseau hexagonal, c'est-à-dire que la fonction $c(x, y, z)$ est la convolution de la fonction disque de rayon R, $D_R(x, y)$, [fig.2.20(c)] par la fonction réseau [fig.2.20(d)].

La transformée de Fourier d'une fonction disque est [fig.2.20(h)] :

$$\tilde{D}_R(k_{2\omega,\rho}) = \frac{\pi R^2}{2\pi} \frac{2J_1(k_{2\omega,\rho}R)}{k_{2\omega,\rho}R} \tag{2.39}$$

où $k_{2\omega,\rho} = \sqrt{k_{2\omega,x}^2 + k_{2\omega,y}^2}$, et J_1 est la fonction de Bessel du premier ordre.

La transformée de Fourier du réseau est son réseau réciproque. Il suffit alors de donner à chaque point du réseau la valeur de la transformée de Fourier du disque en ce point [fig.2.20(i)].

On calcule ensuite l'intensité normalisée du faisceau incident [fig.2.20(e)] et sa transformée de Fourier [fig.2.20(j)]. On convolue cette transformée de Fourier avec celle du réseau de fibres [fig.2.20(k)] pour obtenir la transformée de fourier du produit du champ incident par la distribution des fibres [fig.2.20(f)]. La convolution par la fonction de Dirac centrée en $(0, \xi' k_{2\omega})$ translate le résultat précédent : le centre des fréquences de l'échantillon O' est donc décalé de $\xi' k_{2\omega}$ par rapport au centre O des fréquences rayonnées où sont centrées les fonctions $E_{2\omega}^{(0)}$ et H_z [fig.2.20(g)]. On obtient au final le champ rayonné représenté dans le plan $(k_{2\omega,x}, k_{2\omega,y})$ sur la figure 2.20(l) et en trois dimensions sur la figure 2.20(b). Il faut noter que dans ce cas particulier toutes les fonctions sont réelles, mais dans le cas général ces fonctions peuvent être complexes.

Confrontation aux mesures expérimentales

Des mesures du rapport (F/B) ont été réalisées par Williams *et coll.*[98] sur des tendons de queues de rats d'âge variable. Comme le diamètre des fibrilles dans ce type de tissu est connue pour évoluer au court du temps[109;110], ils ont pu tracer [fig.2.21] l'évolution du rapport (F/B)

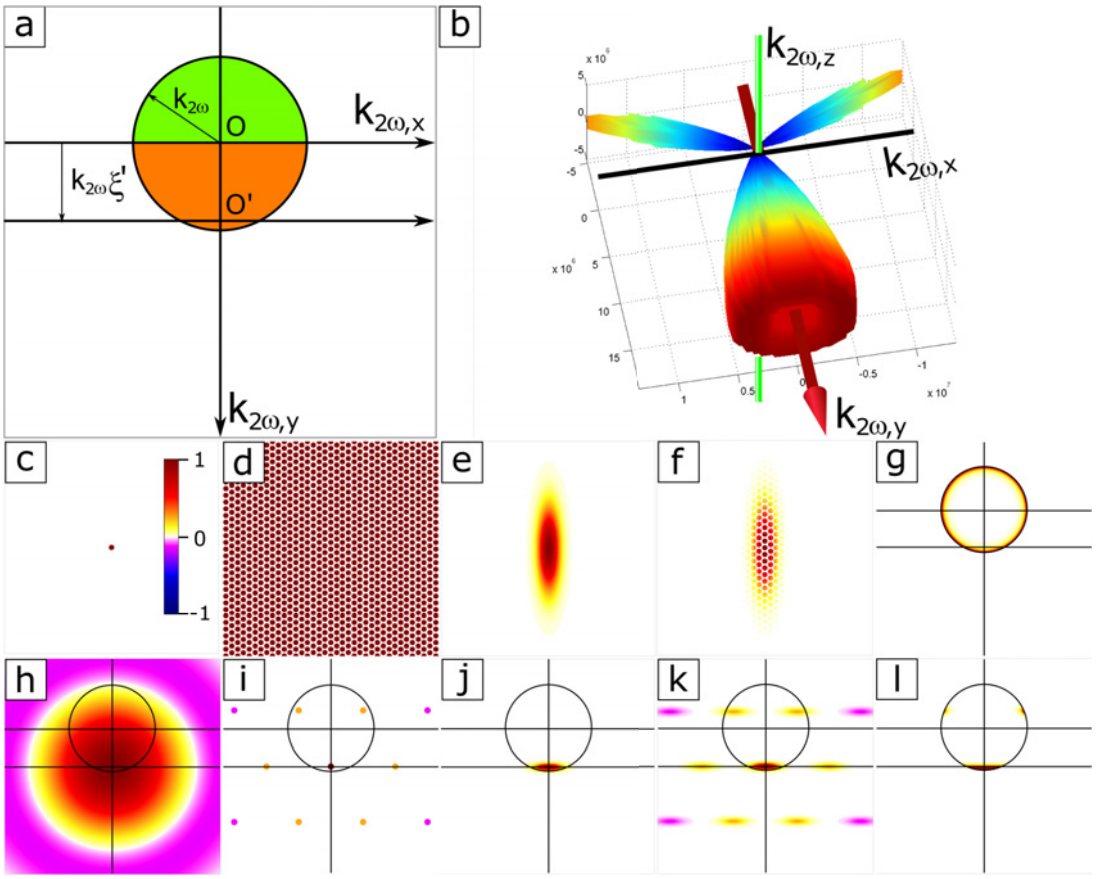


FIGURE 2.20 – (a) Espace réciproque : O est l'origine des fréquences spatiale pour le rayonnement alors que O' est l'origine des fréquences spatiales de l'échantillon, O' est translaté de $k_{2\omega}\ \xi'$ par rapport à O à cause de la phase du champ incident ; le disque de diamètre $k_{2\omega}$ est l'ensemble des fréquences accessibles, le demi-disque vert correspond à l'émission contre-propagative, le demi-disque orange à l'emission propagative

(b) Diagramme de rayonnement les fibrilles sont parallèles à $k_{2\omega,z}$, le laser se propage selon $k_{2\omega,y}$

(c-l) Représentations normalisées et tracées selon le code de couleur de l'insert dans (c)

(c-f) Espace direct ; (g-l) Espace réciproque

(c ;h) Fibrille unique de diamètre 200 nm

(d ;i) Réseau hexagonal de pas 250 nm de ces fibrilles ; (i) chaque point correspond à un pic de Dirac

(e ;j) Intensité du champ incident

(f ;k) Réseau de fibrilles pondéré par l'intensité du champ en chaque point

(g) fonction filtre $E_{2\omega}^{(0)}\ H_z$

(l) Champ électrique rayonné $E_{2\omega}$

en fonction de l'âge des tendons et donc de l'évolution en taille des fibrilles. Leurs mesures expérimentales donnent un rapport proche de 1 quelque soit l'âge des tendons. Ils simulent l'évolution du rapport (F/B) pour une fibrille unique de diamètre variable placée au centre du volume focal avec 2 modèles de fibres : le premier est un cylindre plein, le second est un cylindre creux où le second harmonique n'est généré que par une fine couche ($< 50\ nm$) à la surface de la fibrille. Cette simulation montre que le modèle en fibres creuses serait mieux adapté. Ce résultat est compréhensible puisque si seule la surface des fibrilles génère le signal de second harmonique, les fréquences spatiales de la distribution d'harmonophores sont plus élevées et favorisent l'émission vers l'arrière. Cependant, cette simulation ne prend pas en compte la répartition des fibrilles les unes par rapport aux autres dans le volume focal. Or, ce maillage peut lui aussi créer des fréquences spatiales élevées qui pourraient expliquer le rapport (F/B) proche de 1.

Dans des expériences récentes, Chu *et coll.*[111] ont quant à eux réussi à imager le même échantillon successivement en microscopie multiphoton puis en microscopie AFM. Ils en déduisent directement une loi donnant le rapport (F/B) en fonction du diamètre des fibres. Ce rapport varie linéairement de 2 à 10 pour des fibres de diamètre allant respectivement de 120 à 300 nm à une longueur d'onde d'excitation de 1230 nm.

Enfin, une étude de Legare *et coll.*[108] montre la difficulté de ce genre de mesure à cause du fort signal rétrodiffusé par les tissus. En effet, ils ont mesuré que le signal détecté vers l'arrière dans des tendons intacts était *ex vivo* $6,2 \pm 0,4$ fois plus grand que le signal détecté vers l'arrière pour une coupe mince de tendon. Ainsi, la contribution du signal rétrodiffusé n'est en général pas négligeable. Au final, il mesure un rapport (F/B) de $24,9 \pm 2,4$ plus élevé que les autres groupes.

En conclusion, on voit qu'il n'est pas simple d'interpréter les diagrammes de rayonnement ou le rapport (F/B). Toutefois, le diagramme d'émission contient des informations utiles sur la structure du collagène pour des dimensions allant jusqu'au quart de la longueur d'onde d'excitation. Les expériences menées dans ce domaine tendent à montrer que l'intensité émise vers l'avant et vers l'arrière sont du même ordre de grandeur[98;111] ou un ordre de grandeur plus élevé vers l'avant[108], ce qui signifie qu'il existe des distances caractéristiques proches de la longueur d'onde harmonique dans l'organisation du collagène. Pour avancer sur ces questions, il faudra certainement combiner des techniques d'imagerie en champ proche avec l'imagerie SHG et travailler sur des systèmes modèles.

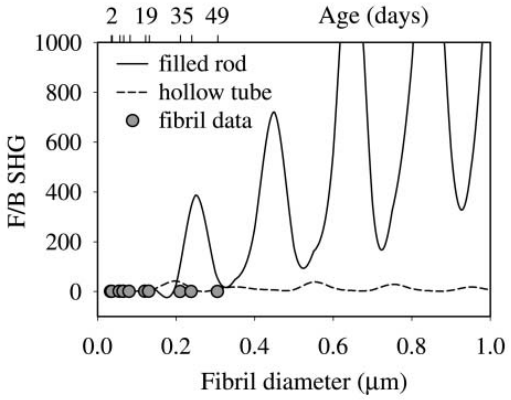


FIGURE 2.21 – cercle : rapport F/B mesuré sur des fibres de collagène de tendons d'âge différent ; trait plein : rapport calculé pour des fibres pleines ; trait pointillé : cacul pour des fibres creuses [source : Williams *et coll.*[98]]

Effet de la longueur d'onde

Même en considérant que les longueurs d'onde utilisées en microscopie multiphoton sont éloignées des résonances du collagène et donc que le tenseur d'hyperpolarisabilité de la molécule de collagène ne dépend pas de la longueur d'onde, l'émission totale, elle, peut en dépendre. En effet, le signal de SHG se construit par l'interférence des champs rayonnés par les différents dipôles ; or les déphasages relatifs sont fonction de la distance entre les harmonophores, de l'indice optique et de la longueur d'onde, l'indice optique dépendant lui-même de la longueur d'onde.

Pour simuler l'effet d'un changement de longueur d'onde, il suffit de reprendre le calcul effectué dans la section précédente et de faire varier la longueur d'onde.

- Une variation de la longueur d'onde va modifier les correspondances entre les directions d'émission et les fréquences spatiales de l'échantillon ; la sphère des fréquences accessibles ($\vec{k}_{2\omega} = Cte$) change de rayon.
- Le volume focal augmente avec le décalage de la longueur d'onde incidente vers le rouge. Ainsi, la transformée de Fourier du volume focal diminue et si l'on se place dans le cadre de la modélisation du faisceau incident de Moreaux *et coll.*[106], l'augmentation de longueur d'onde aura pour effet de diminuer le rayon du flou gaussien appliqué aux fréquences spatiales de l'échantillon.

En théorie, modifier la longueur d'onde d'excitation permettrait de sonder plus de fréquences

spatiales et d'obtenir plus d'informations sur l'échantillon. La difficulté dans ce genre d'approche est qu'il faut bien maîtriser tous les paramètres expérimentaux lorsque l'on change la longueur d'onde, en particulier la taille du volume focal, l'intensité et la durée des impulsions et la détectivité du système en fonction de la longueur d'onde.

Plusieurs études[74;78;112;113] montrent une dépendance du signal en fonction de la longueur d'onde. Les différences entres les mesures faites par chacun des groupes prouvent que l'organisation à l'échelle de la longueur d'onde du collagène joue un rôle important dans cette dépendance. Le modèle proposé par Zoumi[78] puis utilisé par Theodossiou[112] ou Palero[113] pour expliquer l'effet de la longueur d'onde ne prend pas en compte la structuration du collagène et demande donc à être affiné.

Applications biomédicales

Sensibilité à l'environnement

Comme nous l'avons vu la génération de second harmonique par le collagène dépend fortement de son organisation. Or l'environnement dans lequel se trouve le collagène peut altérer sa structure. Par exemple, la chaleur peut dénaturer le collagène et provoquer d'une diminution du signal de SHG[114;115;116]. L'hydratation et la salinité du milieu[98] ou les dommages glyco-oxydatifs et l'effet d'enzymes[116] peuvent eux aussi altérer l'efficacité de la génération de second harmonique. Dans chacun des cas, les modifications du milieu entrainent un changement dans la structure du collagène qui modifie l'intensité du signal. Cela fait de la SHG un excellent outil pour suivre des processus biologiques qui altèrent l'organisation du collagène comme les brûlures, le diabète ou des processus de cicatrisation anormaux.

Maladies touchant le collagène

La sensibilité de la SHG permet aussi d'étudier des maladies du collagène qui induiraient des changements de structures. Ainsi, LaComb *et coll.*[117] montrent qu'il est possible de différencier le collagène chez des sujets normaux du collagène de personnes atteintes d'*osteogenesis imperfecta*. Cette maladie est caractérisée par une mutation des gènes qui codent les chaines α_1 et α_2 du collagène.

On voit donc que le signal SHG du collagène permet de discriminer des changements structurels fins et que cette sensibilité en fait un outil intéressant pour l'étude du collagène et de son organisation. Cependant, la complexité de la construction du signal SHG et les multiples échelles de structuration du collagène rendent l'interprétation de ce signal difficile.

On pourra donc suivre des changements liés à une cause connue ou constater des anomalies, mais bien souvent le cheminement inverse qui consisterait à retrouver la cause des changements est impossible par cette seule technique.

2.4 Comparaison entre les différentes méthodes

Dans cette section, nous allons nous baser sur l'ensemble des paragraphes précédents pour dresser un bilan comparatif des principales méthodes optiques de visualisation et de quantification du collagène : la coloration au trichrome de Masson, la coloration au rouge Sirius observée en lumière polarisée, l'immunohistochimie et la génération de second harmonique.

2.4.1 Source du signal

Tout d'abord, revenons sur la spécificité de chacune de ces techniques. Le trichrome de Masson colore en vert toute la matrice extracellulaire comme on peut le voir sur la figure 2.22(a). On ne pourra donc pas faire la différence entre le collagène fibrillaire, le collagène des membranes basales ou d'autres composants de la matrice extracellulaire. Par contre, il est possible d'évaluer rapidement la localisation et l'espace occupé par la matrice extracellulaire.

La technique de coloration au rouge Sirius en lumière polarisée [fig.2.22(c)] et la génération de second harmonique [fig.2.22(b)et(d)] sont toutes les deux sensibles à l'alignement des molécules de collagène et sont spécifiques des collagènes fibrillaires. Pour diminuer la sensibilité à la direction des fibres par rapport à la polarisation de la lumière incidente, on peut utiliser une lumière polarisée circulairement. Toutes deux sont donc des techniques complémentaires du trichrome de Masson.

Comme nous l'avons vu précédemment, la génération de second harmonique est sensible à l'organisation sub-micrométrique du collagène, il est donc difficile d'obtenir une information sur le nombre de molécules de collagène à partir de l'intensité du signal de SHG. Il en est de même pour le rouge Sirius puisque les relations entre la couleur observée, la biréfringence induite, la concentration en molécule de rouge Sirius et la concentration en collagène sont très complexes. Toutefois comme on peut le voir sur la figure 2.22(d), la SHG permet de visualiser les fibres de collagène de façon continue, à l'inverse de la coloration au rouge Sirius qui apparait visuellement avec un aspect en pointillé [fig.2.22(c)]. Dans le cas général, les

deux techniques permettent surtout la localisation des fibres plutôt que la quantification du nombre de molécules.

Les techniques d'immunohistochimie [fig.2.14] sont plus spécifiques car elles permettent de cibler très précisément des parties de la structure tertiaires des protéines. En fonction de l'anticorps utilisé, le marquage peut être spécifique de tous les collagènes, d'un type de collagène particulier ou d'une chaine α composant la triple hélice.

Comme ces techniques ne révèlent pas exactement les mêmes choses, le choix d'une technique par rapport à une autre dépendra donc de la problématique biologique que l'on tente de résoudre. Par ailleurs, il sera souvent utile de combiner plusieurs techniques pour obtenir plus d'informations.

2.4.2 Sensibilité des différentes techniques

La sensibilité de la coloration au trichrome de Masson est une question difficile. En effet, les images en couleur obtenues par la coloration au trichrome de Masson sont faites pour être analysées par un opérateur humain. L'oeil est très sensible aux variations de couleurs et peut interpréter les images qualitativement. Il est nettement plus difficile d'obtenir une information quantitative à partir de ces images. En effet, les couleurs observées vont dépendre du système optique, de la qualité de la coloration, de celle de la fixation... leur traitement informatique nécessitera donc des algorithmes complexes. Une possibilité est de segmenter les images après les avoir transposées dans un espace colorimétrique adapté. On pourra trouver une implémentation pour l'analyse automatique des images de coupe colorée au trichrome de Masson dans un article de Vannary Meas-Yedid *et coll.*[118].

En immunohistochimie, la sensibilité repose sur la spécificité de l'anticorps utilisé, le rendement quantique de fluorescence du marqueur associé et la disponibilité des épitopes à reconnaitre. Deux phénomènes sont source de bruit : d'une part l'intensité du marquage non spécifique qui dépend de la spécificité de l'anticorps, d'autre part l'intensité de la fluorescence endogène par rapport à celle du marquage. Pour s'assurer de la qualité du marquage, des coupes témoin non marquées déterminent l'intensité de la fluorescence endogène. Des zones des coupes colorées, dont on sait a priori qu'elles ne contiennent pas de collagène, servent à déterminer le niveau de marquage non spécifique.

Pour ce qui est du rouge Sirius en lumière polarisée, la couleur observée dépend de la

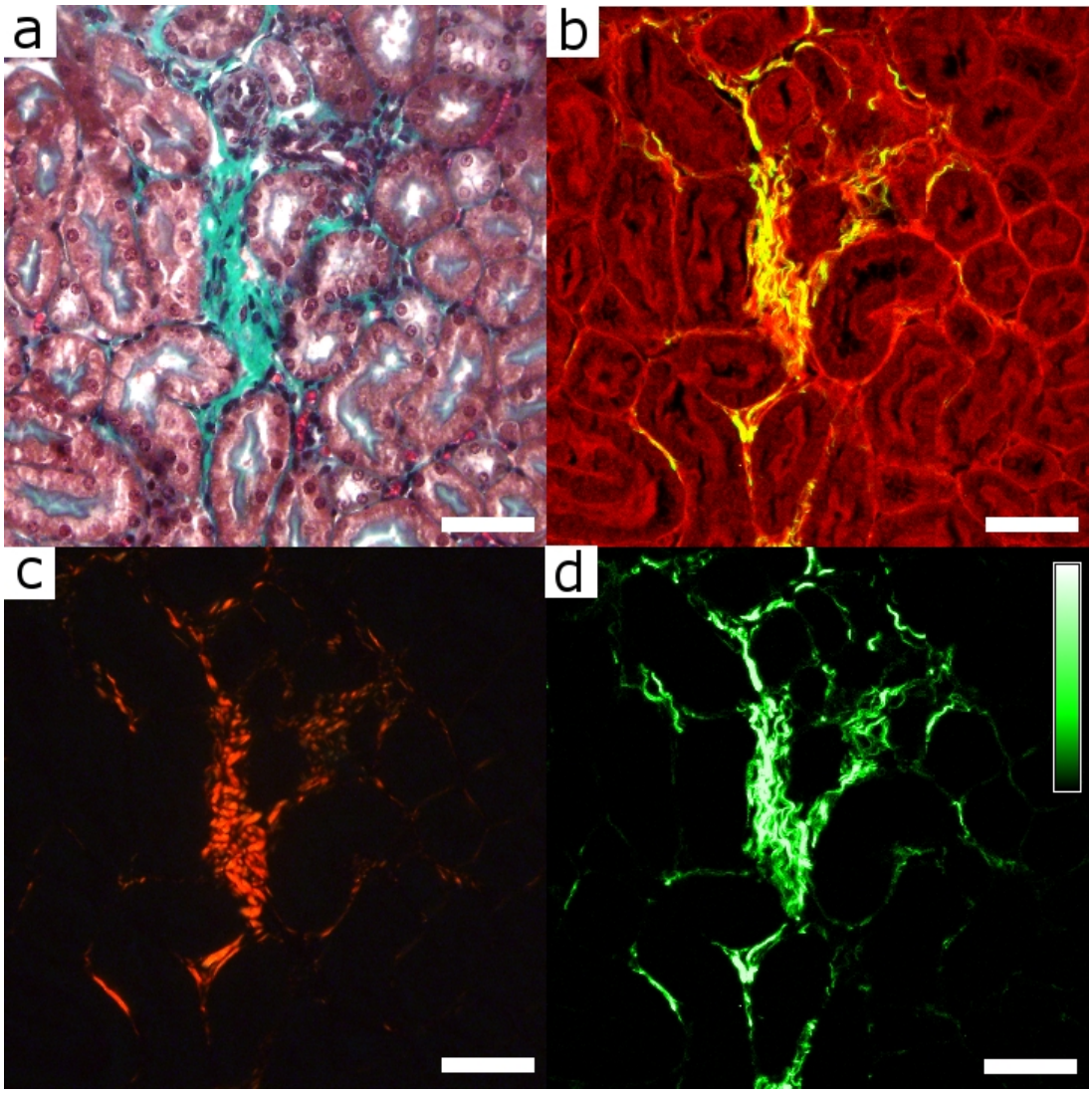


FIGURE 2.22 – Coupes sériées d'un rein de souris montrant une zone fibrosée visualisée par 3 techniques différentes : (a) Trichrome de Masson ; (b) Microscopie Multiphoton 2PEF(rouge)-SHG(vert) ; (c) Rouge Sirius en lumière polarisée ; (d) Microscopie Multiphoton canal SHG seul (LUT dans l'insert) - Barre d'échelle 50 μm ; La coupe utilisée pour la microscopie multiphoton est la même que celle colorée au rouge Sirius et on peut observer une legère fluorescence du colorant.

biréfringence induite par l'échantillon. Dans la configuration en polariseurs croisées, la couleur obtenue pour un déphasage donné correspond à celle des teintes de Newton à centre noir. Nous pouvons noter plusieurs sources de bruit : le coefficient d'extinction des polariseurs, la précision de leur croisement et la biréfringence résiduelle des tissus qui crée un bruit de fond.

Enfin en ce qui concerne la génération de second harmonique, le bruit provient essentiellement de la partie du spectre de fluorescence endogène proche de la longueur d'onde du signal de second harmonique et non rejetée par le filtrage spectral du canal SHG. Cette partie du spectre est petite devant la largeur totale du spectre de fluorescence. Toutefois, si l'efficacité et la concentration des molécules générant un signal de second harmonique est faible comparée à celles des molécules fluorescentes, ce phénomène peut être gênant. Dans nos mesures expérimentales sur des tranches de rein fixé au paraformaldéhyde (PFA), environ un centième de la fluorescence totale est détecté dans le canal de la SHG. Cependant, comme nous acquérons simultanément le reste du spectre de fluorescence sur le canal réservé à la fluorescence, il est possible de corriger en partie l'émission résiduelle de fluorescence sur le canal de second harmonique. Nous reviendrons sur ce point dans le chapitre suivant.

Finalement, comme on peut le voir sur la figure 2.22, la sensibilité de la coloration en rouge Sirius est à peu près équivalente à celle de la microscopie SHG.

2.4.3 Visualisation 3D

Seules les techniques de fluorescence et de génération d'harmonique permettent d'acquérir des volumes tridimensionnels. Cependant, les anticorps ne pénètrent pas profondément ($< 10\mu m$) dans les tissus et seule la microscopie SHG permet au final la visualisation tridimensionnelle du collagène.

2.4.4 Multimodalité

Comme les colorants absorbent fortement la lumière, il est souvent impossible d'utiliser des techniques de fluorescence ou la SHG sur des tissus déjà colorés. En pratique, les techniques de coloration sont toujours utilisées seules. Par contre, plusieurs coupes sériées peuvent être marquées et visualisées avec différentes techniques. Bien que cela ne permette pas une véritable colocalisation des signaux, cela permet de tester différentes hypothèses biologiques.

Les techniques d'immunohistochimie, quant à elles, sont compatibles avec d'autres agents

de contrastes fluorescents. Toutefois, de nombreuses molécules fluorescentes sont sensibles à leur environnement chimique et il faudra s'assurer que les étapes de fixation et de coloration ne détruisent pas les autres fluorophores exogènes. Par exemple, les constructions fluorescentes du type GFP perdent leurs capacités fluorescentes si elles sont dénaturées et sont donc particulièrement sensibles aux processus de fixation et au pH.

Enfin, et c'est l'un des grands avantages de la visualisation du collagène par microscopie SHG, cette dernière technique ne demande aucune préparation préalable et est utilisable sur n'importe quel échantillon tant qu'il n'est pas trop absorbant aux longueurs d'onde d'excitation laser. On trouve dans la littérature des expériences sur des tissus intacts, des tissus fixés au PFA, des sections histologiques paraffinées et des sections congelées[36]. Il est ainsi facile de combiner la microscopie SHG avec différents marqueurs fluorescents que ce soit des anticorps, des molécules organiques ou des protéines fluorescentes. Enfin, c'est la seule technique de visualisation du collagène compatible *in vivo / in situ*.

2.4.5 Reproductibilité

En terme de reproductibilité, les techniques de coloration et de marquage par des anticorps souffrent des variations dues aux étapes de fixation, à l'épaisseur des coupes et à la qualité du marquage. En particulier, l'immunohistochimie n'est en général pas considérée comme quantitative, car elle dépend fortement de la disponibilité des épitopes. Comme la microscopie SHG ne demande pas de préparation préalable, elle est nettement plus reproductible. Il faut toutefois contrôler que les conditions expérimentales (intensité du laser, longueur d'onde...) restent les mêmes.

2.5 Conclusion

La spécificité de la génération de second harmonique pour les collagènes fibrillaires, ses qualités en terme de sensibilité et de reproductibilité, en font une technique de choix pour l'étude de la matrice extracellulaire. De plus, elle offre des possibilités supplémentaires par rapport aux techniques existantes : la possibilité de visualiser le collagène en 3D, la combinaison avec des molécules de type GFP ou encore la possibilité de travailler *in vivo in situ*. Ces différents atouts nous ont amenés à la conclusion que la microscopie SHG pouvait être une méthode pertinente pour l'étude du collagène fibrillaire.

Nous nous sommes alors intéressés à une pathologie spécifique du collagène : les fibroses. Ces pathologies sont liées à une accumulation anormale de fibres de collagène et de matrice extracellulaire dans les organes. Elles sont souvent la réponse de l'organe à une agression comme l'hypertension. Nous avons donc voulu tester le potentiel de la microscopie SHG pour la quantification des fibroses rénales. Les chapitres suivants présentent la méthodologie que nous avons développée, les résultats obtenus ainsi que les perspectives ouvertes par ces études.

Chapitre 3

Quantification des fibroses rénales

Dans ce chapitre, nous allons traiter de la fibrose rénale et de son évaluation à l'aide de la microscopie multiphoton. Dans une première partie, nous décrirons brièvement le rein, sa morphologie, ses fonctions et sa physiologie pour ensuite introduire la fibrose rénale et la problématique biologique à laquelle nous voulons répondre. Une seconde partie sera consacrée à la méthodologie que nous avons mise en oeuvre pour évaluer les fibroses rénales. Enfin dans une dernière partie nous validerons cette méthodologie en l'appliquant à un modèle murin de fibrose rénale.

3.1 Introduction

3.1.1 Le rein

Pour décrire le fonctionnement et l'anatomie du rein, nous nous sommes basés sur les documents suivants :

- *Introduction to the Human Body* de G.J. Tortora (Bergen Community College, Etats-Unis) et S. Reynolds Grabowski (Purdue University, Etats-Unis)[119]
- *Physiologie des reins et des liquides corporels* d'A. Gougoux (Université Montréal, Canada)[120]
- cours en ligne *Le corps humain* de M. Forest (Cégep, St-Jérome, Canada) http ://cours.cegep-st-jerome.qc.ca/101-902-m.f/
- *Histologie fonctionnelle des organes* polycopié de N. Vacheret (Université de Lyon I, France)

Rôle et fonction

Le système urinaire est composé chez la plupart des mammifères, de deux reins, de deux uretères qui amènent l'urine à la vessie et de l'urètre. Il a plusieurs fonctions :

L'élimination des déchets du métabolisme et principalement du catabolisme cellulaire. Par exemple, lorsque les cellules utilisent des acides aminés comme combustible, elles produisent du NH_3 toxique pour le cerveau. Il faut donc qu'il soit rapidement éliminé sous forme d'urée. Parmi les déchets traités par le rein, on peut égalament citer : la bilirubine qui provient de la dégradation de l'hémoglobine, la créatinine produit par les muscles à partir de la créatine phosphatée ou les acides uriques qui sont issus des acides nucléiques.

Le maintien de l'osmolarité Un rôle très important du rein est la régulation de la concentration en ions dans le sang. En fonction de leurs concentrations, le rein va retenir dans le sang ou excréter dans les urines, les ions sodium, potassium, calcium, chlorure, phosphates...

Le maintien du volume d'eau constant dans le corps Le corps perd de l'eau par la transpiration, les selles, l'urine et en gagner grâce à l'alimentation. Le maintien d'un volume constant d'eau se fait au niveau du rein qui va excréter plus d'eau et diluer fortement les urines lorsque nous consommons plus d'eau que nous n'en perdons, et inversement il concentrera les urines lorsque les apports en eau ne compensent pas les pertes.

Le maintien de la pression sanguine est assuré par l'homéostasie du bilan de l'eau et du sodium par le rein sous l'action de plusieurs sous-système neuro-endocriniens.

Production d'hormones Le rein produit deux hormones : la première, le calcitriol (la forme active de la vitamine D) responsable de la régulation du calcium et du phosphore, la seconde l'érythropoïétine qui stimule la production de globules rouges.

Excrétion des substances étrangères Le rein filtre et excréte les substances étrangères comme les médicaments, les colorants alimentaires, ou encore les colorants ou produits de marquage utilisés en imagerie médicale. Ainsi, une déficience rénale peut rendre l'utilisation de produits de contrastes risquée puisqu'ils ne seront pas éliminés correctement par le rein, d'où l'intéret d'avoir des systèmes de visualisation du rein se basant sur un signal endogène.

Anatomie

Anatomie générale

Chez l'homme, les reins sont situés immédiatement sous le diaphragme, plaqués contre la paroi postérieure de la cavité abdominale au niveau des premières vertèbres lombaires et de part et d'autre de la colonne vertébrale. Ils mesurent 12 cm de longueur en moyenne chez l'adulte et ont la forme de haricots [fig.3.1].

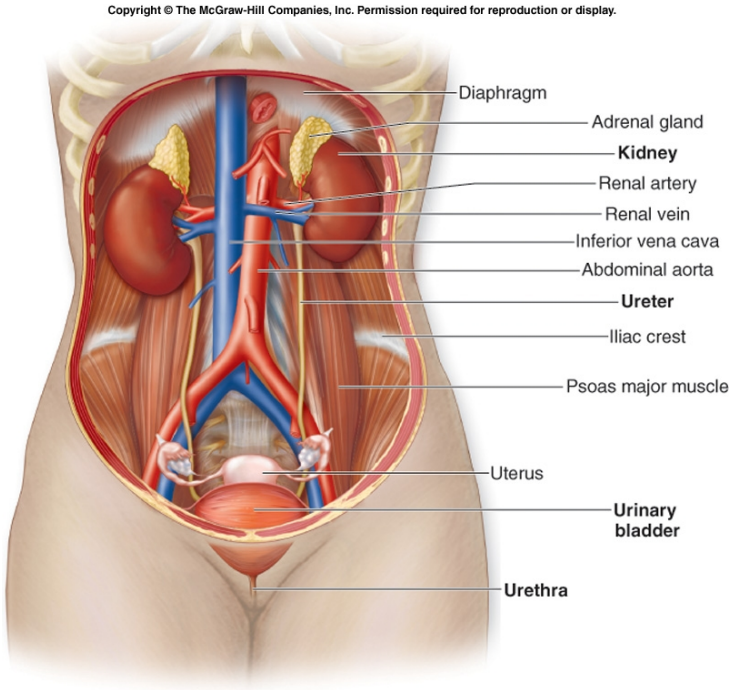


FIGURE 3.1 – L'appareil urinaire [source : McGraw-Hill Companies]

Les reins sont protégés par trois couches tissulaires : le fascia rénal, la capsule adipeuse et la capsule rénale. Le fascia rénal est composé d'une fine couche de tissu conjonctif et fixe les reins aux organes adjacents. La capsule adipeuse maintient les reins dans une loge derrière le péritoine. La troisième couche, la capsule rénale est composée principalement de fibres de collagène et d'élastine ; elle recouvre directement la surface du rein.

Le sang arrive dans chacun des reins par une artère rénale et en ressort par la veine rénale. Les reins reçoivent environ 20% du débit cardiaque soit à peu près un litre par minute qu'ils vont filtrer pour produire approximativement 1 millilitre d'urine par minute. La composition sanguine à l'entrée et à la sortie du rein est très différente puisque le rein aura filtré le sang. Ces deux vaisseaux arrivent dans le rein au niveau du hile, où se branche aussi l'uretère.

L'intérieur du rein peut se décomposer en 3 grandes régions [fig.3.2] :

Le cortex rénal est la région la plus externe du rein. C'est dans cette région que se trouvent les glomérules qui constituent la structure microvasculaire élémentaire où s'effectue la filtration du plasma sanguin en urine primitive. Celle-ci est ensuite collectée par un système tubulaire qui achemine l'urine jusqu'au bassinet et permet les multiples ajustement décrit précédemment (concentration et dilution de l'urine, transport, sécrétion et réabsorption de molécules endogènes et exogènes). Le cortex contient une partie du système tubulaire : les parties contournées distales et proximales des tubules dont nous verrons la fonction par la suite.

La médulla est une zone intermédiaire dans laquelle se prolonge l'anse de Henlé des tubules et où passent les tubules collecteurs. Ces derniers collectent l'urine produite par différent tubules et vont l'acheminer vers la papille.

La papille située à la pointe de la médulla, est en contact direct avec un calice mineur, sorte d'entonnoir dans lequel se déverse l'urine finale avant de rejoindre un calice majeur, le bassinet et enfin l'uretère.

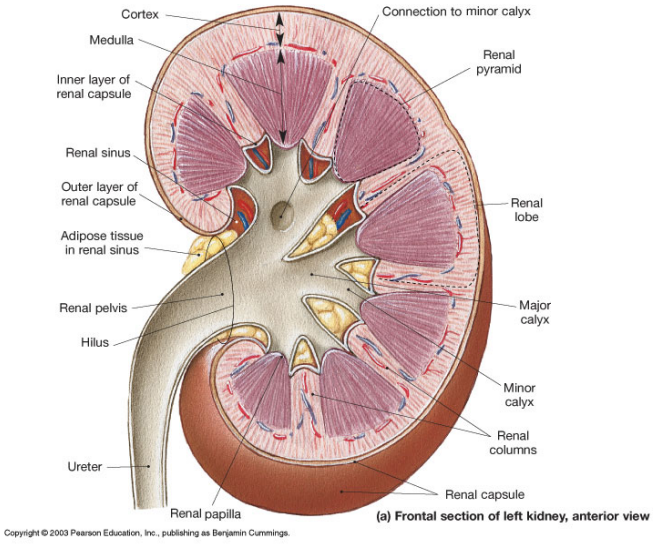


FIGURE 3.2 – Le rein [source : Pearson Education - Benjamin Cummings]

A la différence de l'homme, la souris qui nous servira de modèle par la suite ne possède qu'un seul lobe par rein.

Vascularisation

La hiérarchie des vaisseaux dans le rein est la suivante [fig.3.3] :

- artère rénale qui amène le sang dans le rein
- artères segmentaires
- artères interlobaires qui remontent du hile vers le cortex autour de la papille
- artères arquées qui se situent à la limite entre le cortex et la médulla
- artères interlobulaires qui plongent dans le cortex
- artérioles afférentes qui amènent le sang au glomérule
- capillaires glomérulaires qui forment le floculus
- artériole efférente par où ressort le sang du glomérule
- capillaires péritubulaires qui forment un réseau dense autour des tubules

Le système veineux suit les mêmes étapes dans le sens inverse : veines interlobulaires, veines arquées, veines interlobaires, veines segmentaires, veine rénale.

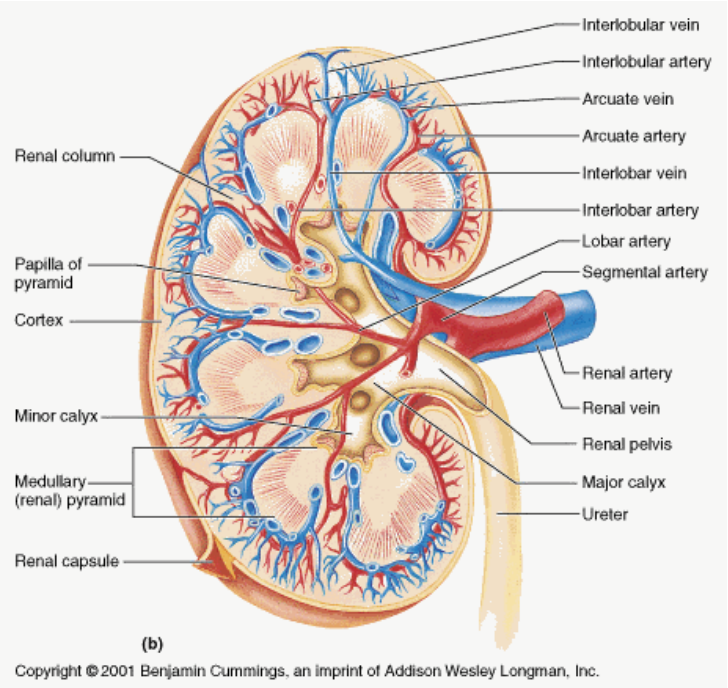


FIGURE 3.3 – La vascularisation du rein [source : Benjamin Cummings - Addison Wesley Longman]

Le néphron

L'unité fonctionnelle et structurale du rein est le néphron [fig.3.4] : le rein adulte en contient plus d'un million qui fonctionnent en parallèle pour transformer et excréter l'urine. Ils sont composés d'un glomérule qui filtre le plasma et d'un tubule rénal rattaché au glomérule qui

achemine l'urine jusqu'aux tubules collecteurs et va, par des échanges entre le sang et l'urine, modifier et réguler la composition de l'urine. Les explications sur la physiologie des reins sont tiré de livre d'André Gougoux, *Physiologie des reins et des liquides corporelles*[120].

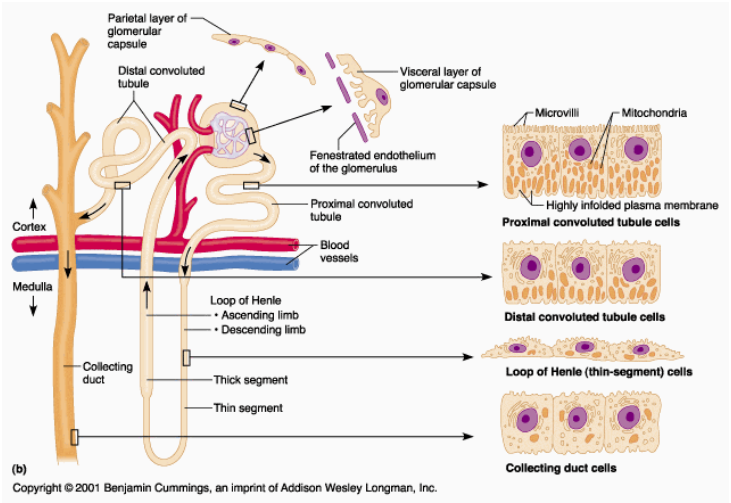


FIGURE 3.4 – Le néphron [source : Benjamin Cummings - Addison Wesley Longman]

Le glomérule [fig.3.5] est constitué d'une artériole afférente qui se divise en un réseau de capillaires, le floculus, qui vont se rejoindre à nouveau pour former l'artériole efférente. Le floculus est entouré de la capsule de Bowman qui draine le filtrat du sang. Le filtre glomérulaire est composé des cellules endothéliales fenestrées des capillaires, de la membrane basale glomérulaire et des cellules épithéliales viscérales (ou podocytes). La barrière glomérulaire ne laisse passer que les petites molécules. La charge et la flexibilité des molécules influent aussi sur leur filtration. Au final, c'est la perméabilité de la membrane, la pression osmotique et la pression hydrostatique qui vont déterminer la filtration glomérulaire.

La capsule de Bowman se prolonge par un tubule qui possède plusieurs sections distinctes dans lesquelles vont se faire les échanges entre le sang et le filtrat pour former l'urine. La première partie du tubule, le tubule proximal, serpente dans le cortex. Elle a de très nombreuses microvilosités à sa surface luminale qui sont responsables de l'apparence en brosse au microscope et augmentent d'un facteur 40 la surface d'échange des cellules qui bordent l'urine. Les cellules épithéliales proximales consomment une grande partie de l'énergie métabolique utilisée par le rein pour réabsorber de façon active plusieurs solutés organiques et inorganiques[120].

Le tubule se poursuit ensuite par l'anse de Henlé qui descend dans la médulla et dont la

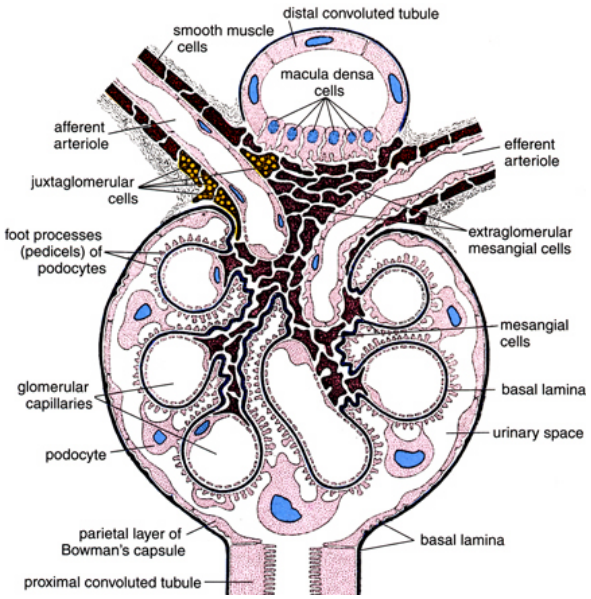


FIGURE 3.5 – Le Glomérule [source : Histology : A Text and Atlas - by M.H. Ross L.J. Romrell and G.I. Kaye]

section est plus fine. Son épithélium est constitué de cellules aplaties avec seulement quelques organelles. La partie descendante fine de l'anse de Henlé est très perméable à l'eau, mais peu à l'urée et au chlorure de sodium. Au contraire, la partie ascendante de l'anse est imperméable à l'eau. Ces changements de perméabilité établissent des gradients de pression osmotique. Ceux-si permettent de transférer des ions et d'autres petites molécules de manière passive soit par diffusion libre, soit à l'aide de canaux membranaires. Ces deux processus ne nécessitent pas d'apport énergétique sous forme d'ATP.

Le tubule distal chemine encore une fois dans le cortex et repasse au contact du glomérule dont il est issu. C'est au niveau de la macula densa qu'il rencontre les artérioles afférentes et efférentes avant de converger avec d'autres tubules vers un tubule collecteur. Ce retour au glomérule permet une rétroaction entre le contenu sanguin et le contenu de l'urine après son passage dans le néphron, ce qui sert à ajuster la filtration du néphron. Les trois segments du tubule n'ont pas le même rôle, la partie proximale du tubule réabsorbe à elle seule les 2/3 de l'eau, une grande partie des électrolytes et la totalité des substances essentielles à l'organisme comme le glucose, les acides aminés et les protéines. Les autres parties servent essentiellement à des ajustements fins des concentrations en ions, et à la concentration ou la dilution des urines.

3.1.2 La fibrose rénale

La fibrose rénale n'est pas une maladie à proprement parler, mais la résultante de diverses néphropathies chroniques qu'elles soient causées par le diabète, une maladie auto-immune, l'hypertension artérielle... Quelle que soit la cause initiale de la néphropathie, on retrouve des lésions de sclérose des glomérules et un phénomène de fibrose dans l'espace interstitiel s'ajoutant aux lésions spécifiques de chacune de ces maladies. La sclérose et la fibrose sont des processus liés à l'accumulation anarchique de matrice extracellulaire, mais l'organisation et la composition de cette matrice diffèrent entre les deux processus. Comme son nom l'indique, la fibrose est la production en excès de matrice extracellulaire fibrillaire et est composée essentiellement de fibre de collagène (type I, III...). Au contraire, la sclérose est liée à un développement anormal de matrice extracellulaire non fibrillaire (collagène IV ...) dans le glomérule. Ces processus vont entrainer au final une insuffisance rénale terminale dont les seuls traitements possible seront alors la dialyse ou la greffe.

En France, environs deux millions de personnes souffrent d'insuffisance rénale chronique avant le stade terminal. L'insuffisance rénale chronique terminale touche quant à elle 45000 malades. L'intérêt de développer de nouvelles techniques de diagnostic, pour étudier les mécanismes de fibrose ou mettre au point de nouveaux médicaments est donc très important. Qui plus est, l'incidence et la prévalence de l'insuffisance rénale sont en constante augmentation du fait du vieillissement de la population et de l'augmentation des pathologies vasculaires et métaboliques (hypertension, diabète...).

Lors de la fibrose rénale, on assiste à la destruction de l'architecture rénale et à une raréfaction cellulaire associée à une augmentation des dépôts de matrice extracellulaire. Prenons l'hypertension, une cause connue de néphropathie[121;122], comme exemple : elle entraine des lésions à la fois au niveau des glomérules, mais aussi des vaisseaux et provoque l'apparition d'une fibrose interstitielle. Certains de ces mécanismes d'action sont connus :

– L'hypertension artérielle entraine l'élévation de la pression dans les capillaires glomérulaires et augmente les débits individuels de filtration. La hausse de la pression entraine une perméabilité plus élevée de la membrane glomérulaire qui est responsable de la perte de protéines dans les urines. Il y a alors production de matrice extracellulaire pour renforcer la membrane basale et rétablir la fonction rénale. Cependant, une sollicitation prolongée et l'excès induit de matrice extracellulaire conduisent à la sclérose du

glomérule. On observe en parallèle une raréfaction des néphrons qui va en s'accélérant, puisque la perte d'un néphron accroît le stress appliqué aux autres.

– Des études[123] ont montré un remodelage adaptatif des vaisseaux sanguins lorsque ceux-ci sont soumis à une pression accrue. Ce remodelage modifie la structure des vaisseaux et pourrait expliquer que l'on observe également une fibrose périvasculaire dans le rein.

Toutefois, la fibrose rénale qui s'étend dans tout le cortex et la médullaire s'explique mal si on ne prend en compte qu'une atteinte des glomérules et des vaisseaux. Il est donc crucial de mieux identifier les sources de la fibrose interstitielle. Des études expérimentales et cliniques récentes ont montré que les cellules des tubules pouvaient subir une transition épithéliale mésanchimateuse (EMT) et de ce fait acquérir des caractéristiques myofibroblastiques. Ce changement phénotypique bien caractérisé pour la cellule tubulaire proximale a été également observé pour les cellules mésangiales et les cellules épithéliales glomérulaires[124]. En effet, sous l'effet du $TGF-\beta$, les cellules épithéliales tubulaires perdent leur capacité d'adhésion cellulaire et leur polarisation. Elles synthétisent alors de l'α-actine et des métalloprotéases (MMP). L'altération de la membrane basale tubulaire par les MMP favoriserait ensuite la migration des myofibroblastes devenus capables de synthétiser la matrice extracellulaire à l'origine de la fibrose interstitielle.

Des cellules circulantes de la moelle osseuse, les fibrocytes sont d'autres sources possibles de myofibroblastes qui pourraient intervenir dans la fibrose rénale. Ainsi, il existe de nombreuses cellules potentiellement responsables de la fibrose interstitielle. C'est pourquoi il est indispensable de développer des outils permettant de mieux comprendre l'origine et l'accumulation du collagène dans les pathologies rénales.

On a longtemps cru que la progression des lésions de fibrose et de sclérose était irrémédiable et irréversible. Ce jugement a ensuite été remis en cause par l'efficacité des traitements antihypertenseurs qui préviennent la progression de la fibrose. Par ailleurs, Fioretto *et coll.*[125] ont présenté une étude sur la régression de la glomérulosclérose diabétique après une transplantation pancréatique. D'autres études expérimentales et cliniques ont elles aussi montré que dans certaines conditions la sclérose des glomérules pouvait régresser[125;126] ainsi que la fibrose des vaisseaux[127]. Par contre, aucune étude n'a été réalisée sur la régression de la fibrose interstitielle.

L'étude de l'évolution de la fibrose interstitielle pose plusieurs problèmes. D'une part, contrairement à l'étude de la sclérose glomérulaire ou de la fibrose des vaisseaux, la fibrose

interstitielle s'étend sur de grands volumes moins bien définis. De plus, son développement semble assez hétérogène avec une structure tridimensionnelle complexe ce qui la rend difficile à observer. D'autre part, habituellement les praticiens utilisent des coupes colorées pour évaluer l'état de fibrose interstitielle. Cette évaluation est donc dépendante de la subjectivité de l'opérateur et peut varier à cause des problèmes de reproductibilité et de spécificité des techniques de colorations. Ainsi dans le score de Banff, qui sert à évaluer les biopsies rénales dans le cadre de transplantations, le critère relatif à la fibrose interstitielle est le moins fiable[46]. Comme la génération de second harmonique a la capacité de visualiser les collagènes fibrillaires spécifiquement et possède de grandes qualités en terme de sensibilité et de reproductibilité, nous avons voulu tester cette méthode pour la quantification des fibroses rénales. Qui plus est, les possibilités de visualisation tridimensionnelle *in vivo* et sa combinaison avec l'observation de protéines fluorescentes permettent d'envisager des études plus poussées sur les mécanismes biologiques à l'origine de la fibrose que celles permises par les techniques conventionnelles.

3.1.3 Sources de contraste dans le rein

Contrastes SHG et 2PEF

La première étape de notre étude a été d'imager un rein témoin pour connaître les sources de contraste utilisables en microscopie multiphoton. Nous avons ainsi testé notre technique sur deux types d'échantillons :

- des coupes épaisses réalisées dans un rein fraichement disséqué. Nous avons veillé à ne pas dépasser 2 h entre le décès de la souris et la fin des expériences sur la coupe. Les conditions sont alors assez proches de celles de l'imagerie *in vivo* bien qu'on ne puisse pas exclure que les signaux de mort cellulaire n'induisent pas de changements au niveau de la morphologie ou au niveau de la localisation et de la concentration de diverses espèces fluorescentes.
- des coupes épaisses de rein de souris fixés au PFA et conservés dans le PBS. Ce type d'échantillon est plus simple à manipuler, car il ne se dégrade pas avec le temps. Par la suite, c'est ce type d'échantillons qui sera utilisé pour la quantification de la fibrose rénale.

Pour commencer, nous allons présenter l'allure générale des images de rein de souris réalisées au microscope multiphoton et faire le lien entre la morphologie du rein détaillée dans le

paragraphe précédent 3.1.1 et les structures identifiables sur les images. La figure 3.6 montre une coupe transversale de rein de souris fixé au formol. On peut remarquer trois zones sur la sous-figure 3.6(a) : le cortex, la médulla et la papille. On distingue aussi une artère arquée au niveau de la jonction cortico-médullaire. Si l'on agrandit chacune de ces zones, on voit que la fluorescence 2PEF permet de visualiser les tubules puisque le cytoplasme des cellules les composant est fluorescent. Par contre, les noyaux des cellules ne sont pas fluorescents et apparaissent sur les images comme des taches circulaires foncées [fig.3.6(c :N)]. On remarque que les tubules du cortex sont plus fluorescents que ceux présents dans la médulla ou la papille. Cette différence d'intensité pourrait être liée à l'activité cellulaire puisque les tubules du cortex consomment plus d'énergie que les autres et pourraient donc présenter des concentration de NAD(P)H plus importante. L'allure des tubules n'est pas non plus la même en fonction de la zone. Au niveau du cortex, les tubules serpentent dans toutes les directions, alors qu'ils ont une direction radiale dans la médulla. Dans la papille, les tubules sont aussi assez alignés, mais leur direction principale est perpendiculaire au plan de la coupe. Enfin, sur la figure 3.6(d), on peut voir un glomérule avec le tubule proximal qui l'entoure.

La génération de second harmonique est, quant à elle, assez faible. Peu de zones de l'image présentent un niveau de signal détectable. La principale source de signal, dans les souris qui n'ont subi aucun traitement, est le collagène présent dans l'adventice des artères les artères. On peut distinguer quelques zones comportant du collagène dans la médulla. Ceci n'était pas attendu, car le collagène fibrillaire est considéré comme absent des zones interstitielles à l'état natif ; nous y reviendrons par la suite.

Etude spectrale de la fluorescence endogène

Afin de mieux caractériser la fluorescence endogène dans le tissu rénal, nous avons réalisé des spectres sur des tranches épaisses de reins de souris fraichement disséqués ou fixés. Nous avons acquis les images sur deux canaux. Le premier est le canal résolu spectralement qui nous permet d'enregistrer le spectre émis en chaque pixel. Le second est le canal en transmission sur lequel nous avons simplement placé deux filtres passe-bas (Chroma E680SP) afin de détecter toute la fluorescence de 360 à 680 nm et de pouvoir corriger d'un éventuel photoblanchiment. En fonction de l'intensité relative sur chacun des canaux nous avons placé un filtre gris (Schott NG5 ou NG4) sur la voie en transmission pour rééquilibrer les signaux. Nous avons aussi fait varier le temps d'acquisition pour obtenir un rapport signal sur bruit correct. Enfin, nous

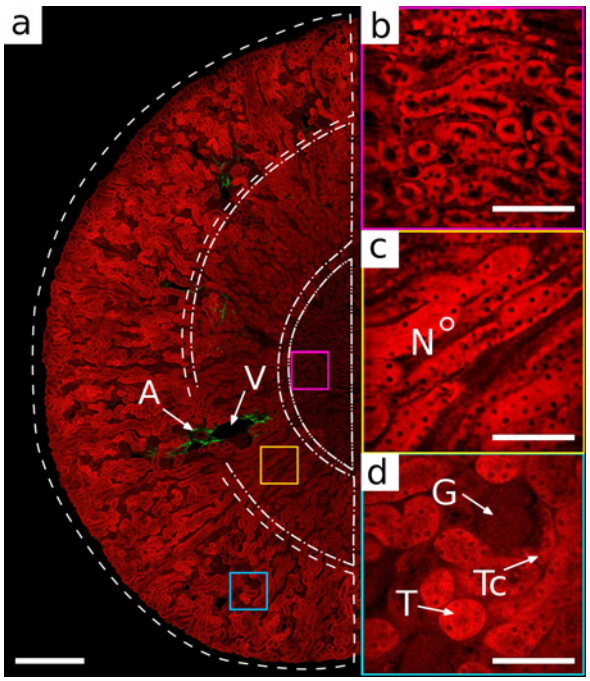


FIGURE 3.6 – Image multiphoton d'une coupe transversale de rein de souris fixé : le signal 2PEF est représenté en rouge, le signal SHG en vert. (a) image grand champ de la coupe : − − − le cortex, − · − la médulla, − ··− la papille ; on remarque une artère arquée (A) et la veine arquée correspondante (V) [barre d'échelle 500 μm] ; (b-d) zoom sur les zones encadrées sur (a) [barre d'échelle 100 μm] ; (b) papille ; (c) médullaire (N : noyau) ; (d) cortex avec un glomérule (G) et son tubule proximal (Tc) et un tubule (T). Excitation laser 860 nm, taille pixel $0,8$ μm

avons utilisé deux longueurs d'onde d'excitation : 730 nm et 860 nm pour une puissance sur l'échantillon d'environ 50 mW. Les spectres donnés sont corrigés de la réponse en longueur d'onde de la voie spectrale (cf paragraphe 2.2.5). L'objectif utilisé est l'Olympus XLUMPFL 20x W/IR 0,95NA.

La figure 3.7 montre les images acquises sur le canal en transmission pour un rein frais et pour un rein fixé excités à 730 nm (a ;c) et 860 nm (b ;d). Dans le cas du rein 'frais', une différence dans la localisation du signal de fluorescence apparaît au niveau des tubules. A 730 nm, le signal de fluorescence est localisé dans tout le cytoplasme alors qu'à 860 nm il est restreint au pôle apical des cellules ou au filtrat à l'intérieur du tubule. Lorsque le rein est fixé, la localisation du signal de fluorescence est semblable pour les 2 longueurs d'onde d'excitation ; elle ressemble à celle du rein frais à 730 nm. Il en est de même pour les autres zones du rein. La fixation semble ainsi élargir et déplacer les spectres d'absorption des fluorophores endogènes.

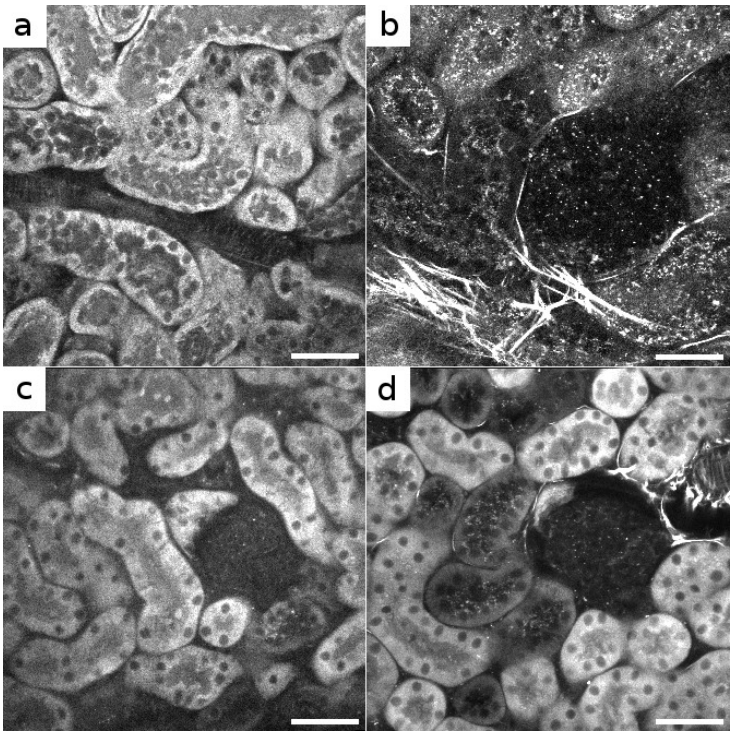
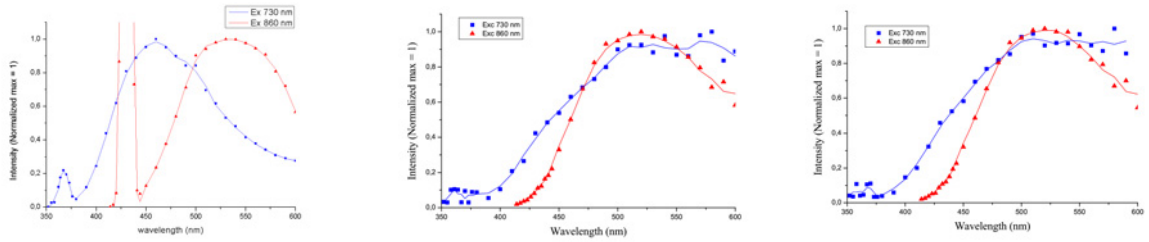


FIGURE 3.7 – Effet de la fixation et de la longueur d'onde d'excitation sur l'imagerie multiphoton du cortex rénal : les signaux SHG et 2PEF sont acquis par le même détecteur en transmission sur des coupes coronales de rein de souris ; (a et b) rein frais ; (c et d) rein fixé au formol ; (a et c) excitation à 730 nm ; (b et d) excitation à 860 nm

La figure 3.8(a) présente des mesures préliminaires des spectres d'émission de fluorescence dans le rein frais. Quelle que soit la zone étudiée (cortex, médulla, papille), les spectres d'émission de fluorescence sont similaires, à part au niveau des artères à cause de l'élastine qu'elles contiennent.

On observe un maximum d'émission vers 460 nm pour une excitation à 730 nm et vers 530 nm pour une excitation à 860 nm. A priori, la fluorescence endogène détectée sous excitation à 730 nm provient principalement du NADH et secondairement des flavines. A une excitation de 860 nm, le NADH n'est quasiment plus excité et la fluorescence provient essentiellement des flavines [fig.2.6]. Les spectres de fluorescence du rein fixé dans le formol présentent des modifications complexes. Le spectre de fluorescence pour une excitation à 730 nm subit un fort décalage vers le rouge et certaines composantes présentes dans le spectre sous excitation à 860 nm semblent absentes. Cependant, ces mesures doivent être vérifiées car le spectre pourrait être déformé au moment de la correction à cause de la faible détectivité du canal résolu spectralement au délà de 500nm. Quoiqu'il en soit, notre approche reste ici pragmatique et vise essentiellement à valider la méthodologie que nous allons décrire par la suite.



(a) Frais : Cortex (b) Fixé : Cortex (c) Fixé : Médulla

FIGURE 3.8 – Spectres d'émission de fluorescence normalisés mesurés sur des rein frais et fixés au formol pour une excitation biphotonique à 730 nm et à 860 nm. Le pic de SHG se situe à $\lambda_{ex}/2$. Ces spectres sont réalisés sur une zone d'environ 300 μm de côté

Ainsi, si la fixation modifie de façon importante les spectres d'émission de fluorescence, qualitativement l'image obtenue en microscopie 2PEF est similaire de celle obtenue avec une excitation à 730 nm pour un tissu frais, et en pratique, une fois le tissu fixé, la fluorescence provient majoritairement du cytoplasme cellulaire. Ceci permet de bien observer la morphologie des tubules et de se repérer dans le tissu. Nous avons choisi d'effectuer la quantification de

la fibrose rénale pour une excitation à 860 nm. En effet, les images du rein fixé sont similaires à 730 nm et 860 nm, mais la pénétration dans le tissu est meilleure à cette longueur d'onde (cf annexe 5.2).

3.2 Méthodologie

Nous allons exposer ici les protocoles que nous avons mis au point pour étudier la fibrose rénale sur un modèle murin. Afin d'assurer la reproductibilité et la fiabilité de nos mesures, nous avons élaboré une procédure très précise : que ce soit au niveau de la coupe, de la fixation, des paramètres d'imagerie et de l'analyse des données, toutes les étapes sont identiques pour tous les échantillons que nous avons étudiés. Notre but est de limiter ainsi au maximum la variabilité de nos mesures.

3.2.1 Protocoles et méthodes : microscopie multiphoton

Préparation des échantillons

L'imagerie multiphoton a été effectuée sur des échantillons de rein de souris fixé au formol. Une fois la souris sacrifiée, les deux reins sont prélevés. Une moitié de l'un des reins est réservée pour l'imagerie multiphoton, l'autre moitié ainsi que le second rein sont destinés à d'autres mesures (coloration au trichrome de Masson, immunohistochimie, quantification de protéine par PCR ...). Le rein est coupé dans un plan coronal passant par le hile. Le demi-rein destiné à être observé au microscope multiphoton est alors plongé dans une solution de PBS contenant 4 % de PFA pendant 12 h au minimum. Ensuite, le demi-rein est rincé avec du PBS avant d'être découpé en tranche de 200 μm au vibratome (Leica VT100S). Afin de toujours observer des zones équivalentes du rein, nous mesurons au préalable la hauteur du demi-rein pour prélever la tranche de 200 μm à la moitié de la hauteur du demi-rein [fig.3.9]. La coupe de rein est alors conservée dans du PBS jusqu'à son observation dans les 15 jours suivant le sacrifice.

Protocole d'acquisition

Pour assurer la reproductibilité de nos mesures, nous calibrons soigneusement la puissance effective du laser sur l'échantillon et nous réglons ensuite l'atténuation pour obtenir 50 mW

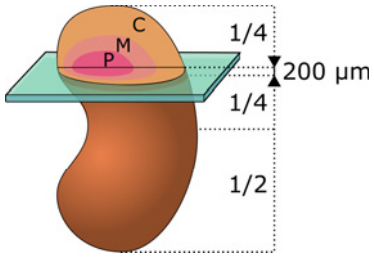


FIGURE 3.9 – Position de la coupe épaisse utilisée pour la quantification de la fibrose

après l'objectif. Bien que cette puissance soit assez élevée, elle n'entraine pas de dommages sur la coupe fixée et relativement peu de photoblanchiment.

Des expériences préliminaire sur des zones de $2 \times 0,5\ mm^2$ ont montrées que l'incertitude de la quantification de la fibrose rénale était trop importante en raison de l'hétérogénéité de la fibrose. Ceci nous a conduits à acquérir des zones plus grandes et à automatiser le processus. Les limites sur la durée d'imagerie totale nous ont alors contraint à sous-échantillonner nos images : nous avons choisi une taille de pixel de $0,8\ \mu m$ en deça de la résolution latérale du microscope ($0,4\ \mu m$). Ce compromis nous permet de résoudre de petites fibres sur une zone d'intérêt de $2340\mu m \times 4640\ \mu m$ pour un temps d'acquisition d'environ $1\ h$. Nous avons aussi augmenté la puissance du laser jusqu'à $50\ mW$ pour améliorer le rapport signal sur bruit et la détectivité de notre montage tout en limitant le temps d'acquisition par pixel à $10\mu s$.

En pratique, l'échantillon est placé entre deux lamelles sous l'objectif. Nous acquérons successivement des images de $270 \times 270\ \mu m^2$ (soit $339 \times 339 pixels^2$) en imposant un recouvrement de $40\ \mu m$ entre les images adjacentes [fig.3.10(a)]. Les images sont ensuite assemblées pour obtenir une vue grand champ du rein. De plus, nous acquérons 8 plans espacés de $5\ \mu m$ selon l'axe Z à partir de la surface du rein. Cela représente $10 \times 20 \times 8 = 1600$ images codées en 16 *bits* sur chacun des 2 canaux SHG et 2PEF enregistrés simultanément, soit au total 700 $Moctets$ de données acquises par échantillon rénal.

L'acquisition automatique de grandes zones avec une technique 3D pose un problème d'horizontalité et de planéité de l'échantillon. Le plan d'imagerie est le plan perpendiculaire à l'axe optique du système. Or la surface de l'échantillon n'est pas forcément parallèle à ce plan [fig.3.10(b)]. Comme notre technique a un sectionnement optique d'environ $2\ \mu m$, il faudrait idéalement que les défauts de planéité soient inférieurs à $2\ \mu m$ et ceci sur toute la zone visualisée. Cela revient à une erreur angulaire inférieure à $1'30''$ d'arc. Pour pallier ce problème, notre atelier de mécanique a conçu un porte-échantillon dont l'horizontalité est réglable. Avant

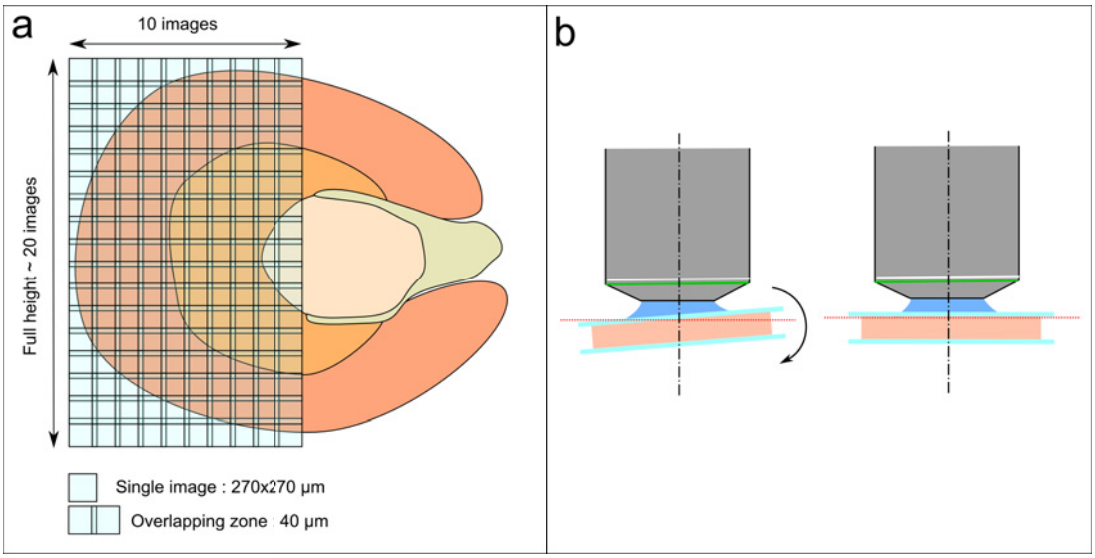


FIGURE 3.10 – (a) : Schéma de la zone imagée et principe de la mosaïque d'image ; (b) Correction de l'angle entre l'échantillon et le plan focal

de commencer une acquisition, nous nous assurons que la surface de l'échantillon est bien parallèle au plan d'imagerie. Cependant, même si l'échantillon est maintenu entre 2 lamelles, sa surface n'est jamais parfaitement plane. La profondeur d'imagerie n'est donc pas identique sur toute la zone observée et présente typiquement un défaut de planéité de 10 μm entre le point culminant et le point le plus bas. Toutefois, ce biais de mesure est systématique et ne fausse pas la comparaison entre 2 groupes de souris.

Traitement des images

L'algorithme de traitement des images visant à améliorer la détection des petites fibres est donné par le schéma 3.11. Il a été codé avec les logiciels Matlab (Matlab 6, MathWorks Inc.) et ImageJ (ImageJ 1.40g, Wayne Rasband, National Institutes of Health). Nous allons en expliquer le principe et les différentes opérations.

Correction du vignetage

Notre microscope est atteint d'un léger vignetage, c'est à dire que l'intensité au centre de l'image est plus forte que sur les bords. Pour corriger celui-ci, nous le mesurons en plaçant un échantillon uniformément fluorescent, comme une lame fluorescente en plastique [fig.3.12], sous le microscope. L'image obtenue est alors interpolée par un polynôme du second ordre pour obtenir une approximation de la réponse du microscope. Cet ajustement est nécessaire

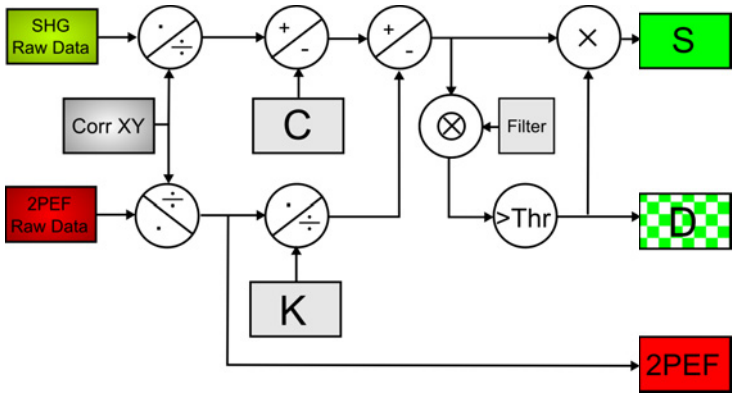


FIGURE 3.11 – Schéma de l'algorithme ; CorrXY est la correction du vignetage ; $C = 0,02$; $K = 60$; filtre : Moyenne (3x3) ; Seuil $Thr = 1,7$

pour éviter que le bruit de l'image de la lame fluorescente ne pollue ensuite les images du rein. Les images de fluorescence et de SHG acquises sur l'échantillon de rein sont par la suite corrigées en les divisant par la réponse du microscope [fig.3.14(b ;h)]. Nous n'effectuons pas de correction pour l'atténuation du signal en fonction de la profondeur (cf. annexe 5.2). En effet, à cause des défauts d'horizontalité, nous ne connaissons pas exactement la profondeur à laquelle chaque image a été réalisée. A cause de ces incertitudes, la correction de l'atténuation du signal en fonction de la profondeur augmente trop le bruit de fond. De plus, même si dans l'absolu ces corrections permettent d'avoir une meilleure idée du volume occupé par les fibres, la sous-évaluation est à peu près la même pour tous les échantillons puisque les acquisitions sont toujours réalisées dans les mêmes conditions expérimentales.

Soustraction du bruit de fond

Une fois cette première étape réalisée, nous avons voulu optimiser la détection de fibres de collagène. En effet, nos images sont détériorées par différentes sources de bruit :

- Une petite partie du spectre de fluorescence recouvre les longueurs d'onde détectées par le canal normalement réservé au signal SHG
- Chaque détecteur possède un bruit de photon propre d'environ 100 photons par seconde
- Le processus de détection de photon unique possède intrinsèquement un bruit avec une distribution de Poisson

Même si ce bruit est faible, comme le volume occupé par les fibres est très petit par rapport au volume total imagé, le signal est rapidement noyé par le bruit. Notre idée initiale était d'utiliser un seuil pour supprimer totalement le bruit de fond. Mais comme le bruit

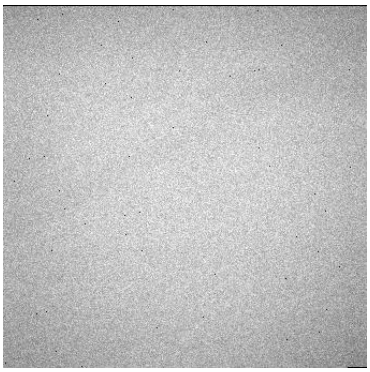


FIGURE 3.12 – Image de 270×270 μm^2 d'une lame fluorescente uniforme. Le vignetage est caractérisé par une inhomogénéité du signal : moins important sur les bords qu'au centre de l'image

de fond était assez élevé, nous aurions dû placer le seuil à une valeur qui aurait également supprimé une partie du signal provenant de petites fibres. Notre algorithme commence donc par éliminer une partie du bruit pour ensuite appliquer un seuil.

Pour corriger la fuite de fluorescence dans le canal détectant le signal SHG [fig.refFigFluoBleedTrough] nous tirons parti du fait que le spectre de la fluorescence endogène des échantillons fixés pour une excitation à 860 nm est identique sur l'ensemble de la zone imagée (voir paragraphe 3.1.3). Ainsi, on peut soustraire à l'image obtenue sur le canal SHG, l'image obtenue dans le canal de fluorescence multiplié par un facteur correctif adéquat.

Ce facteur peut être calculé à partir de la détectivité des 2 canaux calculés au paragraphe 2.2.4 et des spectres de fluorescence endogène mesuré précédemment (paragraphe 3.1.3). Nous trouvons que l'intensité du signal de fluorescence sur la voie SHG est 85 fois plus faible que l'intensité détectée sur le canal de fluorescence.

Cette valeur peut aussi se mesurer directement sur les images. Il suffit de mesurer la valeur moyenne sur les 2 canaux dans une zone où il n'y a pas de collagène et d'en faire le rapport. Le résultat est alors d'environ 60. Les deux valeurs concordent à peu près, mais nous avons préféré utiliser celle mesurée directement sur les images, donc plus fiable.

On peut voir sur la figure 3.14(c ;i) que cette étape diminue fortement le bruit de fond. Nous soustrayons ensuite le bruit moyen sur une zone en dehors du rein, soit $0,02$ photons.

Filtrage

L'étape suivante est d'appliquer un filtre moyen (3x3). Cette étape se justifie par la na-

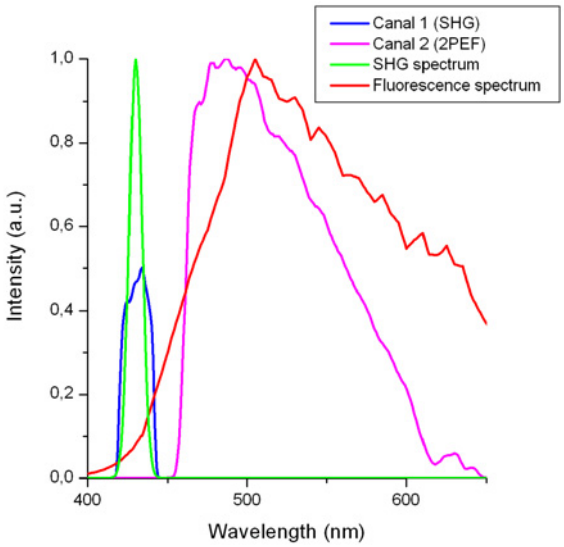


FIGURE 3.13 – Fuite de fluorescence dans le canal détectant le signal SHG : (Bleu) Détectivité du canal SHG ; (Rose) Détectivité du canal 2PEF ; (Vert) Spectre SHG ; (Rouge) Spectre 2PEF endogène

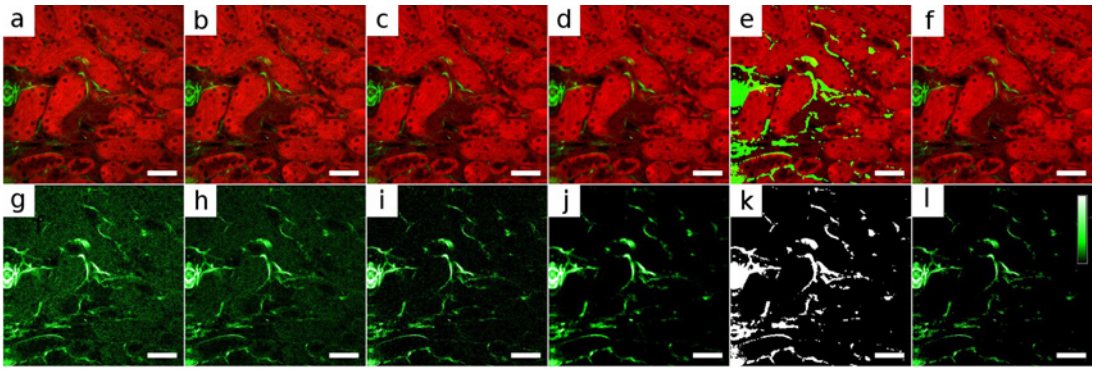


FIGURE 3.14 – Application de l'algorithme de traitement d'images : (a-f) Superposition du signal 2PEF (rouge) et du signal SHG (vert) ; (g-l) images SHG seules (LUT utilisé en (l)) correspondantes ; (a ;g) images brutes (b ;h) après correction du vignetage (c ;i) après soustraction du bruit de fluorescence résiduel détecté dans le canal SHG ; (d ;j) après l'application du flou (3×3) ; (e ;k) après application du seuil ; (f ;l) images finales

ture du bruit de l'image par rapport à la structure des fibres. En effet, l'intensité du bruit est décorrélée entre 2 pixels adjacents. Au contraire, l'intensité du signal SHG provient de structures fibrillaires étendues dans une direction. Ainsi, ce filtre améliore la détectivité des petites fibres et évite de détecter des pixels isolés liés au bruit de photon [fig.3.14(d ;j)].

Seuillage

Pour finir, nous ne conservons que les pixels au dessus d'un seuil fixé à $1,7$ *photons* [fig.3.14(e ;k)]. Bien qu'au départ le nombre de photon soit entier, les traitements appliqués par l'algorithme entrainent qu'à cette étape les valeurs sont réelles. Le choix de ce niveau de seuil a été déterminé de façon à conserver un maximum de fibres tout en éliminant presque totalement le bruit de fond. Si nous traçons l'histogramme du bruit sur des zones intra-tubulaires de 10 images de 339×339 $pixels^2$ appartenant à des souris de différentes études, $0,01\%$ des pixels en moyenne dépassent le seuil de $1,7photons$ avec un écart type de $0,01\%$. Or, nous savons qu'il n'y a pas de fibre de collagène à l'intérieur des tubules, et on peut donc considérer que pour le seuil choisi, le pourcentage de pixels faux-positif est globalement inférieur à $0,02\%$.

Enfin, nous multiplions l'image obtenue après l'application du seuil par l'image obtenue avant le filtre moyen (3x3) [fig.3.14(f ;l)] pour obtenir l'image finale.

Mosaïque d'images

Une fois les multiples images acquises, il est nécessaire de les combiner entres elles pour reconstituer le champ de vue dans son entier. Comme la précision des moteurs qui permettent le déplacement de l'échantillon dans le plan XY est assez bonne ($< 0,2$ μm), et qu'un défaut de raccord de moins de 1 μm n'entraine pas de modification significative de la quantification du collagène, nous avons simplement utilisé un vecteur déplacement constant, mesuré manuellement sous imageJ, pour recaler les images entre elles après les avoir traitées par l'algorithme précédemment décrit.

Segmentation anatomique

Les images grands champs obtenues comprennent diverses zones anatomiques : cortex, médulla, papille. Comme nous le verrons par la suite, il est pertinent d'effectuer une segmentation sur ces critères anatomiques avant de calculer les scores de fibroses.

Pour réaliser cette opération, nous définissons 3 courbes [fig.3.15] à la main :

(Ca) correspond à la limite entre l'exterieur du rein et le cortex

(Ar) passe par le centre des artères arquées, c'est à dire à la limite cortex-médullaire

(PM) correspond à la jonction médullaire-papille visible par le changement d'orientation des tubules

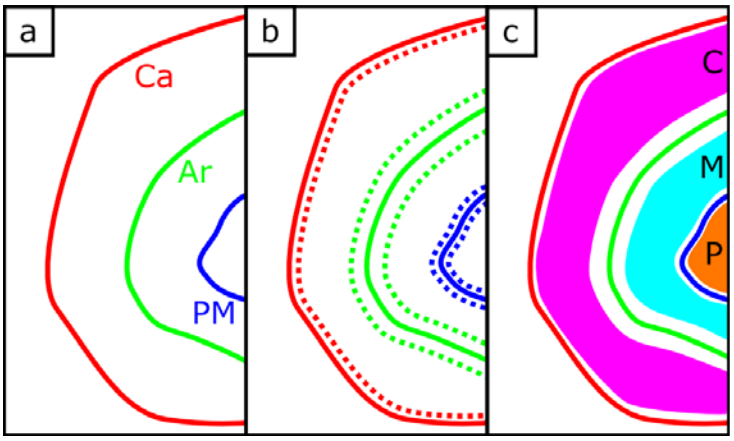


FIGURE 3.15 – Segmentation du rein (a) Tracé des 3 courbes par rapport à des structures rénales facilement identifiables : (Ca) longe la capsule rénale, (Ar) passe par le centre des artères arquées, et (PM) se situe à la limite medullaire - papille ; (b) Dilatation de ces 3 zones pour exclure les régions de transitions et les artères arquées ; (c) Définition des trois régions qui serviront pour la quantification de la fibrose : le cortex [C] entre $Ca - 40\ \mu m$ et $Ar + 160\ \mu m$, la médulla [M] entre $Ar - 160\ \mu m$ et $PM + 40\ \mu m$, et la papille [P] limitée par $PM - 40\ \mu m$.

A partir de ces 3 courbes, notre programme définit les zones dans lesquelles nous mesurerons le score de fibrose. La zone corticale est délimitée par la contraction de la courbe (Ca) de 40 μm vers l'intérieur du rein et l'expansion de 160 μm de la courbe (Ar) vers l'exterieur du rein. La zone médullaire se situe entre la contraction de 160 μm de la courbe (Ar) et l'expansion de 40 μm de la courbe (PM). Enfin, la région papillaire est définie par la contraction de 40 μm de la courbe (PM). Ces opérations sont réalisées en interpolant les courbes par des ellipses pour trouver le centre à partir duquel la distance de la courbe sera augmentée ou diminuée.

Ces différentes dilatations répondent à plusieurs impératifs. Tout d'abord, nous voulons éviter que la capsule, intrinsèquement riche en collagène, augmentent artificiellement le score

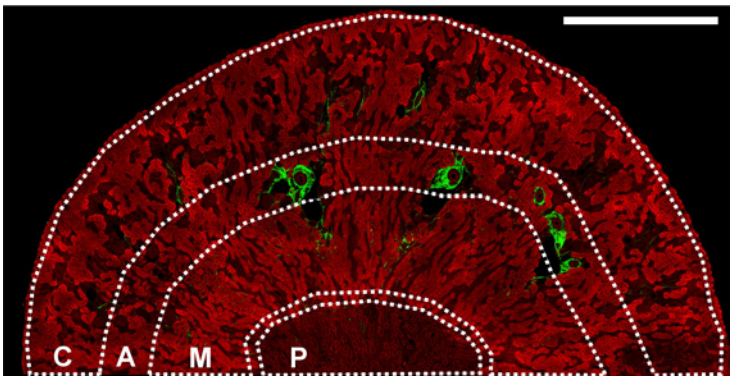


FIGURE 3.16 – Zones définies par l'algorithme de segmentation sur une image typique (coupe coronale de 200 μm de rein de souris traitée à l'AngII pendant 28 jours) C : cortex ; M : medullaire ; P : papille ; A : zone des artères arquées ; Barre d'échelle 500 μm

de fibrose dans le cortex. C'est pourquoi nous contractons la courbe (Ca) de 40 μm vers l'intérieur du rein. Ensuite au niveau de la jonction cortico-médullaire se trouvent des artères arquées en nombres variables, et leur adventice constitué de collagène peut représenter une surface non négligeable par rapport à la surface totale occupée par l'éventuelle fibrose interstitielle. Pour les exclure de la quantification, nous avons écarté de 160 μm de part et d'autre des artères la ligne qui passait par leur centre. Enfin, la jonction entre la médulla et la papille n'est pas toujours très bien définie et pour avoir des zones avec une identité anatomique forte, nous avons préféré exclure cette zone de transition. On peut voir sur la figure 3.16 le résultat de la segmentation d'un rein de souris traitée pendant 28 jours à l'angiotensine II (modèle décrit plus loin) .

Scores de fibroses

Une fois toutes ces opérations réalisées, nous calculons 3 scores à partir des images SHG traitées sur chacune des zones définies par la segmentation. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, il est difficile de lier l'intensité du signal SHG à un nombre précis de molécules de collagène. Ces 3 scores sont donc phénoménologiques et ne mesurent pas directement la concentration de collagène.

Le score **D** mesure le pourcentage de voxels supérieurs au seuil, rapporté au nombre de voxels total inclus dans la zone d'intérêt. Il donne accès au volume relatif qu'occupe la fibrose interstitielle dans le rein, ce qui le rend proche des approches utilisées habituellement

par les médecins pour évaluer la gravité de la fibrose interstitielle. L'anatomopathologiste évalue à partir des coupes colorées au trichrome de Masson la surface occupée par la fibrose interstitielle. Cependant, il évalue non pas la surface occupée par les fibres, mais la surface de la biopsie où la fibrose rénale est présente.

Le second score est basé sur l'image finale obtenue aprés traitement et utilise l'information d'intensité du signal SHG contenue dans ses pixels. Le score **S** est ainsi la moyenne de l'intensité SHG de tous les voxels de la zone d'intérêt. Si la structure submicrométrique du collagène était homogène, ce score serait proportionnel au carré du nombre de molécules de collagène.

Le troisième score, **SF**, est défini à partir des deux autres scores (S/D). Il correspond à la valeur moyenne de l'intensité SHG des voxels dépassant le seuil. D'une certaine manière, il mesure l'intensité moyenne générée par les fibres de collagène. Sa variation peut indiquer un changement structural dans l'organisation du collagène.

Morphologie des artères

Nous avons vu précédemment que lors de la définition des zones anatomiques utilisées pour calculer les scores de fibrose, nous éliminons volontairement les artères arquées. Toutefois, l'évolution de la morphologie des artères est un critère intéressant pour évaluer les pathologies fibrosantes. Nous avons donc décidé de les traiter par une méthode différente de celle utilisée pour la fibrose interstitielle afin de mesurer si elles subissaient un remodelage lié à la fibrose et si leur adventice s'épaississait.

Nous avons mesuré le rayon de la lumière (**L**) de l'artère, l'épaisseur de sa média (**M**) ainsi que celle de son adventice (**A**) [fig.3.17(a)]. Comme les artères arquées ne sont pas parfaitement perpendiculaires au plan d'imagerie, leur section n'est pas circulaire, mais plutôt elliptique. Nous mesurons les différents paramètres de l'artère selon le petit axe de l'ellipse, c'est à dire celui qui n'est pas déformé.

Comme le diamètre des artères arquées varie, nous avons choisi d'analyser nos mesures en normalisant ces valeurs par rapport au rayon de la lumière. Cette façon de procéder fait implicitement l'hypothèse que toutes les artères d'un même groupe de souris ont la même structure relative.

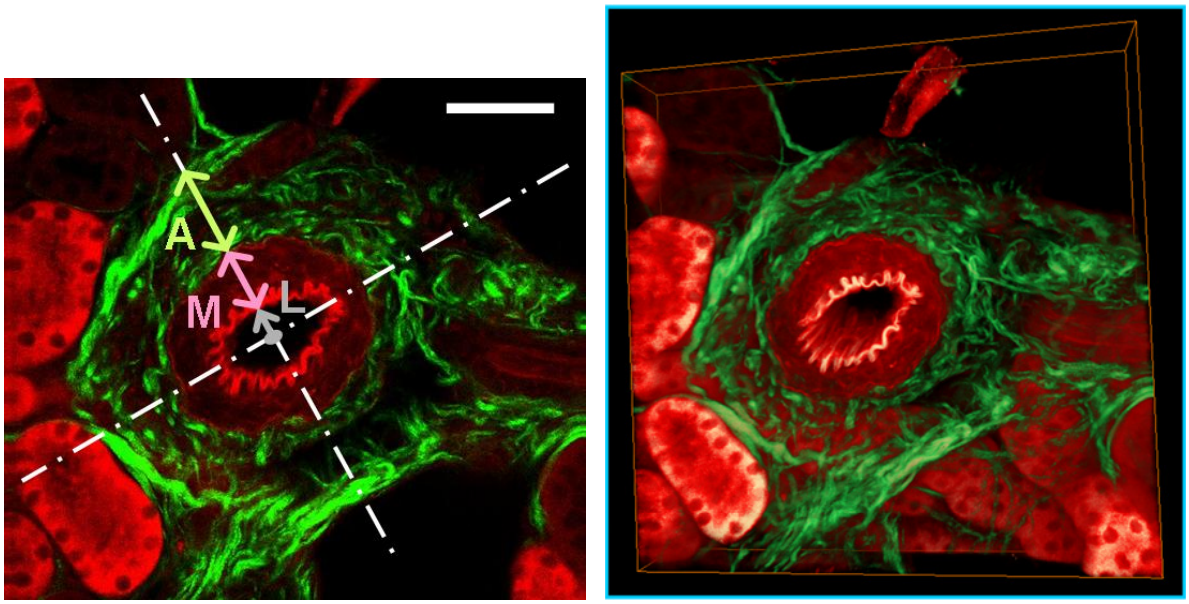


FIGURE 3.17 – (a) Mesures des paramètres morphologiques des artères arquées : **L** rayon de la lumière ; **M** épaisseur de la média ; **A** épaisseur de l'adventice ; barre d'échelle 50 μm - (b) Reconstruction 3D de la même artère. Volume imagé $270 \times 270 \times 40$ μm^3

Reconstruction 3D

Dans certains cas, pour mieux visualiser l'organisation 3D du collagène, nous avons réalisé des reconstructions tridimentionnelles grâce au logiciel Amira (Amira, Visage Imaging). Pour cela, nous avons acquis une zone d'intérêt avec un meilleur échantillonnage que celui utilisé pour réaliser les images servant à la quantification de la fibrose. Le voxel est alors typiquement de $0,4 \times 0,4 \times 1$ μm^3. Un exemple de reconstruction 3D est donné dans la figure 3.17(b).

3.2.2 Protocoles et méthodes : mesures conventionnelles

Parallèlement à nos mesures, nos collaborateurs de l'hôpital Lariboisière ont évalué l'atteinte rénale et la gravité de la fibrose par des méthodes plus conventionnelles. Nous pouvons ainsi comparer notre méthodologie avec ces dernières.

Histologie

La moitié d'un des reins prélevés est utilisé pour une étude histologique. Cette partie du rein est fixée au formol, incluse dans la paraffine, coupée en tranches de 3 μm et colorée

au trichrome de Masson. Ces coupes ont ensuite été examinées en aveugle par Pierre Louis Tharaux, docteur en néphrologie, ou son étudiante Monica Hernest. A partir de l'observation des coupes, deux scores sont établis :

- La glomérulosclérose donne le pourcentage de glomérules sclérosés par rapport au nombre total de glomérules visibles sur la coupe, évalué selon une méthode adaptée de celle de Keane *et coll.*[128]. Brièvement, tous les glomérules de la coupe colorée au trichrome de Masson sont examinés. Un glomérule est compté comme scléreux s'il présente l'un des critères suivants : un épaississement des axes mésangiaux, une augmentation relative de la matrice mésangiale, une oblitération des capillaires glomérulaires, une atrophie du floculus ou une synéchie floculo-pariétale.
- L'atteinte interstitielle pour laquelle nous avons adapté un score créé par Spurney[129]. Ce score est établi sur une échelle allant de 0 à 4+ où 0 correspond à aucune anomalie et 1+ à 4+ à des anomalies respectivement légères, moyennes, moyennement-sévères et sévères. Ce score prend en compte l'accumulation de matrice extracellulaire objectivée par l'augmentation de la distance entre les membranes basales tubulaires, la présence d'un infiltrat inflammatoire et l'atrophie des épithélia tubulaires.

Mesures physiologiques

Nos collaborateurs ont aussi suivi certains paramètres physiologiques chez les souris pendant leur traitement. Nous exposons ici brièvement les protocoles utilisés, mais leur version plus détaillée est disponible dans la thèse de Monica Hernest.

La pression artérielle des souris a été relevée tous les 2 ou 3 jours grâce à un appareil mesurant optiquement la pression systolique dans la queue des souris (Visitech BP 2000 Blood Pressure Analysis System). Pour éviter que cette évaluation soit faussée par le stress des souris, celles-ci ont été habituées à cet exercice avant le début de l'étude.

La qualité de la fonction rénale est suivie en mesurant la concentration d'albumine dans les urines recueillies à l'aide d'une cage métabolique (Tecniplast France 3600M021). En effet, l'albumine est une protéine plasmatique qui ne devrait pas passer à travers la membrane glomérulaire de par sa taille (68 kDa) et devrait donc être absente des urines. Toutefois, la concentration d'albumine peut varier sans réfléter une atteinte glomérulaire. En effet, lorsque le rein forme l'urine, il va plus ou moins la concentrer en fonction des besoin en eau de l'organisme. C'est pourquoi, il est préférable d'utiliser le rapport de l'albuminurie sur la créa-

tininurie. La créatinine, produite à un taux constant par l'organisme en fonction de la masse musculaire, est une petite molécule (113 Da) normalement totalement filtrée par les glomérules. En comparant les deux concentrations, nous obtenons alors un indice de la sélectivité de la barrière glomérulaire.

3.2.3 Statistiques

Pour analyser la variation d'un paramètre donné à l'intérieur d'un groupe ayant reçu le même traitement, nous utilisons une approche bayésienne. Sauf mention contraire, nous avons fait l'hypothèse que le paramètre analysé suivait une distribution gaussienne. Nous avons choisit une loi a priori non informative : les couples (valeur moyenne,écart type) ont une probabilité uniforme sur une large plage autour des valeurs possibles. Une fois les lois a postériori calculées, nous obtenons les distributions de probabilité que suivent la valeur moyenne et l'écart-type. En intégrant cette distribution de probabilité par rapport à l'écart type, nous obtenons la probabilité qu'une valeur soit la vraie valeur moyenne de notre échantillon.

Nous donnerons les résultats sous la forme $m_{[m_{min};m_{max}]}$ où m est la valeur maximale de la densité de probabilité de la moyenne et $[m_{min}; m_{max}]$ l'intervalle dans lequel la vraie valeur moyenne a 95% de probabilité de se trouver.

Pour évaluer les différences intergroupes d'un paramètre donné, nous calculons, à partir des densités de probabilité de la moyenne de chacun des groupes, la probabilité que la valeur moyenne d'un groupe soit strictement supérieure à celle d'un autre. Cette opération nous permet de savoir si la différence entre 2 groupes est significative.

Nous utiliserons les notations :

- * et ** pour signifier que la valeur moyenne d'un paramètre d'un groupe donné est supérieure à celle du groupe témoin avec une confiance supérieure à 95% et 99% respectivement.
- $^{\circ}$ et $^{\circ\circ}$ pour signifier que la valeur moyenne d'un paramètre pour le groupe D49 est supérieure à celle du groupe D28 avec une confiance supérieure à 95% et 99% respectivement.

Enfin, pour évaluer le lien entre deux paramètres à l'intérieur d'un même groupe, nous avons préféré utiliser le coefficient τ de Kendall plutôt que le coefficient de corrélation. En effet, le coefficient de corrélation linéaire évalue la linéarité entre 2 variables et suppose que

ces 2 variables ont une distribution normale. Or, rien ne nous permet de supposer une relation linéaire entre les différents paramètres. Pour simplement mesurer si une augmentation d'un paramètre implique une augmentation d'un autre, le coefficient τ de Kendall[130] est particulièrement bien adapté puisqu'il mesure la monotonie de la relation entre les 2 variables et ne fait aucune hypothèse sur la distribution de celles-ci. Ce coefficient peut s'interpréter comme suit : soit un ensemble d'échantillons S et deux paramètres P_1 et P_2 qui ordonnent S. Pour un couple $\{s_1,s_2\}$ d'éléments de S tiré au hasard, nous pouvons définir 2 probabilités : $p(meme\ sens)$ qui est la probabilité que P_1 et P_2 classent s_1 et s_2 dans le même ordre et $p(sens\ contraire)$ qui est la probabilité que leur ordre soit différent dans les 2 classements. Le coefficient τ est alors défini par :

$$\tau = p(meme\ sens) - p(sens\ contraire) \tag{3.1}$$

Le coefficient varie entre 1, lorsque l'accord est parfait, et -1 lorsque le désaccord est parfait. Un test de validité mesure ensuite la probabilité pour que la valeur de τ obtenue soit atteinte par deux ordres aléatoires tirés sur l'ensemble S.

3.3 Validation de la méthode

3.3.1 Modèle de fibrose : Angiotensine II

Pour évaluer l'intérêt et la sensibilité de notre méthodologie, nous l'avons appliqué à un modèle murin de fibrose rénale. Ce modèle est basé sur l'induction d'une fibrose par perfusion d'angiotensine II. Ce modèle vise à reproduire une néphropathie hypertensive grâce à l'augmentation de la pression sanguine causée par l'angiotensine. Cette étude a été réalisée sur des souris mâles provenant d'un fond génétique restreint (C57BL/6J) et réparties en 3 groupes :

Témoin Ces souris n'ont reçu aucun traitement.

AngII D28 Une hypertension artérielle a été engendrée chez ces souris par la diffusion continue d'angiotensine II (AngII ; Sigma, St. Louis, MO) au niveau sanguin à l'aide de pompes osmotiques sous-cutanées (Alzet Model 2004 ; DURECT, CA) à un débit de 1 $\mu g/kg/min$ pendant 28 jours. Ce protocole est dérivé d'un protocole mis au point par Coffman *et coll.*[131].

AngII D48 Une seconde pompe osmotique a été implantée chez ces souris au $27^{\text{ème}}$ jour pour qu'elles reçoivent de l'angiotensine pendant 49 jours.

Tous les animaux ont été soumis à une alimentation riche en sel (5% $NaCl$; SDS-Dietex, France) pour amplifier l'hypertension et les dommages rénaux.

Pour expliquer plus précisément le mode d'action du modèle utilisé, il faut revenir un instant sur le rôle de l'angiotensine II. Ce peptide joue un rôle très important dans la régulation de la pression artérielle via un effet d'augmentation du volume plasmatique et d'augmentation des résistances artérielles.

L'angiotensine II :

- stimule la vasoconstriction des artérioles ce qui provoque une augmentation des résistances périphériques du système sanguin. L'artériole efférente du glomérule est plus sensible que l'artériole afférente, l'angiotensine II augmente ainsi la pression des capillaires glomérulaires et donc la pression de filtration glomérulaire[132;133].
- stimule la sécrétion d'aldostérone, qui provoque une augmentation du volume plasmatique par réabsorption de sodium et d'eau par les reins[132;133].
- stimule la sécrétion de vasopressine qui limite la perte d'eau dans les urines[132;133].
- stimule la sensation de soif. Elle entraine donc une plus grande absorption d'eau et ainsi une augmentation du volume sanguin et par conséquent une augmentation de la pression artérielle[134].
- est connue pour avoir un effet inflammatoire intrinsèque[135].

Le rein, en particulier les artérioles et les glomérules, va donc subir un fort stress dû à la pression ssystolique ce qui va provoquer les lésions de fibroses que nous allons caractériser par la suite.

3.3.2 Résultats

Méthodes conventionnelles

Paramètres physiologiques Nous avons d'abord vérifié que les souris perfusées avec l'angiotensine II avaient bien développé de l'hypertension artérielle. Au début de l'étude, avant le commencement du traitement, les souris ont une pression artérielle systolique (PAS) moyenne de $109_{[102;116]}$ $mmHg$ au niveau de l'artère de leur queue qui correspond bien à la pression attendue. Chez les souris des groupes AngII D28 et D49, l'administration d'angiotensine ac-

croît rapidement la PAS et au bout d'une semaine, elle atteint un pallier à $180^{**}_{[175;185]}\ mmHg$ (moyenne sur les mesures entre le $8^{\text{ème}}$ et le $28^{\text{ème}}$ jour). Cela montre indéniablement que les souris traitées sont soumises à une forte hypertension ; leur pression artérielle double quasiment par rapport au niveau normal.

La fonction rénale de filtration sélective est elle aussi affectée comme en témoigne la concentration d'albumine dans les urines rapportée à la concentration de créatinine (RAC : rapport albumine sur créatinine). Avant le début du traitement, le RAC moyen des souris est de $2,6_{[1,2;4,0]}$ et l'écart type de la distribution est de $1,8_{[1,1;3,28]}\ mg/mmol$. La probabilité qu'une souris n'ayant subi aucun traitement ait un RAC compris entre 0 et $6,4\ mg/mmol$ est alors supérieur à 95%. Une fois le traitement commencé, le RAC des souris augmente, mais la dispersion à l'intérieur d'un groupe est très forte allant de $1,9$ à $6285,0\ mg/mmol$ au $27^{\text{ème}}$ jour de traitement et de $3,04$ à $1563,34\ mg/mmol$ au $47^{\text{ème}}$ jour de traitement (cette forte variabilité se retrouve dans d'autres études utilisant ce critère[136;137;138]). Toutefois, sur les 10 souris du groupe AngII D28, dont on a mesuré le RAC au $27^{\text{ème}}$ jour, une seule est en dessous du seuil de 6.4 $mg/mmol$. Quant au groupe AngII D49 mesuré après 47 jours, 2 souris sur 9 sont un RAC en dessous du seuil. Il est étonnant que certaines souris ne semblent pas affectées, certaines pompes osmotiques sont défaillantes et diffusent des doses d'AngII inférieures à notre prévision. Toutefois, globalement les reins des souris traitées par l'angiotensine laissent s'échapper des protéines dans les urines ce qui prouve l'atteinte de la barrière de filtration glomérulaire. A titre de comparaison un RAC normal chez l'homme est inférieur à 3 $mg/mmol$, au dessus et jusqu'à 30 $mg/mmol$ on parle de microalbuminurie et au delà de ce dernier seuil on parle de néphropathie.

Au final, à la fois la PAS et le RAC indiquent que les souris traitées ont développé une néphropathie.

Glomérulosclérose La défaillance glomérulaire se traduit sur l'aspect des glomérules au trichrome de Masson [fig.3.18]. On remarque l'accumulation de matrice extracellulaire non fibrillaire dans le floculus à l'augmentation de la coloration verte au trichrome mais à l'absence de signal SHG. Le taux de glomérules scléreux passe de $10,8\%_{[6,2;15,4]}$ pour les souris non traitées à $48,1\%^{**}_{[34,6;61,5]}$ après 28 jours de traitement et augmente jusqu'à $79,1\%^{\circ\circ}_{[73,3;85,0]}$ après 49 jours de traitement.

Scores de fibrose obtenus à partir des coupes colorées au trichrome de Masson

La figure 3.19 montre l'accumulation de fibres de matrice extracellulaire fibrillaire dans

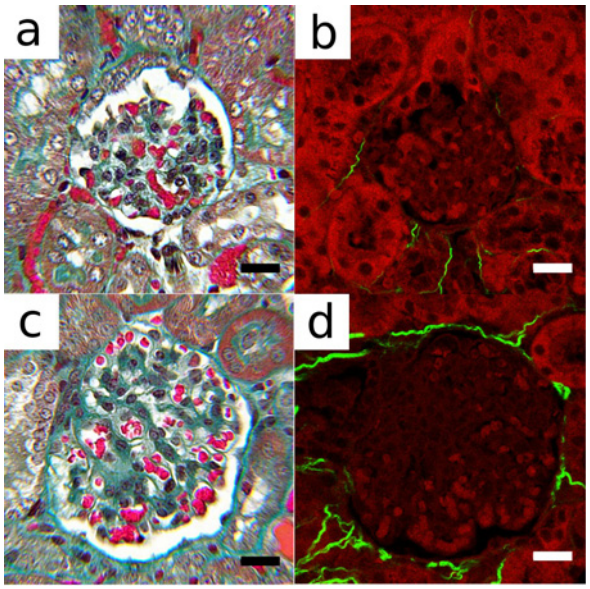


FIGURE 3.18 – Aspect des glomérules sur des coupes sériées de rein murin visualisées (a ;c) au trichrome de Masson ; (b ;d) par microscopie multiphoton (rouge=2PEF/vert=SHG) ; (a ;b) souris témoin ; (c ;d) souris traitée pendant 28 jours ; barre d'échelle : 20 μm

l'espace interstitiel chez les souris traitées. On peut noter que l'extension de la fibrose vue par microscopie multiphoton est plus limitée que les zones interstielles présentant une coloration vert-bleu au trichrome de Masson. Nos collaborateurs ont évalué en aveugle l'atteinte tubulaire de chaque souris sur une échelle allant de 0 à 4+ à partir des lames colorées au trichrome de Masson. Leurs observations sont résumées dans le tableau 3.1.

Score	0	1+	2+	3+	4+
Témoin	6	0	0	0	0
AngII D28	3	3	2	0	0
AngII D49	0	1	4	2	0

TABLE 3.1 – Nombre de souris ayant un score donné (0 à 4+) d'atteinte tubulaire dans chacun des groupes

Il n'est pas possible d'utiliser un modèle gaussien pour ces données, car les valeurs sont discrètes et nous avons tenté différentes approches statistiques détaillées en annexe 5.1. Au final le risque pour qu'une souris traitée à l'angiotensine II développe une fibrose (score supérieur ou égal à 1+) est significativement plus élevé, et plus le traitement est long, plus les

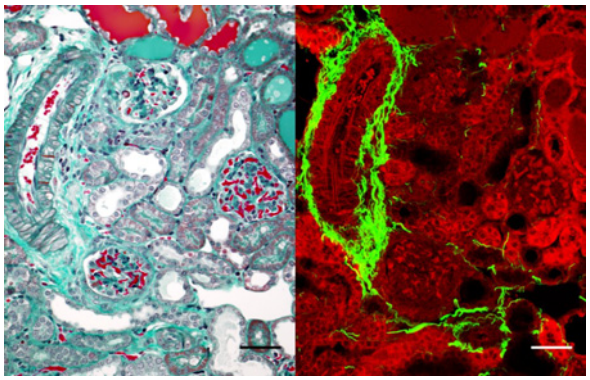


FIGURE 3.19 – Aspect de la fibrose interstitielle chez une souris traitée pendant 28 jours. Coupes sériées de rein visualisées (gauche) au trichrome de Masson et (droite) par microscopie multiphoton (rouge=2PEF/vert=SHG) ; barre d'échelle 50 μm

scores obtenus sont importants.

Microscopie multiphoton

Distribution de la fibrose à partir des images multiphoton

Nous avons visualisé ce modèle de fibrose rénale selon le protocole détaillé au paragraphe 3.2.1. Les images obtenues par microscopie multiphoton permettent de visualiser la morphologie du rein grâce à l'émission de fluorescence sous excitation à deux photons et les collagènes fibrillaires à l'aide de la génération de second harmonique. Ces images permettent ainsi de décrire qualitativement et quantitativement la fibrose du rein.

Les images des souris non traitées montrent comme attendu une très faible présence de collagène à part dans l'adventice des artères où le collagène est exprimé de façon constitutive. Nous trouvons cependant quelques fibres de collagène dans la médulla [fig.3.20(D0)]. Bien que la majorité de cette zone soit saine, elle est ponctuée d'îlots de fibrose. La localisation de ces îlots est souvent corrélée à celle des artères arquées et se situe alors selon un axe radial passant par l'artère arquée et la veine arquée correspondante. Ces souris ne sont soumises qu'à un faible stress dû à une alimentation riche en sel, et la présence de fibres de collagène semble donc indiquer un risque élevé de fibrose dans la médulla. Dans le cortex rénal, on observe quelques fibres éparses souvent associées à la vascularisation, mais globalement cette zone n'est pas endommagée.

Les souris traitées, que ce soit pendant 28 ou 49 jours, ont des lésions similaires du point de

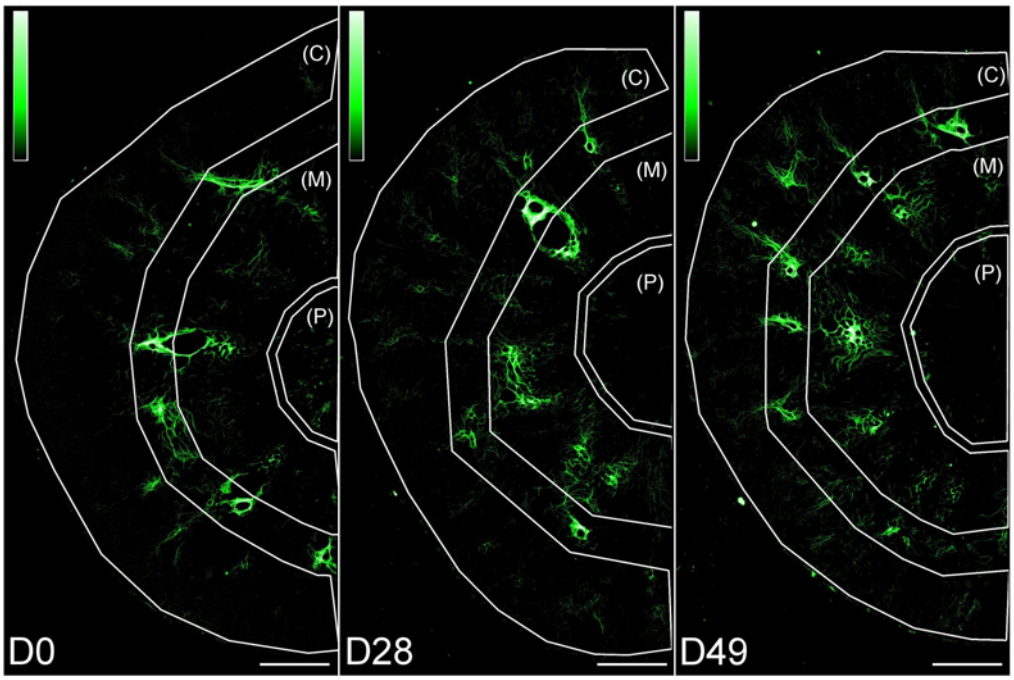


FIGURE 3.20 – Image du score D de SHG pour des coupes coronales de rein de : (D0) souris contôle, (D28) souris traitée pendant 28 jours à l'angiotensine II, (D49) souris traitée pendant 49 jours. L'échelle de couleur représente le pourcentage de voxel supérieur au seuil intégré par rapport à $z = 40\ \mu m$ (Noir = 0% - Blanc = 100%). Barre d'échelle : 500 μm. Les lignes blanches correspondent à la segmentation utilisé pour le score final : (C) Cortex - (M) Médulla - (P) Papille. Le score SHG calculé pour ces 3 souris et dans ces 3 régions est de : (a) Témoin : (C) 0.31 % (M) 0.85 % (P) 0.49 % ; (b) AngII D28 : (C) 0.42 % (M) 2.13 % (P) 0.11 % ; (c) AngII D49 : (C) 0.74 % (M) 1.83 % (P) 0.20 % ;

vue de la localisation et de l'organisation bien qu'elles soient plus prononcées pour les souris traitées à 49 jours [fig.3.20(D28 ;D49)]. Comme pour les souris témoins, les souris traitées présentent des lésions dans la médulla, mais la principale différence se trouve dans la zone corticale. On peut observer de nombreux glomérules dont la capsule de Bowmann est entourée de fibres de collagène [fig.3.18(d)]. Par contre, nous ne détectons pas d'accumulation de matrice extracellulaire dans les glomérules alors que nous savons par ailleurs que nombre de ceux-ci sont scléreux. Cette observation va à l'encontre des études *in vitro* signalant l'expression d'ARN messager du procollagène I par les cellules mesangiales du glomérule[139;140;141]. Elle dénote aussi par rapport à un article[142] montrant la forte activité de transcription d'un fragment de promoteur transgénique α_2(I) du pro-collagène I dans les glomérules de souris hypertendues. Toutefois, elle est en accord avec de multiples études[143;144;145] utilisant des antigènes pour révéler le collagène fibrillaire. En fait, l'accumulation de collagène I ou III a été très rarement décrite dans la littérature sauf dans des modèles de sclérose très avancée[146;147]. Cela nous amène à penser que l'expression de procollagène I par les cellules du glomérule est fortement inhibée *in vivo*. L'autre possibilité pourrait être une expression de procollagène qui ne s'assemblerait pas sous forme de fibre et serait rapidement dégradé. Dans ces dernières conditions, nous pourrions à la fois observer une production de procollagène I et un signal SHG très peu intense voire inexistant ainsi qu'un marquage immunohistochimique peu important.

Une fibrose interstitielle apparaît dans le cortex des souris traitées à l'angiotensine II, et sa répartition est plus homogène que dans la médulla. Les vaisseaux du cortex eux aussi semblent atteints puisque de nombreuses artérioles gainées de collagène sont visibles chez les souris traitées alors que cela n'était pas le cas chez les souris témoins. Grâce aux reconstructions 3D [fig.3.21] que nous avons réalisées sur des piles d'image acquises avec un meilleur échantillonâge, et aux images grands champs telles que celles de la figure 3.20, nous avons mis en évidence une continuité, où au minimum une proximité inférieure à la résolution du microscope, entre les fibres de collagène péri-vasculaire, péri-glomérulaire et les fibres de collagène présentes dans l'interstitium tubulaire. Cela nous pousse à croire qu'il existe des mécanismes communs entre ces différents processus.

Scores de fibrose obtenus à partir des images multiphoton

Les scores de fibrose interstitielle pour chacun des groupes et dans les différentes régions sont résumés dans la table 3.2. On voit que le score D qui mesure la fraction de volume occupé par les fibres dans une zone donnée, montre une aggravation de la fibrose dans le

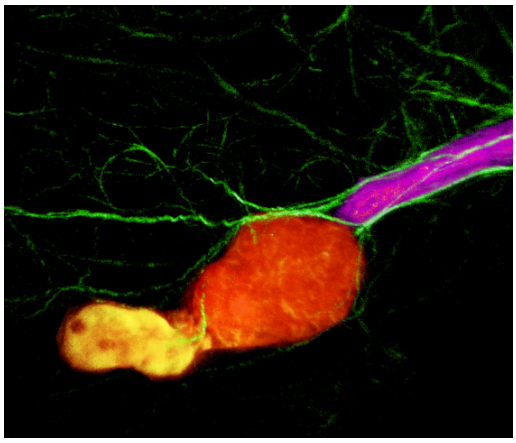


FIGURE 3.21 – Reconstruction 3D d'une zone corticale contenant un glomérule d'une souris AngII D28. La zone étudiée représente : $270 \times 270 \times 50$ μm^3 avec une taille de voxel de $0,4 \times 0,4 \times 1$ μm^3. Le glomérule est représenté en rouge avec une artériole s'y connectant en violet et le tubule qui collecte son urine en jaune. Les fibres de collagène sont en vert. Nous avons effacé informatiquement les autres tubules environnant le glomérule pour permettre de mieux visualiser l'architecture 3D du collagène. Les fibres de collagène entourant l'artériole se prolongent autour du glomérule et dans l'interstitium.

cortex avec le nombre de jours de traitement. Par contre, bien que le score D soit plus élevé dans la médulla, il n'y a pas de différence significative entre les différents groupes dans cette zone. Cela peut s'expliquer par le fait que les souris témoins ont déjà des scores élevés et par la forte variabilité intra-groupe. Tout pousse à croire que les lésions de fibrose dans la médulla sont assez aléatoires et peuvent se produire même lorsque le rein n'est pas soumis à un stress intense. De plus, les zones de fibrose dans la médulla sont souvent reliées aux artères dont le nombre et le diamètre sont variables. Cette variabilité se répercute sur les scores dans la médulla. Enfin, le score dans la papille ne permet pas non plus d'identifier de différence entre les groupes. L'explication vient plutôt du volume restreint de papille dont nous faisons l'acquisition, ce qui provoque une grande variabilité du score dans cette zone.

Le score S mesure l'intensité SHG moyenne dans une zone donnée. Comme le score D, il ne permet pas de différencier les groupes dans la zone médullaire. Dans la papille, ce score met en évidence une hausse significative après 49 jours de traitement qui n'était pas mesurée par le score D. Dans le cortex, contrairement au score D qui révèle une différence dès 28 jours, c'est seulement après 49 jours de traitement que les lésions de fibroses augmentent

	Nb Souris	Cortex	Medulla	Papille
Score D				
Témoin	7	$0,32_{[0,22;0,42]}$	$2,03_{[1,01;3,04]}$	$0,21_{[0,11;0,31]}$
AngII D28	15	$0,45^{*}_{[0,35;0,55]}$	$2,27_{[1,70;2,84]}$	$0,13_{[0,09;0,17]}$
AngII D49	9	$0,70^{\circ\circ}_{[0,55;0,86]}$	$2,02_{[1,44;2,60]}$	$0,26_{[0,07;0,45]}$
Score S				
Témoin	7	$2,14_{[1,58;2,71]}.10^{-2}$	$21,0_{[3.9;38,0]}.10^{-2}$	$1,13_{[0,34;1,92]}.10^{-2}$
AngII D28	15	$2,65_{[1,90;3,40]}.10^{-2}$	$18,9_{[12,5;25,3]}.10^{-2}$	$0,69_{[0,30;1,08]}.10^{-2}$
AngII D49	9	$5,29^{\circ\circ}_{[3,81;6,77]}.10^{-2}$	$17,9_{[10,6;25,2]}.10^{-2}$	$2,62^{\circ\circ}_{[1,23;4,02]}.10^{-2}$
Score SF				
Témoin	7	$7,1_{[5,1;9,0]}$	$8,7_{[6,5;10,8]}$	$5,2_{[2,4;8,8]}$
AngII D28	15	$5,8^{<Ctr}_{[5,1;6,4]}$	$7,9_{[7,0;8,7]}$	$5,9_{[2,6;9,3]}$
AngII D49	9	$7,6^{\circ}_{[5,7;9,5]}$	$8,7_{[7,0;10,3]}$	$13,1^{\circ}_{[5,7;20,5]}$

TABLE 3.2 – Scores de fibrose : D fraction du volume occupé par les fibres ; S intensité moyenne de la SHG sur la région d'intérêt ; SF intensité moyenne de la SHG émise par les fibres de la zone d'intérêt ; $^{<Ctr}$ probabilité supérieure à 90% que la valeur du groupe D28 soit inférieure à celle du groupe témoin

significativement pour ce score. Pour comprendre les différences entre ces deux scores, il faut étudier le score SF.

Le score SF mesure l'intensité moyenne de signal SHG généré par les fibres de collagène. Ce score ne mesure pas l'extension de la fibrose mais un changement éventuel de la structuration sub-micrométrique moyenne des fibres. Après 28 jours de traitement, l'intensité SHG rayonnée par les fibres du cortex diminue par rapport à celle du groupe témoin. Cela explique en partie pourquoi le score D différence les groupe AngII D28 et témoin, alors que cette différencie n'apparaît pas nettement avec le score S. Tout se passe comme si la fibrose s'étendait pendant les 28 premiers jours de traitement mais que les fibres néoformées généraient un signal de SHG peu important. Ces fibres nouvelles atteindraient leur maturité au bout de 49 jours et le score SF se normaliserait. Dans la papille, bien que le volume occupé par la fibrose varie peu d'après D, après 49 jours de traitement, il semblerait que les fibres présentes dans cette zone génèrent plus efficacement de la SHG.

Au final, le score D calculé dans le cortex semble le plus sensible pour mesurer la progression de la fibrose interstitielle causé par le traitement à l'angiotensine II. Les autres scores fournissent néanmoins des données complémentaires pour analyser le processus de fibrose et émettre des hypothèses sur la façon dont il se développe dans les différentes zones.

Effet de l'hypertension sur les artères arquées

La mesure du remodelage des artères arquées dû à l'angiotensine II nous permet d'appréhender la perfusion du rein. En effet, le débit sanguin dans le rein est déterminé à la fois par la pression sanguine et par la résistance artérielle du rein, elle-même fonction du diamètre et de la rigidité des vaisseaux sanguins. Comme les artères arquées ont une direction à peu près perpendiculaire à la coupe que nous réalisons, nos images nous permettent d'avoir accès à leur section et d'en déterminer les caractéristiques [fig.3.22].

Nous nous sommes intéressés au diamètre de la lumière de l'artère, à l'épaisseur de la média et à celle de l'adventice. Comme la distribution de taille des artères était trop hétérogène dans une même souris, mais aussi entre souris, nous avons préféré comparer les rapports de ces distances. Le tableau 3.3 montre les changements morphologiques des artères arquées causées par la perfusion d'angiotensine II. Les statistiques ont été réalisées en mesurant le diamètre d'une ou plusieurs artères dans chaque souris. Nous avons ensuite fait l'hypothèse que dans chaque souris la distribution du paramètre d'intérêt était gaussienne et nous avons utilisé une approche bayésienne pour retrouver la densité de probabilité de la moyenne du paramètre dans

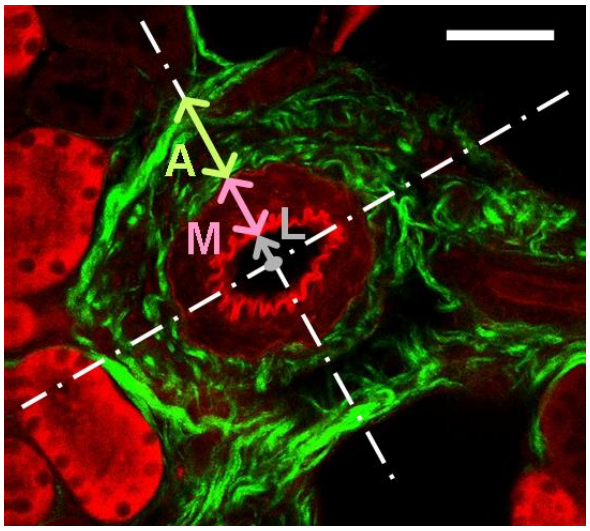


FIGURE 3.22 – Mesures des paramètres morphologiques des artères arquées : **L** rayon de la lumière ; **M** épaisseur de la média ; **A** épaisseur de l'adventice ; barre d'échelle 50 μm

chacune des souris. Enfin à partir des densités de probabilité individuelle, nous avons calculé la densité de probabilité de la moyenne globale sur un groupe pour trouver son maximum et l'intervalle de confiance à 95%.

Mesure	Nb Souris	$M_{Arteres}$	M/L	$A/(M+L)$	A/L
Témoin	9	1,7	$1.32_{[1.06;1.62]}$	$0.67_{[0.46;0.95]}$	$1.41_{[1.12;1.73]}$
AngII D28	14	2,4	$1.66^{*}_{[1.43;1.90]}$	$0.55_{[0.44;0.72]}$	$1.44_{[1.23;1.65]}$
AngII D49	7	2,7	$2.01^{\circ}_{[1.67;2.36]}$	$0.66_{[0.45;0.91]}$	$1.78^{\circ}_{[1.49;2.06]}$

TABLE 3.3 – Morphologie des artères : Nb souris est le nombre de souris dans chaque groupe, $M_{Arteres}$ est le nombre moyen d'artères analysées par souris, M/L est la moyenne du rapport de l'épaisseur de la média sur le rayon de la lumière, $A/(M+L)$ est la moyenne du rapport de l'épaisseur de l'adventice sur le rayon lumière plus média, A/L est la moyenne du rapport entre l'épaisseur de l'adventice et le rayon de la lumière

Ces mesures montrent une nette diminution du rayon de la lumière par rapport à l'épaisseur de la média chez les animaux hypertendus. Au contraire, nous n'observons pas de variation relative de l'épaisseur de l'adventice par rapport au rayon de la média. Enfin si l'on compare l'épaisseur de l'adventice au rayon de la lumière, on voit une légère augmentation après 49 jours de traitement. Le traitement par l'angiotensine II est donc responsable d'un changement

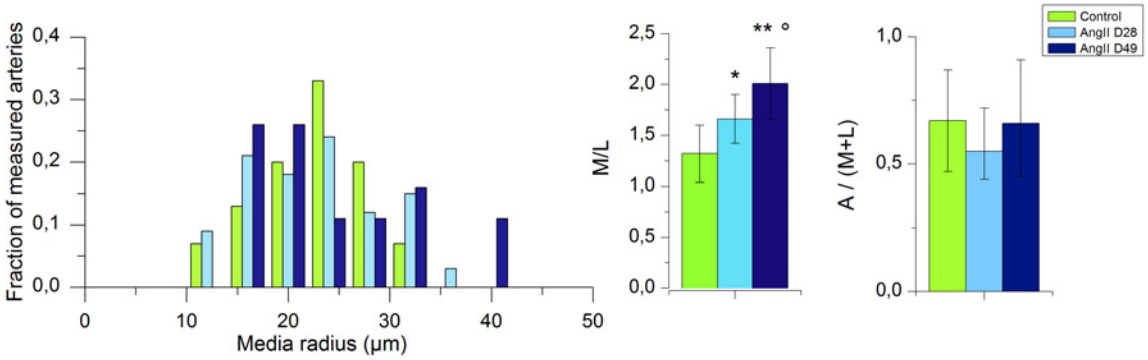


FIGURE 3.23 – Morphologie des artères : (gauche) histogramme donnant la fraction des artères mesurées ayant un rayon de média (M+L) donné ; (centre) moyenne du rapport M/L = épaisseur de la média sur rayon de la lumière ; (droite) moyenne du rapport $A/(M+L)$ = épaisseur de l'adventice sur rayon lumière plus média ; les barres d'erreurs donnent l'intervalle de confiance à 95% de probabilité

morphologique des artères arquées qui présentent une média et un adventice plus épais pour un rayon donné de la lumière chez les souris traitées.

Dans le même temps, le diamètre absolu de la média (M+L) ne semble pas varier, en tout cas pas de manière assez significative pour expliquer les modifications morphologiques observées [fig.3.23]. Le remodelage semble donc être de type eutrophique ce qui était attendu d'après la bibliographie[123]. Cela signifie que la média se développe vers l'intérieur, réduisant ainsi le diamètre de la lumière et augmentant la résistance artérielle. Ce processus rend la vasoconstriction causée par l'angiotensine II permanente, et non plus seulement le résultat de la contraction des cellules musculaires lisses des vaisseaux.

3.3.3 Discussion

Comparaison entre les différentes mesures

Afin de déterminer la pertinence de l'évaluation de la fibrose par génération de second harmonique, nous avons comparé les scores obtenus par cette méthode aux autres mesures réalisées.

Tout d'abord, nous pouvons comparer le score de fibrose interstitielle mesuré par microscopie multiphoton avec celui donné par un médecin suite à l'observation des coupes colorées

au trichrome de Masson. Même si le score du médecin se base sur d'autres critères que la quantité de collagène fibrillaire telles que l'atteinte des tubules, les deux méthodes évalue la gravité du processus fibrosant. On s'attend donc à une forte corrélation entre ces deux scores. Nous avons comparé souris par souris le score histopathologique avec les différents scores (D,S,SF) mesurés par microscopie SHG. C'est le score D mesuré dans le cortex qui présente la corrélation la plus forte avec un coefficient τ de Kendall de 0.68 ($p < 0.01$). Ce résultat était prévisible puisque c'est la mesure la plus proche de celle qu'effectue le médecin. A la vue du graphique 3.24, on peut même penser qu'il existe une relation linéaire entre ces deux critères.

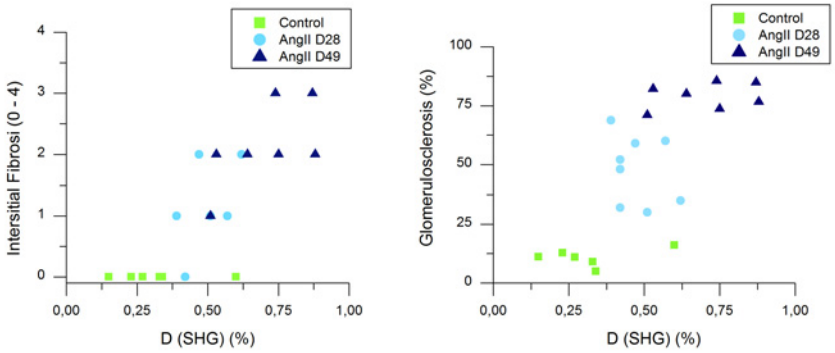


FIGURE 3.24 – Corrélation entre les différentes mesures : (gauche) Corrélation entre le score de fibrose donné par le pathologiste à partir des coupes colorées au trichrome de Masson et le score évalué par microscopie multiphoton $\tau = 0.68$ ($p < 0.01$) ; (droite) Corrélation entre le score de glomérulosclérose donné par le pathologiste à partir des coupes colorées au trichrome de Masson et le score évalué par microscopie multiphoton $\tau = 0.68$ ($p < 0.01$)

Nous avons réalisé les mêmes tests de corrélation entre les scores SHG et le score de glomérulosclérose. C'est encore le score D mesuré dans le cortex qui est le plus corrélé ($\tau = 0.55$, $p < 0.01$) avec la glomérulosclérose [fig.3.24], renforçant sa valeur prédictive de l'état du rein. Cette fois-ci la relation ne semble pas linéaire entre les 2 paramètres. Comme les 2 paramètres mesurent des phénomènes assez différents, ceci aurait d'ailleurs été étonnant. En fait, il semblerait que la dispersion relative du score D soit plus forte dans les groupes témoin et AngII D49 que celle de la glomérulosclérose, et que ce soit l'inverse pour le groupe AngII D28. On peut analyser ces résultats en considérant que la glomérulosclérose passe d'un état de base où quasiment aucun glomérule n'est touché à un état où tous les glomérules sont touchés

en 28 jours, alors que l'évolution du score D est plus progressive et peut encore progresser après 49 jours. Nous verrons d'ailleurs par la suite que le score D mesuré dans le cortex peut prendre des valeurs bien supérieures à celles que nous trouvons dans cette étude.

Le rapport albuminurie sur créatininurie (RAC) mesure la gravité de l'atteinte rénale. Ce paramètre ne se corrèle ni avec la glomérulosclérose, ni avec le score de fibrose interstitielle du pathologiste, ni avec nos scores. La grande variabilité de ce paramètre à l'intérieur d'un groupe indique sa sensibilité à des paramètres mal contrôlés qui pourrait expliquer cette discordance. Toutefois, d'autres raisons sont envisageable : on peut penser que le RAC n'a pas la même évolution temporelle que les autres paramètres, il pourrait se dégrader avant que des lésions ne soient visibles sur les coupes histologiques ou au microscope multiphoton. De plus, le RAC mesure la perméabilité de la membrane glomérulaire ; or, la sclérose et la fibrose ont plutôt tendance à empêcher la filtration. Ainsi, il probable que la relation entre le RAC et les autres paramètres ne puisse pas s'évaluer par une simple fonction croissante entre des mesures éffectuées à la même date.

Spécificité, Détectivité et Reproductibilité

Nous avons vu que le niveau du seuil utilisé pour le calcul des scores SHG limite à moins de $0,02\%$ de la surface totale du rein les erreurs dues à des détections erronées. Toutefois, cela n'implique pas directement que l'erreur que nous commettons sur D est inférieure à $0,02\%$. Plusieurs autres sources d'erreurs potentielles existent :

- Nous ne détectons la présence de collagène que si le signal émis dans le pixel correspondant dépasse au final le seuil de détection. Dans le cas où de nombreux pixels seraient proches de cette limite de détection, de faibles variations sur l'intensité du laser incident, le positionnement de l'échantillon ou les conditions expérimentales de manière générale pourraient induire des variations importantes de nos scores.
- Nous n'observons qu'une partie très réduite du volume des deux reins d'une souris donnée, environ $1/2000^{\text{ème}}$ du volume total. On peut alors se demander si notre mesure est représentative de l'ensemble de la souris.

Pour répondre à ces interrogations, nous avons mesuré nos scores sur 5 tranches consécutives dans un même rein. Ce test a été réalisé sur deux souris fibrosées dans un modèle de glomérulonéphrose que nous traiterons dans le prochain chapitre. L'écart type sur les 5 mesures du score D dans le cortex correspond à 10% environ de la moyenne du score. Dans

la médullaire et la papille, les écarts-types relatifs sont respectivement de 25% et 20%. On voit encore une fois que le score dans le cortex est le plus robuste car c'est la zone dont nous acquérons le plus grand volume mais aussi celle où la fibrose est répartie de façon la moins hétérogène. Cette erreur de 10% d'erreur prend à la fois en compte la variabilité de la technique elle-même et celle liée à la répartition de la fibrose dans l'échantillon. Si l'on compare au score semiquantitatif donné par un anatomopathologiste, celui-ci s'évalue sur 5 niveaux et a donc une dynamique plus faible que notre score. Il est affecté de la même manière par l'inhomogénéité de la répartition de la fibrose dans l'échantillon et une évaluation de la variabilité inter-opérateur a montré qu'elle permettait difficilement de comparer les scores obtenus entre différentes équipes[148].

Enfin, il faut noter que le score D calculé dans le cortex que nous calculons se corrèle bien avec les mesures de glomérulosclérose et de fibrose interstielle faites à partir des coupes colorées au trichrome de Masson alors que ces dernières sont réalisées sur l'autre rein de la souris. Ceci indique que la visualisation d'une coupe coronale semble suffir pour évaluer l'état physiopathologique de l'ensemble des 2 reins.

D'autre part, lors d'une étude préliminaire, nous avons quantifié la fibrose chez des femelles appartenant au même fond génétique (C57BL/6J) et qui n'ont subi aucun traitement. Bien que le nombre de ces femelles soit trop faible pour tirer des conclusions statistiques avérées ($p = 0,89$), il semblerait qu'elles aient un score D ($0,16\%_{[0;0,66]}$) encore inférieur à celui des mâles du groupe témoin ($0,32\%_{[0,22;0,42]}$). Ce dernier point impliquerait que là où le score du pathologiste classe toutes les souris au niveau 0, le score D mesuré en microscopie SHG est encore capable de différencier plusieurs niveaux pathologiques.

3.3.4 Conclusion

La comparaison de l'évaluation de la fibrose grâce à la microscopie multiphoton et de celle réalisée au trichrome de Masson est la suivante :

- Il existe une bonne corrélation entre le score D de fibrose et le score d'atteinte interstitielle, ce qui montre que le score D est bien représentatif de l'état de la fibrose.
- Nous avons mis en évidence une corrélation entre le score D et la glomérulosclérose. Ces deux processus semblent donc se développer en parallèle dans la fibrose hypertensive. Il serait intéressant d'étudier un modèle de fibrose sans glomérulosclérose.

- La sensibilité de la quantification semble meilleure par microscopie multiphoton. Le score D est évalué sur une échelle continue qui possède une plus grande dynamique.
- Il est plus reproductible dans le temps et l'espace car il dépend peu de l'opérateur et ne nécessite pas de coloration.
- La visualisation 3D amène un réel avantage car elle permet de mieux appréhender l'organisation des fibres dans l'espace. Nous avons observé une continuité entre la fibrose interstielle, la fibrose péri-glomérulaire et l'adventice des vaisseaux. Dans le cortex, les zones de fibroses sont souvent associées à la présence d'artérioles entourées de collagène. Bien que nos mesures de l'épaisseur de l'adventice des artère arquées n'ont pas mis en évidence d'épaississement de celles-ci, il pourrait en être autrement pour les plus petits vaisseaux. En effet, les artérioles ne sont pas constitutivement entourées de collagène fibrillaire et il se pourrait que le collagène que nous visualisons autour de ces dernières ait été nouvellement synthétisé. Plus globalement, cela pose la question de la relation entre la présence de vaisseaux et la fibrose et nous porte à croire qu'une partie du signal induisant la fibrose est transmis par l'intermédiaire des vaisseaux sanguins. Nous approfondirons cette question dans le chapitre suivant.
- La spécificité du signal permet de différencier aisément le processus de fibrose interstitielle et celui de sclérose des glomérules.
- La combinaison des différents scores permet une analyse plus fine de la fibrose. Une meilleure compréhension du processus de SHG par le collagène aiderait d'ailleurs à tirer encore plus d'information sur la fibrose.
- Le temps d'acquisition, le volume de données informatiques et le coût jouent par contre en défaveur de la technique de quantification par microscopie multiphoton.

Il faut tout de même noter la difficulté de comparer une technique basée sur l'oeil humain et notre technique. En effet, la sensiblité de l'opérateur et sa capacité à discriminer différents stades de fibrose sont subjectifs et on ne peut donc pas avoir de critères quantitatifs de comparaison. En fait, il serait bien plus convainquant de confronter notre technique à une méthode informatisée d'analyse de coupes colorées au trichrome de Masson, ce qui sera fait dans le chapitre 4.4.

3.4 Conclusion

La méthodologie que nous avons mis au point permet à la fois une évaluation de l'état pathologique des tubules grâce à la vision morphologique offerte par le signal 2PEF, la visualisation de la distribution 3D de la fibrose interstitielle et sa quantification, et le suivi du remodelage des artères.

Cette méthodologie peut, bien évidemment, s'appliquer à d'autres pathologies fibrosantes et sur d'autres organes. On peut citer le travail préliminaire d'A.-M. Pena sur la fibrose pulmonaire[36], mais aussi les récent travaux du Prof. Yu[149] sur la fibrose du foie qui reprennent en partie notre méthodologie. On peut aussi noter que des approches similaires ont été utilisées pour quantifier la quantité de collagène rapportée à celle de l'élastine dans le derme[150;151;152].

Maintenant que nous avons validé la technique, montré son intérêt et ses possibilités sur un modèle simple de fibrose, notre prochain chapitre sera consacré à son application en recherche biomédicale pour élucider les mécanismes de la fibrose rénale et en diagnostique chez l'homme.

Chapitre 4

Résultats Biologiques

Dans le chapitre précédent, nous avons validé la méthode de quantification de la fibrose rénale par microscopie multiphoton. Pour aller plus loin, nous voulons utiliser cette méthodologie pour répondre à plusieurs problématiques biologiques. Quel est le rôle de la transglutaminase dans la fibrose ? Son inhibition a-t-elle un effet bénéfique ? Comment se développe la fibrose dans d'autres modèles que le modèle hypertensif ? Quel est le potentiel prédictif de la méthode sur des biopsies rénales de patients humains ? C'est à toutes ces questions que nous essayerons de répondre durant ce chapitre.

4.1 Rôle de la TG2 dans la fibrose rénale

4.1.1 Principe de l'étude

Le chapitre 1.2 présente l'action de la transgluminase 2. La corrélation entre l'expression et l'activation de la TG2 et les lésions rénales a déjà été montrée chez des patients atteints de néphropathie chronique[31]. Une étude sur des cultures de cellules tubulaires proximales a aussi démontré que l'inhibition de la TG2 réduisait l'accumulation de matrice extracellulaire sans modifier la synthèse de matrice extracellulaire et de TGF-β dans un modèle de fibrose induite par des concentrations élevées de glucose[33]. L'étape suivante, à laquelle nous avons voulu nous attaquer, consiste à prouver que l'inhibition de la TG2 peut aussi être bénéfique dans un modèle animal.

Nous avons commencé par des études sur l'inhibition de la TG2 dans le modèle de fibrose induite par l'angiotensine II. Le groupe du Prof. Chaitan Kholsa (Stanford University, Etats-

Unis) nous a fourni pour cela un inhibiteur expérimental, le KCC009. Cependant, celui-ci s'est révélé peu soluble, probablement mal diffusé dans les tissus et rapidement éliminé par l'organisme[153]. Des mesures de l'activité de la TG2 nous ont effectivement montré que nous ne parvenions pas à inhiber correctement la TG2 dans le rein. C'est certainement ce qui a conduit à l'échec d'une étude sur la limitation de la progression de la fibrose dans le modèle AngII par cet inhibiteur.

En attendant la mise au point d'un inhibiteur efficace *in vivo*, nous nous sommes repliés sur une solution alternative utilisant des souris modifiées génétiquement déficientes en TG2. Les souris TG2(-/-) ont été conçues par l'équipe de Vincenzo de Laurenzi et Gerry Melino dans le laboratoire de Biochimie IDI-IRCCS du département de médecine expérimentale à l'université de Tor Vergata (Rome, Italie)[154]. Ces souris ont été modifiées génétiquement de façon à remplacer le site actif de l'enzyme par une cassette de résistance à la néomycine. Il est intéressant de voir que la délétion du gène de la TG2 n'a, a priori, que peu d'effets sur les souris. Les portées des souris TG2(-/-), dont le gène codant pour la TG2 a été modifié, sont menées jusqu'à leur terme, sans augmentation des fausses couches, et ne présentent pas de phénotype particulier. Toutefois chez les souris âgées de plus d'un an, la fréquence de maladies auto-immunes, de splénomégalie et de glomérulonéphrite est anormalement élevée[155]. Cette modification génétique avait été réalisée initialement sur des hybrides de souris SV129 et C57BL/6J sur lesquelles nous avons mené une étude pilote. Toutefois, il est plus rigoureux de travailler sur un fond génétique pur et le gène modifié a donc été transféré sur un fond génétique pur C57BL/6J par des croisements successifs. Il faut noter que les souris C57BL/6J sont plus résistantes à la fibrose hypertensive que les souris SV129[156], mais comme il existe plus de souris modifiées génétiquement avec le fond génétique C57BL/6J, il nous a semblé que ce fond génétique nous ouvrait plus de perspectives par la suite.

Notre étude a consisté à appliquer le modèle de fibrose induite par l'angiotensine II à des souris TG2(-/-) (N=9) et TG2(+/+) (N=10) mâles âgées de 10 à 12 semaines pendant 28 jours. Les souris TG2(-/-) proviennent de l'élevage de nos collaborateurs de l'hôpital Lariboisière, et les souris TG2(+/+) sont fournies par Charles River, France à un äge et un poids similaire aux TG2(-/-).

La perfusion d'angiotensine se fait comme décrit précédemment au chapitre 3.3.1, à l'aide de pompes osmotiques sous-cutanées réglées pour délivrer 1 $\mu g/kg/min$ d'angiotensine II. Pendant le traitement, la pression artérielle des souris, leur poids et leur albuminurie ont été

relevés régulièrement, puis après 28 jours elles ont été sacrifiées et leurs reins ont été prélevés pour être étudiés.

4.1.2 Résultats

Méthodes conventionnelles

Mortalité L'étude comprenait 9 souris TG2(+/+) et 10 souris TG2(-/-) d'un poid équivalent au début de l'étude. Trois souris TG2(+/+) sont mortes durant l'étude comparée à 1 souris chez les TG2(-/-). Toutefois cette différence n'est pas significative ; pour ces données la probabilité que la mortalité soit plus élevée chez les souris TG2(+/+) n'est que de 80%.

Pression artérielle

Avant de commencer l'étude, nous avons mesuré les pressions artérielles systoliques des souris au niveau de l'artère de la queue. Nous obtenons une pression de $99,8_{[87,8;111,7]}\ mmHg$ pour les TG2(+/+) et une pression de $113,9_{[105,9;121,8]}\ mmHg$ pour les TG2(-/-). La probabilité d'avoir une pression artérielle systolique plus élevée chez les souris modifiées génétiquement est alors de 97%. On ne retrouve pas ce résultat dans l'étude pilote réalisée avec des souris possédant un fond génétique mixte. Cependant, Bakker *et coll.*[157] ont montré un rôle de la TG2 dans le remodelage artériel qui pourrait expliquer cette différence.

Si l'on fait la moyenne sur les mesures faites entre le $8^{\text{ème}}$ et le $28^{\text{ème}}$ jour, c'est à dire une fois que l'hypertension artérielle s'est stabilisée, on trouve une pression de $175.6_{[165.3;185.9]}\ mmHg$ pour les souris sauvages, et $170.0_{[162.5;177.6]}\ mmHg$ pour les souris modifiés génétiquement. Les deux valeurs ne sont pas significativement différentes, ce qui signifie que les deux groupes de souris subissent une hausse de leur pression artérielle similaire.

Albuminurie

Le groupe des souris témoins a un niveau moyen plus élevé ($3,46_{[2,02;4,90]}\ mg/mmol$) que le groupe des souris TG2(-/-) ($0,88_{[0,74;1,02]}\ mg/mmol$). Encore une fois cette différence n'était pas visible dans notre étude pilote sur des souris avec un fond génétique mixte. Elle demandera donc à être confirmée dans une seconde étude d'autant plus que le protocole de dosage de l'albuminurie qui a été utilisé ici n'est pas très sensible aux valeurs basses. Il est toutefois envisageable que la barrière de filtration glomérulaire ou que les paramètre hémodynamiques soient différents chez les souris TG2(-/-) ce qui expliquerait la différence dans le RAC. Quoiqu'il en soit, les deux groupes ont un rapport RAC dans la norme physiologique.

Après 28 jours de traitement, le RAC des souris TG2(+/+) varie entre $1,9$ à $1232,8$ $mg/mmol$ alors que dans les valeurs vont de $0,4$ à $83,9$ $mg/mmol$ pour les souris TG2 (-/-). Si l'on définit un seuil à 64 $mg/mmol$ soit 10x le seuil que nous avions défini comme normal dans le chapitre précédent (voir paragraphe 3.3.2), 8 souris sur les 9 souris TG2(-/-) sont en dessous alors que seules 2 souris sur 7 sont en dessous chez les TG2(+/+). La probabilité pour une souris TG2(+/+) d'avoir un RAC supérieur à 10 fois le niveau normal est significativement plus grande que celle pour une souris TG2(-/-) (p $>$ 99%).

On peut alors conclure que la variation du RAC entre J0 et J28 indique une atteinte supérieure chez les souris TG2(+/+) de la barrière de filtration des glomérules.

Glomérulosclérose

Dans une étude préliminaire, nous avons étudié le taux de glomérulosclérose des souris TG2(-/-) n'ayant pas subi le traitement à l'angiotensine. Cette étude comprenait 4 souris et nous avons obtenu un score moyen de glomérulosclérose de $24,0\%_{[5,9;42,0]]}$ qu'il faut comparer au score des souris sauvages sans traitement : $10,8\%_{[6,2;15,4]}$ (voir chapitre 3.3.2). La probabilité pour que le score de glomérulosclérose des souris TG2(-/-) non traitées soit moins élevé que chez les souris TG2(+/+) est supérieur à 95%. La différence entre les souris TG2(+/+) et TG2(-/-) vient aussi du fait que la plupart des glomérules des souris modifiées génétiquement semblent présenter une densité cellulaire plus élevée et que nous les avons alors considérés comme anormaux.

Après 28 jours de traitement à l'angiotensine II, les souris TG2(-/-) ont un score moyen de $40.5\%_{[32,3;48,8]}$ alors que les souris TG2(+/+) ont un score moyen de $77.4\%_{[64,5;90,3]}$ significativement supérieur ($p > 99.9\%$). On remarque que le score des souris sauvages après 28 jours de traitement est différent de celui de l'étude exposée dans le chapitre précédent ($48,1\%_{[34,6;61,5]}$). Nous pensons que cette différence provient essentiellement de la variabilité de l'opérateur. En effet, près d'un an s'est écoulé entre la réalisation de cette évaluation de glomérulosclérose et la précédente. Or, nos collaborateurs ne pratiquent pas quotidiennement ce type d'évaluation et il est plus que probable que les critères utilisés pour définir un glomérule scléreux aient dérivé avec le temps. Dans l'idéal, il faudrait réévaluer toutes les lames histologiques le même jour pour pouvoir ensuite comparer les scores obtenus entre des séries réalisées à des dates aussi éloignées.

Comme le montrait déjà l'étude du rapport albuminurie sur créatininurie, la glomérulosclérose indique une protection relative des souris TG2(-/-) contre le développement de la

néphropathie.

Microscopie multiphoton

Distribution visualisée par microscopie multiphoton

Comme on peut le voir dans la figure 4.1, la distribution des fibres de collagène chez les souris sauvages semble identique à celle observée chez les souris modifiées génétiquement. Mises à part les artères, on retrouve des accumulations focales de collagène dans la médulla et une distribution de petites fibres dans le cortex, qui donne l'impression réccurente que les zones de fibrose sont parallèles aux artérioles interlobulaires. On observe aussi une fibrose peri-glomérulaire et interstitielle dans les 2 cas. La différence essentielle est, comme nous allons le voir, l'extension et l'importance plus grande de la fibrose chez les souris sauvages.

Scores de fibrose obtenus à partir des images multiphoton

Nous avons vu dans le chapitre précédent que le score D dans le cortex est le plus robuste pour évaluer la fibrose rénale. Pour cette série de souris, nous obtenons un score de $0,41\%_{[0,15;0,67]}$ pour les souris sauvages après 28 jours de traitement, alors qu'il est de $0,21\%_{[0,11;0,31]}$ pour les souris TG2(-/-). Toutefois, avec ces données seulement, la probabilité que le score des souris modifiées génétiquement soit inférieur à celui des souris sauvages n'est que de 93%.

Pour affiner ce résultat, nous avons décidé de tester cette hypothèse en incluant dans l'étude les souris TG2(+/+) traitées pendant 28 jours avec de l'angiotensine II de l'étude du chapitre précédent, ainsi que des souris TG2(-/-) provenant d'une étude préliminaire (ces souris ne présentaient toutefois pas un fond génétique C57BL/6J parfaitement pur). Ce regroupement nous paraît légitime pour plusieurs raisons. Tout d'abord, toutes les souris proviennent du même fond génétique. Ensuite, le traitement qu'elles ont subi est le même. Enfin, contrairement au score de glomérulosclérose, la méthodologie et les critères d'évaluation sont parfaitement identique puisque l'analyse est automatisée. Pour valider le regroupement, nous nous sommes aussi assurés qu'il n'existait pas de différence statistique entre les mesures du score D sur chacun des groupes pris individuellement.

Une fois le regroupement opéré, les intervalles à 95% sont alors plus restreints et on obtient : $0.45\%_{[0,35;0,55]}$ pour les souris TG2(+/+) (N=15) et $0.23\%_{[0,12;0,34]}$ pour les souris TG2(-/-) (N=11). La probabilité pour que les souris TG2(-/-) soit moins atteintes par la fibrose est alors de 99.6% [fig.4.2].

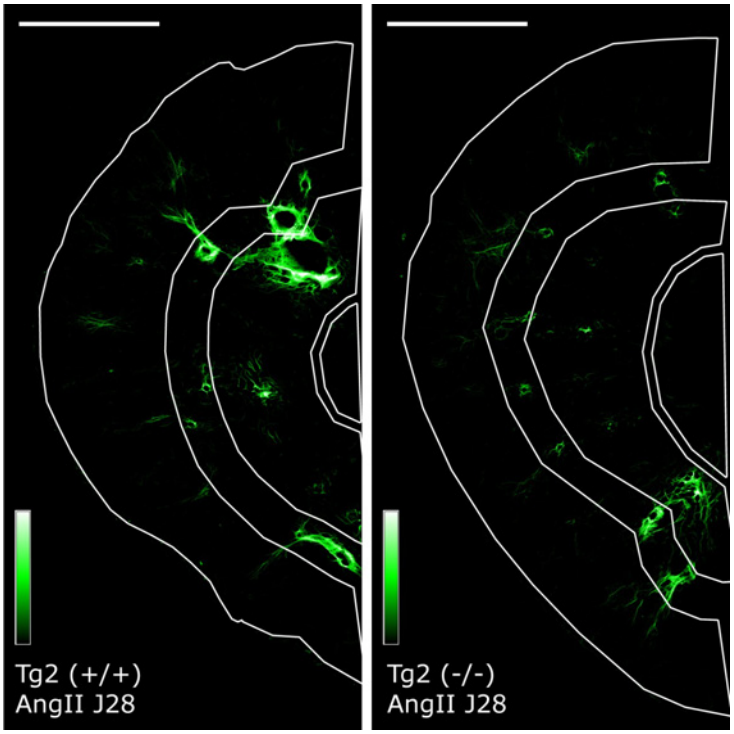


FIGURE 4.1 – Distribution du score D de SHG pour des coupes coronales de rein de : [TG2(+/+) AngII J28] souris sauvage et [TG2(-/-) AngII J28] souris modifiée génétiquement, traitées pendant 28 jours à l'angiotensine II . L'échelle de couleur représente le pourcentage de voxels supérieurs au seuil sur une pile d'images de $z = 40\ \mu m$ (Noir = 0% - Vert = 50% - Blanc = 100%). Barre d'échelle : 1 mm. Les lignes blanches correspondent à la segmentation utilisée pour le score final : (C) Cortex - (M) Médulla - (P) Papille. Les scores SHG calculés pour ces 2 souris et dans ces 3 régions sont de : TG2(+/+) : (C) $0,36\%$ (M) $3,63\%$ (P) $0,10\%$; TG2(+/+) : (C) $0,27\%$ (M) $1,06\%$ (P) $0,10\%$

Dans la série préliminaire, nous avions aussi mesuré le score de fibrose de souris TG2(-/-) non traitées à l'angiotensine II et obtenu un score de $0,19\%_{[0,00;0,50]}$, qu'il faut comparer au score de $0,32\%_{[0,22;0,42]}$ des souris sauvages non traitées. Toutefois, le faible nombre (N=3) de souris TG2(-/-) ne nous permet pas de conclure et la probabilité a postériori de la moyenne du score D est très large. Cela entraine une forte incertitude sur la valeur de la moyenne. La probabilité que le score des souris modifiées génétiquement soit inférieur à celui des souris sauvages n'est alors que de 83%. Pour obtenir un résultat significatif, il nous faudrait étudier une cohorte de souris TG2(-/-) témoin plus importante. Malheureusement, la rareté de ces souris TG2(-/-) et le temps nécessaire à leur reproduction ne nous ont pas permis de conduire cette étude. Pour finir, si l'on compare directement les souris TG2(-/-) AngII J28 aux souris TG2(+/+) témoin, la différence n'est pas significative non plus.

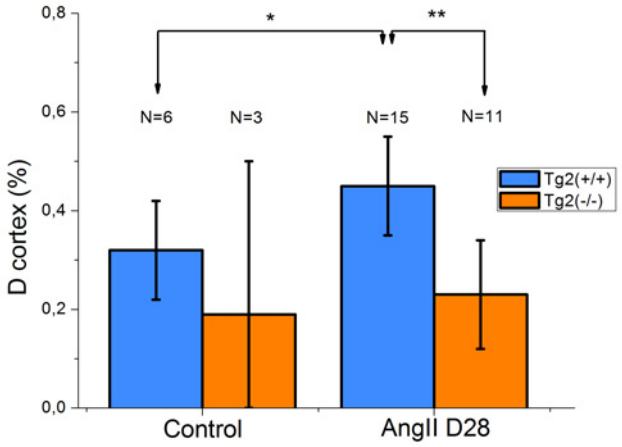


FIGURE 4.2 – Score de fibrose D mesuré dans le cortex : comparaison entre des souris TG2(+/+) et TG2(-/-) ayant subi ou non un traitement par l'angiotensine II pendant 28 jours. Les barres d'erreurs représentent les intervalles de probabilité à 95%. Les moyennes sont réalisées en prenant en compte toutes les études que nous avons faites avec des souris de ce type : TG2(+/+) Témoin : 6 souris ; TG2(-/-) Témoin : 3 souris ; TG2(+/+) AngII J28 : 15 souris ; TG2(-/-) AngII J28 : 11 souris

Comme la TG2 a un rôle dans la stabilisation de la matrice extracellulaire, il nous est aussi apparu intéressant de regarder si le score SF qui mesure l'organisation submicrométrique des fibres variait entre les souris TG2(+/+) et TG2(-/-). Aucune variation significative

n'est apparue entre les 2 groupes indiquant que l'organisation submicrométrique des fibres de collagène avec ou sans TG2 variait peu, ou en tout cas ne modifiait pas leur efficacité à générer du second harmonique.

Pour résumer, à l'état de base, les souris TG2(-/-) ont un score de fibrose D dans le cortex voisin voire inférieur à celui des souris TG2(+/+). Après 28 jours de traitement par l'angiotensine II, seules les souris TG2(+/+) ont des scores significativement plus élevés alors que les souris TG2(-/-) semblent rester au même niveau que leur état de base malgrès une hypertension artérielle comparable.

Dégradation des fibres de collagène

Les études présentées ci-dessus montrent que même si la pression artérielle des souris TG2(-/-) augmente de la même façon que chez les souris sauvages, leurs reins semblent moins en souffrir comme en témoignent les mesures d'albuminurie, les scores de glomérulosclérose et les scores de fibrose interstitielle. Ce constat fait, deux hypothèses sont envisageables : soit l'absence de TG2 inhibe la production des fibres de collagène, soit la synthèse des fibres reste au même niveau mais les processus de dégradation sont plus importants.

Nos collaborateurs, Pierre Louis Tharaux et Monica Hernest, ont alors proposé de faire un dosage des fragments de dégradation des fibres de collagène I, plus spécifiquement de l'antigène ICTP[158](Type I Collagen TeloPeptide). Brièvement, ce dosage est réalisé à partir d'un morceau de rein dont on extrait une partie des protéines en l'incubant 24h dans du milieu de culture. Des anticorps spécifiques de l'ICTP servent ensuite à en évaluer la quantité rapporté à la masse du tissu utilisé. On trouvera une description plus détaillée dans la thèse de Monica Hernest. Par ailleurs, la comparaison de l'expression de l'ARNm de proColα_1I en RT-PCR, réalisée par Cécile Fligny (Article en préparation), n'ont pas démontré d'influence de la TG2 sur cette expression.

Cette technique a mis en évidence une quantité significativement plus importante de fragments chez les souris TG2(-/-) que chez les souris TG2(+/+) ayant subi le traitement à l'angiotensine pendant 28 jours. La dégradation des fibres de collagène est donc plus importante chez les souris déficientes en TG2.

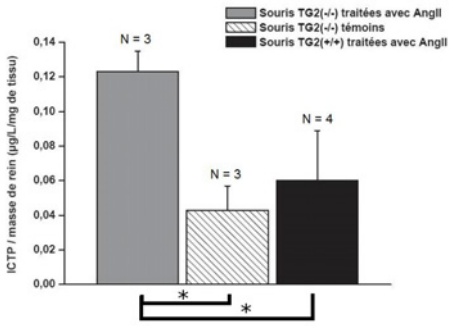


FIGURE 4.3 – Dosage immunoenzymatique des fragments de dégradation des fibres de collagène I(ICTP) dans les reins de souris TG2(+/+) hypertensives et TG2(-/-) traitées ou non avec l'AngII. Les résultats obtenus sont normalisés par le poids des tissus analysés. Valeurs moyennes + SEM ; * : $p<0.05$ évalué par un test exact [source : Thèse de Monica Hernest]

4.1.3 Conclusion

Au final, les souris déficientes en TG2 sont plus résistantes à l'hypertension, et ce, sur tous les indices de gravité de la néphropathie que nous avons mesurés. Le dosage de fragment de dégradation du collagène amène une information supplémentaire : bien que les souris TG2(-/-) présentent moins de fibrose interstitielle, ce sont elles qui dégradent le plus de collagène I. L'avantage procuré par la TG2 ne se situe probablement pas au niveau de la synthèse de collagène, mais au niveau de sa dégradation[27]. On pourrait aussi imaginer que les liaisons covalentes créées par la TG2 limitent la solubilisation des fragments ICTP qui resterait ancrés à la matrice extracellulaire. Ce résultat est en accord avec les rôles connus de la TG2 puisque cette enzyme crée des liens covalents entre protéines de la matrice extracellulaire et la rend plus résistante à la dégradation. La déficience en TG2 permet ainsi aux souris de dégrader les molécules de collagène en surplus et d'éviter qu'elles ne s'accumulent.

Cette étude montre tout le potentiel thérapeutique que pourrait avoir l'inhibition de la TG2 chez des patients atteints d'hypertension. Bien sûr, il faut encore valider que l'inhibition pharmacologique de la TG2, plutôt que sa suppression par génie génétique, permet d'observer des résultats similaires.

4.2 rôle de la TG2

Pour préciser le rôle de la TG2 dans la fibrose, nous avons voulu visualiser sa localisation et son activité par rapport aux zones de fibrose. Cette étude est possible en combinant la détection du collagène fibrillaire par microscopie SHG et celle d'un marqueur de la TG2 ou de son activité visualisée par microscopie 2PEF.

4.2.1 Présence de la tranglutaminase 2

La méthodologie utilisée pour le marquage immunohistochimique de la TG2 est similaire à celui utilisé pour les marquages anti-collagènes I et IV décrit dans le paragraphe 2.3.1. Des coupes minces ont été réalisées au cryostat puis fixées dans l'acétone. Après un rinçage au PBS, elles ont été incubées successivement avec deux anticorps : l'anticorps primaire, un anticorps polyclonal de lapin anti-TG2 de souris (Covalab pab0024 dilué 1/100) et l'anticorps secondaire, un anticorps de chèvre anti-lapin conjugué à la fluorescéine (FI-1000 Vector Labs).

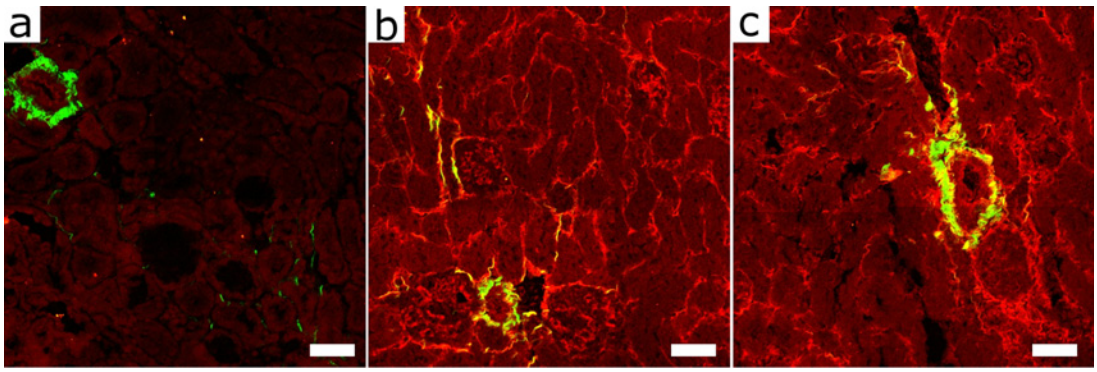


FIGURE 4.4 – Marquage immunohistochimique anti-TG2 sur des coupes minces de rein de souris : (a) souris TG2(-/-) AngII J28 ; (b) souris TG2(+/+) Témoin ; (c) souris TG2(+/+) AngII J28 ; excitation laser de 25 mW à 800 nm ; SHG (vert) détecté en transmission ; 2PEF (rouge) acquise en épidétection ; barre d'échelle 50 μm

La figure 4.4 illustre le résultat du marquage de la TG2 chez des souris TG2(+/+) ayant été traitées ou non par de l'angiotensine II pendant 28 jours et chez des souris TG2(-/-) ayant subi le traitement pendant 28 jours. Nous constatons que la fluorescence de la coupe de la souris TG2(-/-) rendue hypertendue est très faible comparée aux 2 autres cas. L'intensité de fluorescence observée est faible et provient sûrement de la fluorescence endogène. L'in-

activation de la TG2 inhiberait donc bien sa synthèse, ou du moins la protéine synthétisée n'est plus reconnue par l'anticorps. Même si une partie du signal de fluorescence était due au marquage de la TG2, celle-ci est cantonnée à l'intérieur des cellules, ce qui prouve à tout le moins que la TG2 n'est pas externalisée. Une analyse quantitative exhaustive réalisée au microscope de fluorescence conventionnel par nos collaborateurs a montré une augmentation de la synthèse de TG2 chez les souris sauvages hypertendue (Thèse de Monica Hernest et figure 4.5(B)).La TG2 est un peu exprimée dans le cytoplasme des cellules tubulaires des souris sauvages, mais surtout dans l'espace interstitiel et dans le floculus des glomérules. Il est cependant possible que le faible marquage intra-cellulaire ne soit pas dû à une absence de TG2 mais à une mauvaise pénétration de l'anticorps dans les cellules.

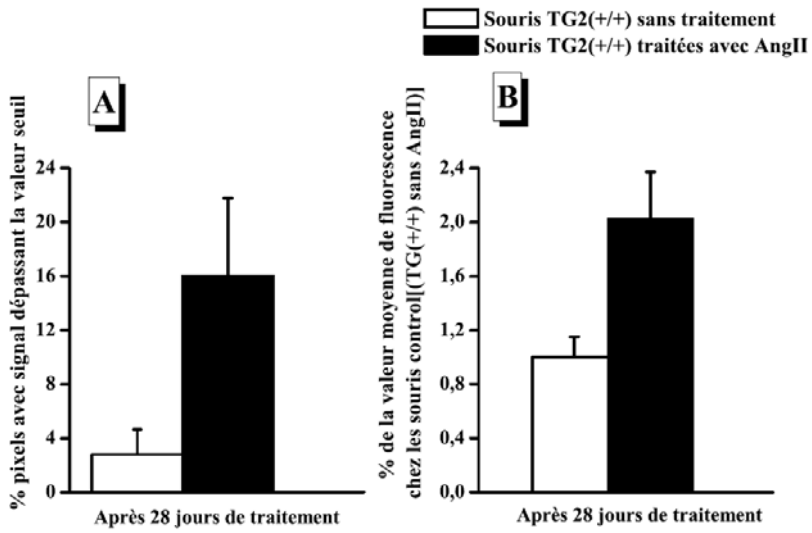


FIGURE 4.5 – Quantification chez des souris souvages de la superficie occupée par le signal de fluorescence généré par : (A) le marquage $His_6 - Xpress - GFP$; (B) le marquage des anticorps anti-TG2

Enfin, on note que la colocalisation du signal 2PEF du marquage anti-TG2 et du signal SHG du collagène est incomplète : le marquage de la TG2 est présent dans l'interstitium en l'absence de collagène ; en revanche partout où le signal de second harmonique est enregistré, nous avons détecté la présence de la TG2.

4.2.2 Activité de la tranglutaminase 2

Pour visualiser l'activité de la TG2, nos collaborateurs ont directement utilisé sa capacité à créer des liaisons covalentes, en mesurant l'hybridation *in situ* d'un substrat synthétique fluorescent. Ce substrat, une protéine recombinée, $His_6-Xpress-GFP$ est surexprimée dans des bactéries E-coli modifiées génétiquement que nous a fourni le groupe de Yutaka Furutani du département de Biologie de l'Institut de Technologie de Yokohama (Japon). Cette méthode est décrite en détail dans l'article de Furutani *et coll.*[159].

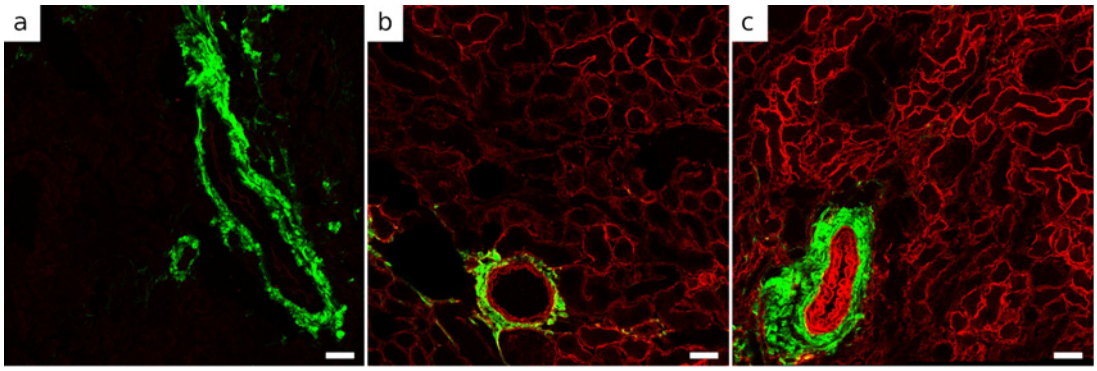


FIGURE 4.6 – Marquage $His_6 - Xpress - GFP$ sur des coupes minces de rein de souris : (a) souris TG2(-/-) AngII J28 ; (b) souris TG2(+/+) Témoin ; (c) souris TG2(+/+) AngII J28 ; Excitation laser de 20 mW à 800 nm ; SHG (vert) détecté en transmission ; 2PEF (rouge) détecté en épidétection ; Echantillonnage pixel 530×530 nm^2 ; barre d'échelle 50 μm

Le marquage au $His_6 - Xpress - GFP$ ne révèle aucune activité de la TG2 chez les souris TG2(-/-) comme on peut le voir sur la figure 4.6. Cela n'est pas étonnant puisque déjà le marquage anti-TG2 révèlait l'absence de TG2, mais ceci indique la bonne spécificité du substrat rapporteur $His_6 - Xpress - GFP$. Chez les souris TG2(+/+), le marquage est essentiellement localisé dans l'interstitium tubulaire avec des zones d'intensité variable qui s'étendent sur plusieurs centaines de microns. L'activité varie aussi en fonction de la zone anatomique : elle est nettement plus importante dans le cortex et la médulla externe que dans la médulla interne et la papille. Enfin, l'activité TG2 chez les souris traitées par l'angiotensine II est plus importante ($p<0,05$) que celle mesurée chez les souris normotendues [fig.4.5(A)].

Si l'on regarde les images avec un plus fort grossissement [fig.4.7], on remarque que l'espace interstitiel n'est pas marqué de façon uniforme. $His_6-Xpress-GFP$ a été fixé préférentiel-

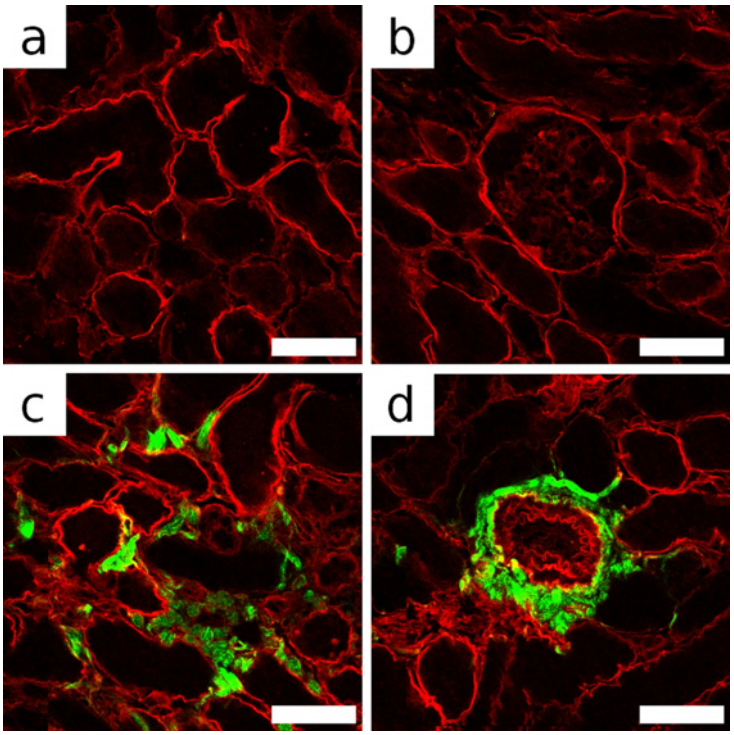


FIGURE 4.7 – Marquage $His_6 - Xpress - GFP$ sur des coupes minces de rein de souris : (a) Zone corticale d'une souris TG2(+/+) : la fluorescence provient essentiellement des zones membranaires des cellules ; (b) Glomérule d'une souris TG2(+/+) AngII J28 : on observe un léger marquage du floculus et un fort marquage de la capsule de Bowman ; (c) Zone corticale fibrosée d'une souris TG2(+/+) AngII J28 : l'activité de la TG2 et le collagène ne sont pas colocalisés ; (d) Artère d'une souris TG2(+/+) AngII J28 : on observe un fort marquage de la média de l'artère. Excitation laser à 800 nm - 20 mW ; SHG (vert) sur la voie en transmission ; 2PEF (rouge) sur la voie en épidétection ; échantillonnage pixel 530×530 nm^2 ; barre d'échelle 50 μm

lement dans les membranes des tubules mais aussi par certaines structures entre les tubules qui ressemblent à des capillaires. Cette localisation en ligne doublée dans l'interstitium avait déjà été relevé par Johnson *et coll.*[30]. On remarque aussi un marquage fluorescent provenant du floculus des glomérules, sur la capsule de Bowman et dans la média des artères. Il est également intéressant de voir que l'intensité du marquage est assez constante sur le pourtour d'un tubule donné.

Ceci soulève la question de la nature des cellules responsables de la production de TG2.

L'immunomarquage anti-TG2 décrit ci-dessus ne nous permet pas de répondre totalement à cette question car le marquage intracellulaire semble peu efficace.

Nos collaborateurs ont alors réalisé une série de co-marquages à la recherche du type cellulaire producteur de la TG2 interstitielle :

Anti-TG2 / CX3CR1-EGFP On utilise des souris transgéniques[160] qui exprime l'EGFP sous le contrôle du promoteur CX3CR1 qui est une protéine de surface des cellules dendritiques (macrophage résidents dans les tissus).

Anti-TG2 / Anti-CD31 Les anticorps anti-CD31 marquent un récepteur membranaire spécifiques des cellules endothéliales (cellules des vaisseaux en contact avec le sang).

Anti-TG2 / Anti-NG2 Les anticorps anti-NG2 reconnaissent un protéoglycane spécifique à la surface des pericytes (cellules enroulées autour des capillaires), des cellules mésangiales (cellules qui supportent les capillaires dans le glomérule) et des cellules musculaires lisses des artèrioles.

Ces différents marquages ont montré une bonne corrélation entre le marquage anti-TG2 et le marquage anti-NG2 ce qui nous pousse à croire que ce sont ces cellules qui sont principalement responsables de la synthèse de TG2. Cette hypothèse, même si elle demande à être confirmée par d'autres expériences, est très intéressante puisqu'elle lierait assez simplement l'hypertension et la production de TG2 par des cellules qui servent à assurer le maintien des capillaires. Ces données suggèrent que les pericytes pourraient participer à la fibrose interstitielle, ce qui n'a pas encore été rapporté à notre connaissance.

Etonnamment, il n'y a pas de corrélation entre l'intensité du marquage de l'activité TG2 et la présence de fibres comme on peut le voir sur la figure 4.7(c). Pour aller plus loin dans cette analyse, nous avons quantifié la fluorescence en prenant comme référence l'intensité de fluorescence dans la souris TG2(-/-). A partir de celle-ci, nous avons défini un seuil égal au minimum d'intensité pour que 99,7% des pixels de la coupe soit inférieur au seuil. Cette valeur du seuil nous permet de garantir que lorsqu'un pixel a une intensité qui dépasse le seuil, cela provient bien du marquage et non pas de la fluorescence endogène. Au final, on remarque que les pixels avec une intensité SHG significative ont aussi dans plus de 90% des cas une fluorescence supérieure au seuil. La présence de collagène implique donc la présence de TG2, mais l'inverse n'est pas vérifié. Il n'en reste pas moins que les zones fibrosées ont une activité TG2 très faible. Le lien entre l'intensité de l'activité TG2 et la fibrose n'est donc pas évident.

Le résultats expérimentaux doivent tout de même être examinés avec prudence, car $His_6 - Xpress - GFP$ est une molécule assez volumineuse qui pourrait avoir du mal à pénétrer dans le tissu fibrosé. C'est en effet visible en microscopie multiphoton puisque dans les glomérules, seule la partie qui est à la surface de la coupe est fluorescente. Dès que l'on pénètre de quelques microns dans la coupe, la fluorescence dans le floculus disparaît. Cela pourrait aussi expliquer le faible marquage à l'intérieur des cellules et des zones fibrosées où le collagène forme un arrangement dense. Les sites accepteurs et donneurs de liaisons covalentes pourraient être saturés pour des fibres matures ce qui limiterait l'incorporation du substrat synthétique. D'autre part, les régions les plus fibreuses sont dé-cellularisés ce qui limite, de fait, la production locale de TG2. Ainsi, l'activité de la TG2 peut tout à fait précéder l'observation des fibres.

4.2.3 Conclusion

Ces études sur la relation entre la TG2 et la formation de la fibrose dans le rein ne nous permettent pas de conclure définitivement sur les mécanismes qui lient la TG2 et la fibrose. Toutefois, elles illustrent bien un autre intérêt de la génération de second harmonique pour l'étude des processus fibrosants. En effet, la possibilité de visualiser le collagène sans marquage grâce à la SHG, nous a permis de réaliser simplement une étude de colocalisation du signal d'un fluorophore exogène et du collagène. Sans cette possibilité, nous aurions pu réaliser un double marquage immunohistochimique anti-TG2 anti-Collagène I, mais cela aurait été nettement plus délicat, et donc moins fiable, dans le cas du marquage de l'activité par la protéine $His_6 - Xpress - GFP$. En effet la technique de marquage de l'activité est très différente de celle des marquages immunohistochimiques car elle s'effectue sur des tissus non fixés.

4.3 Autres modèles de fibrose

Nous avons voulu tester d'autres modèles de fibroses pour plusieurs raisons. Tout d'abord, nous voulions observer comment les fibres de collagène se développaient et s'organisaient lorsque les causes de la fibrose étaient différentes. Ensuite, si le modèle de fibrose induite par l'angiotensine II est un modèle intéressant, car il mine bien les conséquences à long terme de l'hypertension artérielle, la fibrose se développe assez lentement et il faut attendre 49 jours pour observer une fibrose importante. Cela implique qu'une étude complète va durer entre

2 et 3 mois, ce qui rend le travail assez lent. Un modèle dans lequel la fibrose serait plus importante et d'une progression plus rapide, nous permettrait de tester l'effet de la TG2 plus facilement. Enfin, l'un de nos buts a toujours été d'utiliser la microscopie multiphoton *in vivo in situ*. Sans ajouter d'optique adaptative, la microscopie multiphoton permet de visualiser la première centaine de microns depuis l'extérieur du tissu. Or, dans le modèle de fibrose induite par l'angiotensine la fibrose se développe surtout dans le cortex profond et la médulla. Nous voulions éudier si un autre modèle serait plus adapté à ce genre d'études.

4.3.1 Modèle UUO

UUO est l'acronyme de Unilateral Ureteral Obstruction, ce qui comme son nom l'indique consiste à ligaturer l'uretère d'un des reins sous anesthésie générale. C'est un modèle de fibrose assez éloigné des pathologies humaines, car chez l'homme un calcul qui boucherait entièrement l'uretère serait immédiatement traité.

Après l'obstruction unilatérale, l'urine ne peut plus s'écouler et va s'accumuler dans le bassinet et les calices provoquant une augmentation de leur volume. La pression dans les voies excrétrices induit d'intense phénomènes de mort cellulaire dans les tubules, déclenchant ainsi une inflammation interstitielle très importante et des phénomène de réparation fibreuse majeur. Par contre, le poids des souris et leur créatinine dans le sang ne changent pas, ce qui montre que le second rein arrive à suppléer celui dont on a ligaturé l'uretère. C'est un modèle connu pour engendrer des dommages importants, assez rapidement après la ligature.

Cette étude a été menée en collaboration avec l'équipe du Prof. Jürgen Floege de la division de néphrologie de l'université de Aachen (Allemagne)[161;162]. Des souris ont été sacrifiées 5, 10, 21 et 28 jours après l'obstruction de leur uretère et leurs reins ont été prélevés. Une fois fixés, les reins ont été paraffinés, coupés en tranche de 8 μm et déposés sur lamelles. Pour chaque jour de sacrifice, nous avons obtenu les lames de 2 animaux pour les observer en microscopie multiphoton. Comme il s'agit de coupes minces, nous avons détecté le signal SHG en transmission et le signal 2PEF en épidétection. Le laser a été réglé pour délivrer une puissance de 15 mW sur l'échantillon à 860 nm.

Nous avons utilisé une procédure similaire à celle décrite au paragraphe 3.2.1 pour la quantification de la fibrose rénale sur des coupes épaisses de 200 μm. Après avoir réglé l'horizontalité de la coupe, nous avons imagé une grande partie de la surface de l'échantillon et

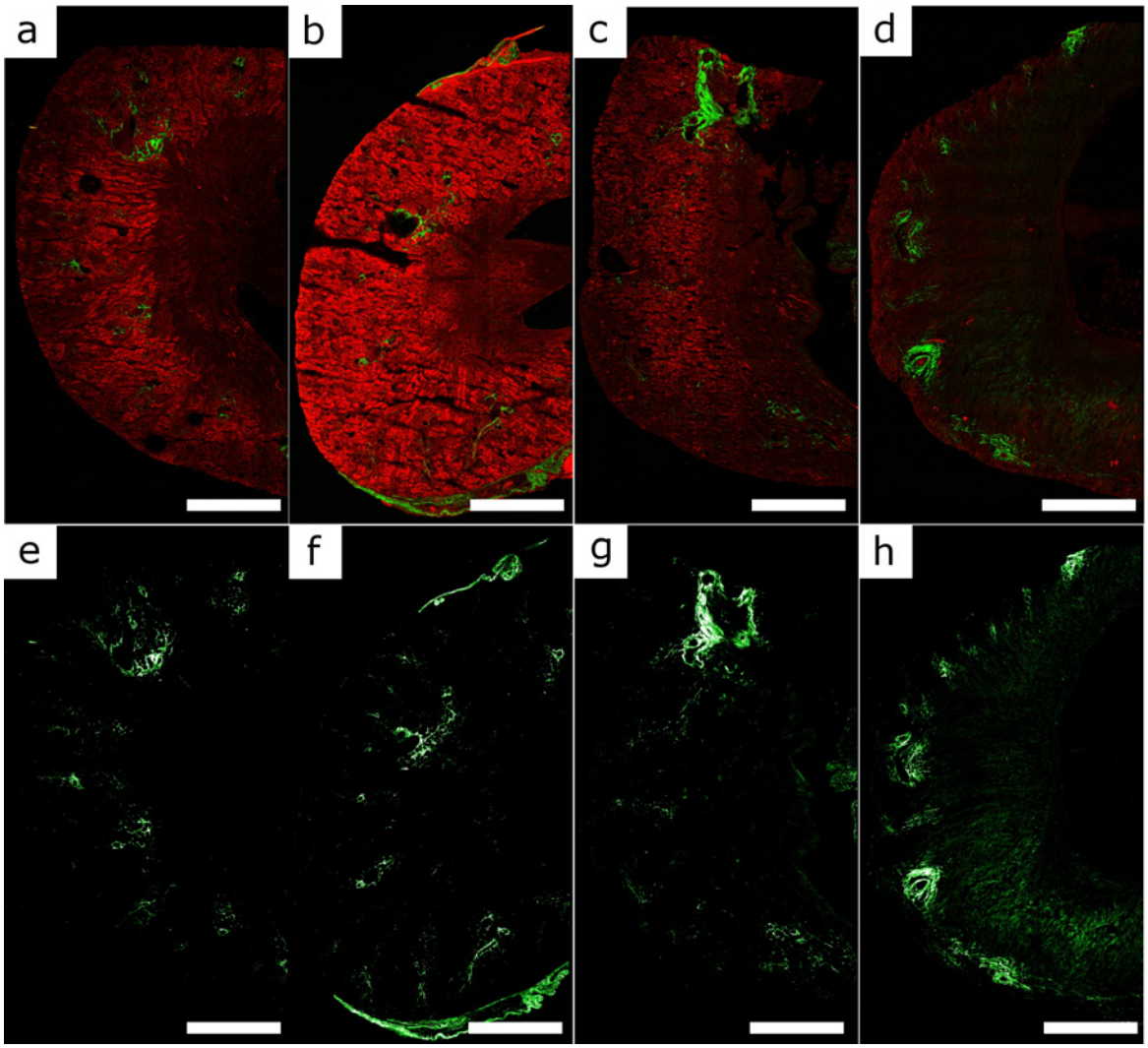


FIGURE 4.8 – Images multiphoton de reins de souris avec une fibrose induite par UUO : (a-d) superposition du signal SHG(vert) et du signal 2PEF(rouge) ; (e-h) Intensité du signal SHG uniquement ; (a ;e) après 5 jours ; (b ;f) 10 jours ; (c ;g) 21 jours ; (d ;h) 28 jours ; barre d'échelle 500 μm

acquis une pile de 8 images en z, mais espacées ici de 2 μm seulement puisque les coupes ne font que 8 μm d'épaisseur. Comme la préparation des échantillons, l'épaisseur de la coupe, la puissance du laser et les modalités de détection sont différentes, il ne sera pas possible de comparer les scores de fibrose calculées ici avec les scores de fibroses présentées précédemment. Toutefois, il est toujours possible de comparer ces différentes coupes entre elles et d'évaluer la progression de la fibrose dans le temps.

Cinq jours après le début du traitement [fig.4.8(a ;e)], on voit déjà apparaître une fibrose qui se localise comme dans le modèle AngII autour des artères, dans la médulla et de façon radiale dans le cortex. La fibrose se développe ensuite rapidement et, comme on peut le voir sur la figure 4.8(d ;h), la fibrose induite par UUO est très importante après 28 jours de traitement. Le cortex et la médulla ont été repoussés vers la surface du rein et tout l'espace restant est fibrosé. Si l'on mesure le score D dans le cortex, il progresse lui aussi fortement entre le $5^{\text{ème}}$ et le $28^{\text{ème}}$ jour, comme on peut le voir sur le graphique 4.10, confirmant notre impression visuelle.

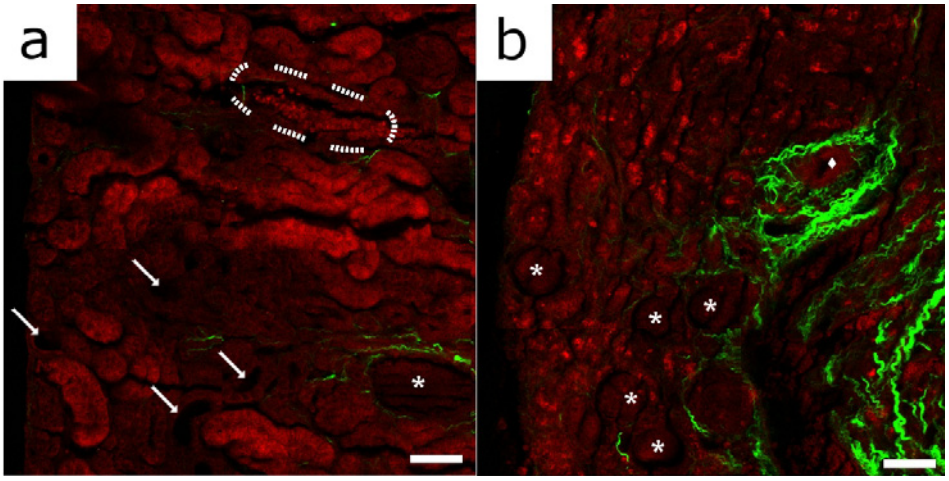


FIGURE 4.9 – Image multiphoton de rein de souris avec une fibrose induite par UUO. Superposition du signal SHG(vert) et du signal 2PEF(rouge) ; (a) après 5 jours ; (b) 28 jours ; * = Glomérules ; Flèches = Tubules dilatés ; Losange = Artère ; zone pointillée = infiltration de cellules inflammatoires ; barre d'échelle 50 μm

Le grossissement de la figure 4.9(a) permet de bien apprécier les lésions rénales qui apparaissent 5 jours après l'obstruction. Certains tubules sont clairement dilatés (flèches), des cellules inflammatoires apparaissent dans l'espace interstitiel (entourées avec une ligne poin-

tillée) et la capsule de Bowman du glomérule (marqué d'une *) est très fibrosée. Vingt-huit jours après l'obstruction [fig.4.9(b)], il est très difficile de distinguer les structures rénales qui semblent très inflammées. On remarque une grande concentration de glomérules (*) surement liés à la compression du cortex qui est visible à la faible distance entre la capsule rénale et les artères arquées (losange).

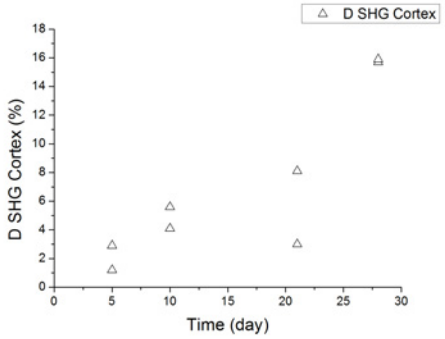


FIGURE 4.10 – Score de fibrose D mesuré dans le cortex. Chaque triangle représente une souris (2 souris par durée de l'étude avant sacrifice)

Ces expériences confirme que le modèle UUO est extrêmement agressif pour le rein qui est presque totalement détruit au bout d'un mois. On retiendra que la fibrose semble se développer initialement selon une distribution similaire à celle du modèle hypertensif. Ce modèle est toutefois assez éloigné des causes habituelles de néphropathie humaine. De plus, les études pharmacologiques permettent seulement d'étudier le ralentissement de la fibrose et de la nécrose des tissus et non pas leur arrêt ou la régression de la fibrose puisque, quel que soit le traitement, l'obstruction de l'uretère entrainera inévitablement la mort du rein.

4.3.2 Modèle de glomérulonéphrite rapidement progressive extracapillaire à croissant

Le modèle de glomérulonéphrite rapidement progressive (GNRP) extracapillaire à croissant est un modèle qui provoque une agression du rein en s'attaquant à la membrane basale des glomérules. Il induit une glomérulonéphrite avec une prolifération cellulaire en forme de croissant entourant le floculus glomérulaire accompagnée d'une réaction inflammatoire[163]. Avec le temps, cette atteinte évolue en sclérose des glomérules et en fibrose interstitielle.

Cette étude, portant sur 10 souris sauvages, a été menée en collaboration avec Cécile Fligny et Pierre-Louis Tharaux de l'hôpital Lariboisière (Cardiovascular Research Center Inserm Lariboisière INSERM U689, France). Le protocole utilisé pour provoquer la glomérulonéphrite est celui décrit par Lloyd *et coll.*[164]. Six après une première injection de sérum néphrotoxique, la GNRP est induite par l'injection intraveineuse de sérum dirigé contre la membrane basale glomérulaire (sérum anti-GBM), répétés les 2 jours suivants. Les souris ont été sacrifiée pour moitié 11 jours après la première injection de sérum anti-GBM et pour l'autre moitié au 17ème jour du traitement. Deux souris de chaque groupe sont mortes durant l'étude et chaque groupe ne comporte plus que 3 souris. La procédure de fixation, de coupe et d'acquisition a été identique à celle décrite dans le chapitre 3.2.1.

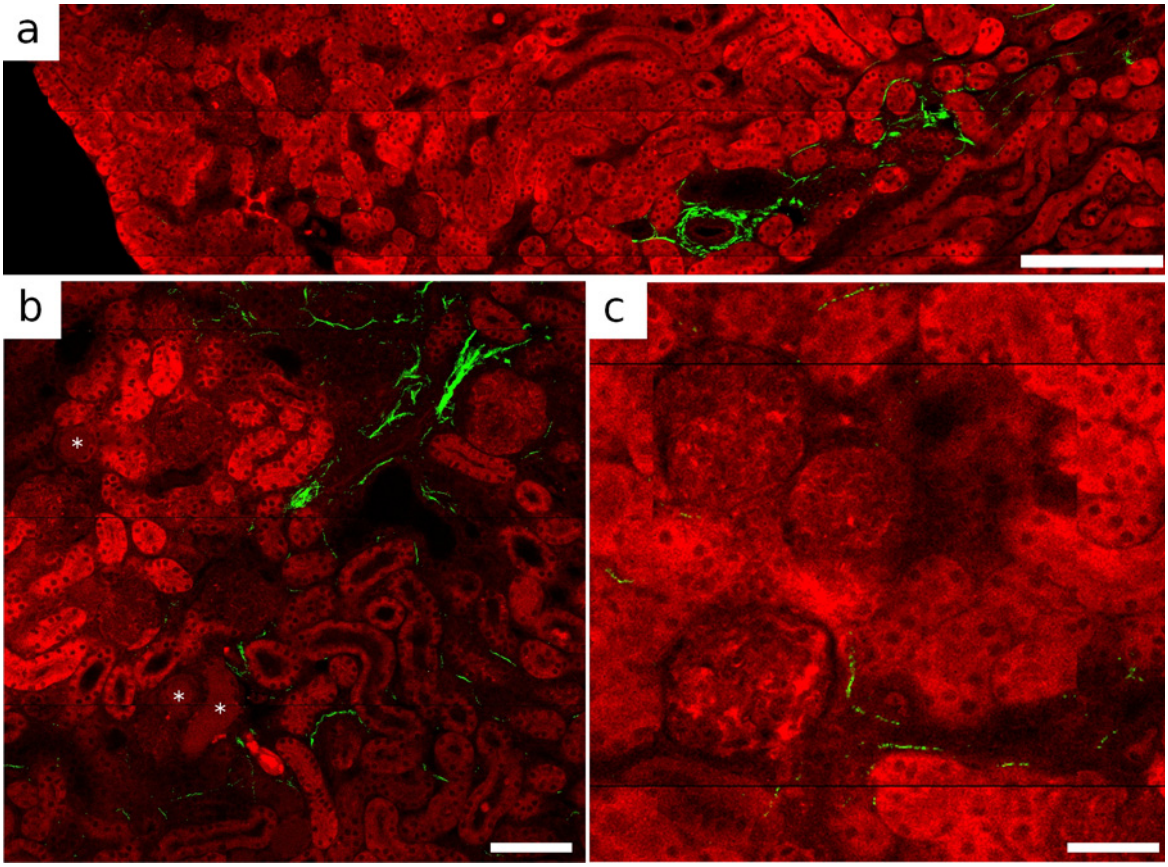


FIGURE 4.11 – Images multiphoton de reins de souris 11 jours après l'injection du sérum anti-GBM. Superposition SHG(vert) 2PEF(rouge) (a) zone allant du cortex à la médulla interne, barre d'échelle 200 μm ; (b) zone malade avec des cylindres marqués par une * et des tubules dilatés, barre d'échelle 100 μm ; (c) Glomérules, barre d'échelle 50 μm

Les figure 4.11(a) et 4.12 montrent que la distribution de la fibrose semble proche de celle observées dans les autres modèles. On retrouve des fibres de collagène autour des artères, dans la papille sous forme d'îlots dont la position est souvent en relation avec la présence d'une artère et enfin on observe des petites fibres dans le cortex souvent liées à la présence de vaisseaux. La figure 4.11(b) illustre les fortes atteintes tubulaires locales provoquées par ce modèle caractérisé par des tubules dilatés bordés de cellules atrophiées, des cylindres (accumulations de protéines dans les tubules qui n'affectent pas leur forme mais présentent une fluorescence uniforme) et une diminution de la fluorescence globale des cellules. Quant aux glomérules [fig.4.11(c)], leur aspect ne semble pas très différent de ceux des souris témoins du chapitre précédent. Certains glomérules ont une fluorescence plus importante qu'habituellement et présentent des zones de quelques micromètres dont la fluorescence est très élevée, peut être à cause de la présence de cellules inflammatoires, à moins que cette fluorescence ne soit en rapport avec la prolifération épithéliale constitutive des croissants.

En ce qui concerne la quantification de la fibrose, le faible nombre d'animaux par groupe dû à la mortalité induite par le traitement nous empêche de conclure. Mais nous remarquons que les 3 souris du groupe sacrifié au $17^{\text{ème}}$ jour ont des score de fibrose D dans le cortex plus élevés que les trois souris du groupe sacrifié après 11 jours. Nous remarquons aussi que le modèle GNRP induit des fibroses plus importante que le modèle AngII, allant jusqu'à un score de $1,77\%$ dans le cortex pour une souris sacrifiée au $17^{\text{ème}}$ jour.

4.3.3 Etude préliminaire sur la possibilité de quantifier la fibrose *in vivo*

Comme la fibrose observée dans ce modèle est plus importante, ce dernier nous semblait idéal pour tester la capacité de la microscopie multiphoton pour le diagnostique *in vivo*. Nous avons donc mené une étude préliminaire qui a consisté à visualiser un rein fixé au PFA dont on a enlevé la capsule, mais sans le découper au préalable. En pratique, nous n'avons utilisé qu'un demi rein collé sur le flan au fond d'une boîte de Petri. L'autre moitié a été utilisé pour le protocole habituel de la quantification de la fibrose qui a donné un score D dans le cortex de $1,72\%$. Une zone de $730 \times 730 \times 200$ μm^3 a été imagée avec un échantillonnage de $0,8 \times 0,8 \times 2,0$ μm^3 en réalisant 3×3 piles de 100 images. Mis à part le nombre et l'intervalle des images selon l'axe z, les paramètres de l'acquisition sont les mêmes que ceux

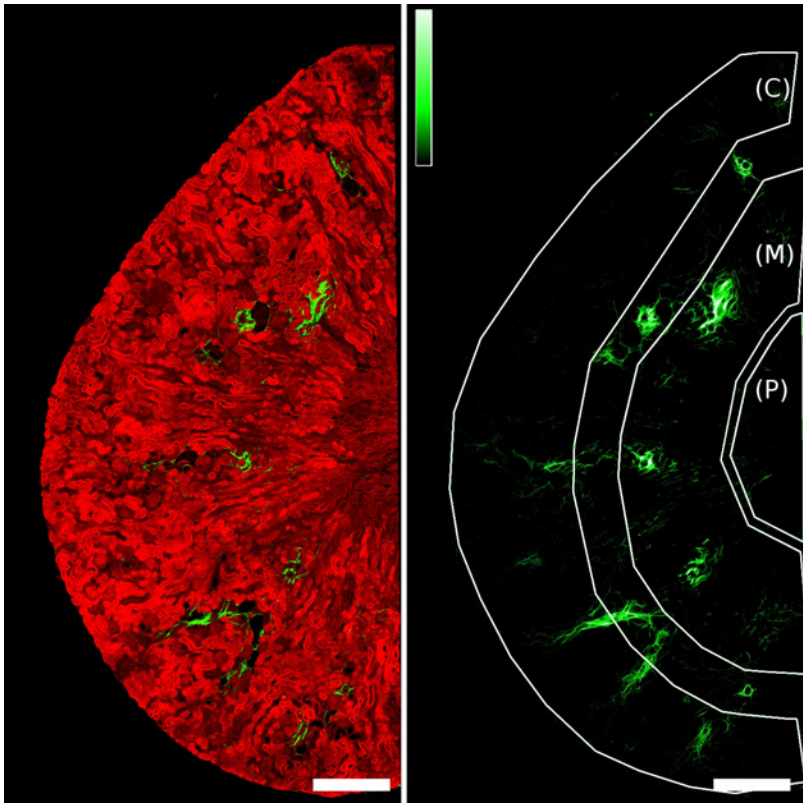


FIGURE 4.12 – Coupes coronales de rein de souris 17 jours après le traitement par le sérum Anti-GBM : (gauche) Superposition du signal SHG (Vert) et du signal 2PEF (Rouge) ; (droite) Image du score D, l'échelle de couleur représente le pourcentage de voxel supérieur au seuil intégré sur la pile d'image en Z ($z = 40\ \mu m$) (Noir = 0% - Blanc = 100%). Barre d'échelle : 500 μm. Les lignes blanches correspondent à la segmentation utilisée pour le score final : (C) Cortex - (M) Médulla - (P) Papille. Les scores SHG calculés pour cette souris dans les 3 régions sont les suivants : (C) $0,72\%$(M) $2,23\%$(P) $0,22\%$

utilisés pour la quantification de la fibrose décrite en 3.2.1. Au total, le volume a nécessité 30 min d'imagerie et représente 400 Mo de données.

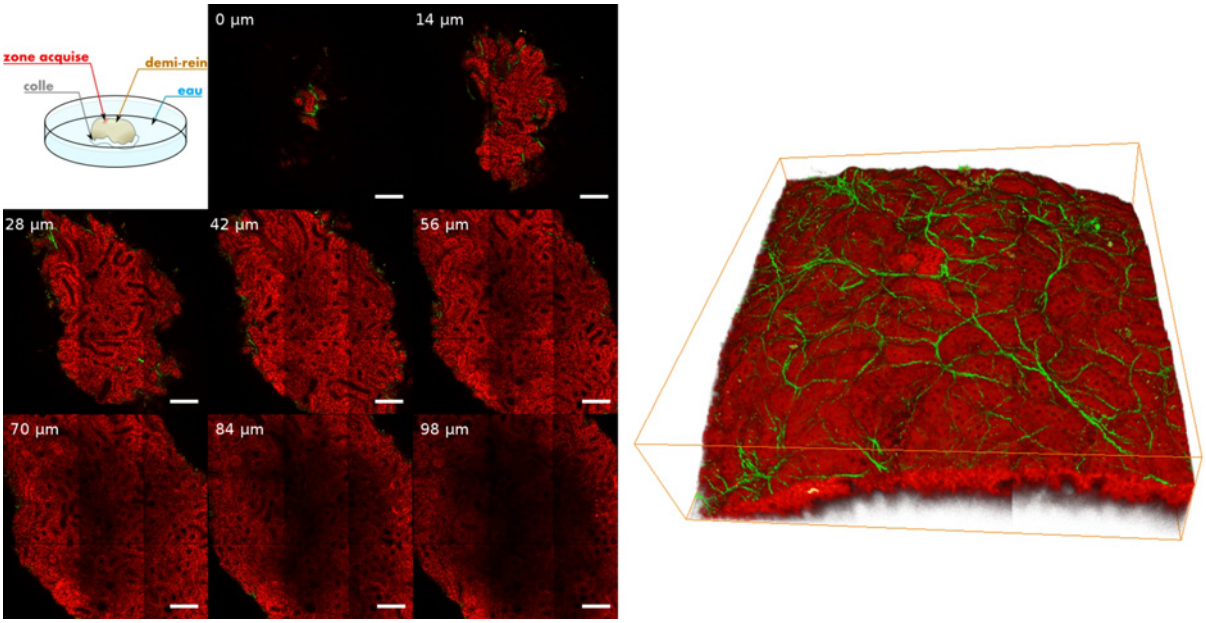


FIGURE 4.13 – Schéma du dispositif ; Images multiphoton d'un demi rein fixé au PFA de souris fibrosée à différentes profondeurs par pas de 14 μm, barre d'échelle 50 μm, SHG(vert) 2PEF(rouge). Reconstruction 3D de la zone, taille voxel $= 0,8 \times 0,8 \times 2,0\ \mu m^3$

La reconstruction 3D de la [fig.4.13] permet de bien apprécier la courbure du rein et l'atténuation du signal lorsque l'on s'enfonce dans le rein. Ces 2 phénomènes combinés entrainent qu'un grand nombre d'images acquises sont soit en dehors du rein, soit trop atténuées pour être utilisables. L'idéal serait de n'acquérir que la surface du rein pour réduire à la fois le temps d'acquisition et le volume de données, mais cela demanderait la mise au point d'algorithmes de déplacement de l'objectif et de l'échantillon plus complexes.

Les images montrent de nombreuses fibres de collagène dans les premiers dix microns à partir de la surface du rein alors que plus en profondeur elles sont plus rares. On distingue aussi très bien la dilatation de nombreux tubules, caractéristique de ce modèle de fibrose. Toutefois, ces images ne nous donnent pas accès à l'aspect des glomérules qui sont généralement à des profondeurs supérieures à 100 μm à partir de la surface. L'atténuation du signal est trop forte à ces profondeurs pour les visualiser (cf. annexe 5.2).

4.3.4 Conclusion

L'étude de ces deux modèles de fibrose nous a permis de réaliser que la localisation de la fibrose semblait toujours identique quelque soit la cause initiale de la néphropatie expérimentale. Cette constatation implique qu'il existe surement des voix de signalisation communes aux trois modèles qui sont activées après l'atteinte rénale initiale. Ces données corroborent les constatations cliniques qui montrent que la fibrose interstitielle est un marqueur péjoratif dans un grand nombre de néphropathie[165].

Nous avons aussi vu que le modèle GNRP induisait plus rapidement une fibrose plus importante que le modèle hypertensif. Le modèle UUO induit une fibrose encore plus importante, mais son intérêt est limité car il ne reproduit pas une maladie humaine et ne permet pas de faire un suivi à plus long terme. En effet, après 30 jours, le rein dont on a ligaturé l'uretère est complètement détruit. Nous avons donc décidé de continuer nos études sur le modèle GNRP et des expériences sur des groupes plus importants sont en cours de réalisation.

Enfin, dans une étude préliminaire, nous avons montré qu'il est possible de visualiser le rein depuis l'extérieur et d'avoir accès aux cent premiers microns depuis sa surface. Cette profondeur de pénétration est suffisante pour évaluer l'atteinte des tubules du cortex superficiel. Elle donne aussi accès à une fibrose très superficielle qui semble se développer juste en dessous de la capsule. Par contre, nous n'avons pas accès aux glomérules ou à la fibrose interstitielle dans des zones plus profondes du cortex. La profondeur d'imagerie pourrait être améliorée en utilisant des dispositifs d'optique adaptative pour corriger les aberrations induites par l'échantillon. Nous pourrions aussi utiliser une excitation laser décalée vers des longueurs d'ondes plus grandes et à de plus forte puissance. Toutefois, chez la souris, le cortex a une épaisseur de 1 mm, ce qui semble une profondeur de pénétration difficilement accessible même avec ces technologies, car le rein est un organe très opaque. Ce constat est encore plus vrai chez l'homme dont le cortex a une épaisseur d'environ 1 cm.

La question est alors de savoir ce que ces informations sur une couche très superficielle du rein nous apportent pour évaluer l'état global du rein. Tout d'abord, la présence d'une fibrose sous-capsulaire doit être confirmée sur un plus grand nombre de souris. Ensuite, le lien entre la fibrose sous-capsulaire et la fibrose interstitielle n'est pas évident a priori et éclaircir ce point nécessite de nombreuses autres études. Cependant, si la relation entre l'état superficiel du rein et son état global était confirmée, nous pourrions envisager d'utiliser la microscopie

multiphoton par endoscopie pour réaliser des biopsies virtuelles.

4.4 Biopsies de rein humain

4.4.1 Principe

Dans le chapitre 3, nous avons tenté d'évaluer l'intérêt de la quantification de la fibrose à l'aide de la microscopie multiphoton par rapport à l'observation de coupes colorées au trichrome de Masson. Nous étions arrivés à la conclusion que même si notre méthode semblait plus sensible, il était délicat de comparer une méthode semi-quantitative reposant sur l'oeil de l'anatomopathologiste avec une méthode quantitative basée sur un traitement automatisé des images acquises.

C'est pourquoi nous avons pris contact avec l'équipe d'analyse d'image quantitative de l'Institut Pasteur (Analyse d'Images Quantitative - URA CNRS 2582 - France) qui a mis au point un algorithme de quantification automatique à partir d'images de coupes colorées au trichrome de Masson[40]. L'idée à la base de l'algorithme est de transposer les critères visuels retenus par les anatomopathologistes pour évaluer la fibrose interstitielle, affin d'améliorer la reproductibilité de l'évaluation de la fibrose interstitielle et de simplifier les comparaison entre différents opérateurs. En effet, il est connu que l'indice de fibrose interstielle est très dépendant de l'opérateur qui effectue l'évaluation[148].

Plus précisement, l'algorithme développée par V. Meas-Yedid, E. Glory et J.-C. Olivo-Marin est basé sur l'algorithme de quantification de Brun qui consiste à réduire le nombre de couleurs et à les regrouper selon la moyenne la plus proche à l'aide d'une approche découpe-fusion dans un espace des couleurs bien choisi[118]. Pour commencer, il extrait tous les pixels *verts* qui correspondent à la coloration de la matrice extracellulaire dans le trichrome de Masson. A l'aide de critères de couleurs, de formes et de positions, l'algorithme supprime ensuite les pixels *verts* qui ne correspondent pas à la fibrose : la membrane basale, la capsule, la médulla, et les glomérules. Enfin, la surface retenue comme fibrosée est rapportée à la surface totale de la biopsie pour calculer l'index de fibrose interstitielle.

Nous avons choisi d'étudier des biopsies de rein transplantés en collaboration avec Eric Thervet et Aude Servais (service de néphrologie - Hopital Necker - Paris). Cette collaboration nous a donné accès à la banque de biopsies des malades transplantés du rein à l'hopital Necker

et aux données cliniques les concernant. En effet, après une transplantation rénale, on observe souvent une dysfonction chronique du rein greffé avec l'apparition d'une fibrose.

Par ailleurs, cette étude nous permet aussi d'évaluer la prédictivité de notre méthodologie quant à l'évolution de la pathologie rénale. Ce type d'étude est difficile à mener sur modèle murin puisque nous sacrifions les souris après quelques semaines de traitement. Dans le cas des biopsies rénales humaines, il est possible de faire un suivi longitudinal grâce aux biopsies réalisées à différentes dates et aux données cliniques. L'intérêt de cette étude est donc double : comparer notre méthode à la méthode de quantification automatique à partir des coupes colorées au trichrome de Masson et évaluer la qualité pronostique de la quantification de la fibrose par microscopie multiphoton.

Dans la suite, nous noterons IF_{SHG} le score de fibrose interstitielle mesuré par la méthode utilisant la SHG du collagène, IF_{AMT} le score obtenu par la méthode d'analyse automatisée de la fibrose à partir des images des coupes colorées au trichrome de Masson et $IF_{AnaPath}$ le score observé par les anatomopathologistes.

4.4.2 Methodes

La procédure habituelle, dans le cadre d'une transplantation rénale, est de réaliser une première biopsie au moment de la greffe (M0), puis trois mois (M3) et un an (M12) plus tard. Nous avons inclu 5 patients dans notre étude qui ont été choisi rétrospectivement par rapport à l'évolution de la fibrose de leur rein, évaluée par un anatomopathologiste. Les critères retenus étaient que les patients ne devaient pas avoir de fibrose à M0 ($IF_{AnaPath} < 10\%$) puis qu'à M12 :

- Deux patients ($N°2$ et $N°5$) aient toujours un score de fibrose faible ($IF_{AnaPath} < 20\%$)
- Un patient ($N°1$) ait un score de fibrose modéré ($20\% < IF_{AnaPath} < 40\%$)
- Deux patients ($N°3$ et $N°4$) aient un score de fibrose élevé ($IF_{AnaPath} > 40\%$)

Nos collaborateurs de l'hôpital Necker ont alors transmis les 3 lames (M0, M3 et M12) correspondant à chacun des patients pour qu'elles soient évaluées en aveugle par les 2 méthodes. Comme la coloration au trichrome de Masson est trop absorbante aux longueurs d'onde de notre laser, nous avons travaillé sur des lames blanches (sans marquage) paraffinées. Quant à l'équipe de l'Institut Pasteur, elle a analysé directement les coupes colorées au trichrome de Masson qui avaient été utilisée par les anatomopathologistes. Les lames blanches et les

lames colorées au trichromes de Masson sont des lames sériées de la même biopsie espacées de quelques micromètres. La numérotation des patients provient de l'ordre dans lequel les lames blanches ont été visualisées en microscopie multiphoton.

Comme les biopsies rénales ont une épaisseur d'environ 2 μm, nous avons dû adapter notre méthodologie conçue pour des coupes épaisses de plusieurs centaines de microns. Nous avons ainsi détecté la 2PEF en épidétection et la SHG en transmission pour optimiser la collection du signal. La puissance du laser est réglée à $6mW$ sur l'échantillon et sa longueur d'onde à 860 nm.

Les défauts d'horizontalité résiduels nécessitent d'acquérir une pile d'image avec un pas resséré en Z (1 μm) pour être certain d'imager la position centrale de la coupe sur toute la longueur de la biopsie. Au final, nous avons acquis environ 30×4 piles de 8 images espacées d'un micron, ce qui représente une superficie d'environ 7×1 mm^2. La taille et l'échantillonnage d'une image individuelle sont les mêmes que précédemment, à savoir respectivement 270×270 μm^2 et $0,8 \times 0,8$ μm^2.

Il est ensuite nécessaire d'extraire de la pile d'image une seule image qui correspondrait à l'image vue si notre microscope n'avait pas une capacité de sectionnement optique. Pour cela, nous avons analysé les profils d'intensité en Z de zones de 20×20 pixels sur les images de fluorescence. Ces profils ont une forme gaussienne d'une largeur totale à mi-hauteur moyenne de $2,7$ μm. A l'aide de la fonction `nlinfit` de Matlab, nous avons obtenu la position et l'amplitude de la gaussienne de largeur fixée à $2,7$ μm approchant le mieux chacun des profils. La position du maximum de la gaussienne nous a permis de mesurer l'aire de la gaussienne comprise dans les 8 μm que nous acquérons, et nous sert à calculer un facteur correctif lié au décalage éventuel de cette gaussienne. Au final, nous avons sommé les 8 images de la pile en Z et nous avons multiplié chaque pixel des canaux 2PEF et SHG par le facteur correctif calculé précédemment. Mis à part cela, les algorithmes de correction des images et de quantification de la SHG sont les mêmes que ceux décrits au paragraphe 3.2.1.

Enfin, nous n'avons pas pu utiliser l'algorithme de segmentation présenté précédemment puisqu'il ne fonctionne que pour des coupes coronales complètes. Nous avons donc sélectionné à la main la zone corticale sur laquelle calculer le score IF_{SHG} (l'équivalent du score D), en éliminant la capsule rénale et les artères.

4.4.3 Résultats et Discussion

Comparaison qualitative des 2 méthodes

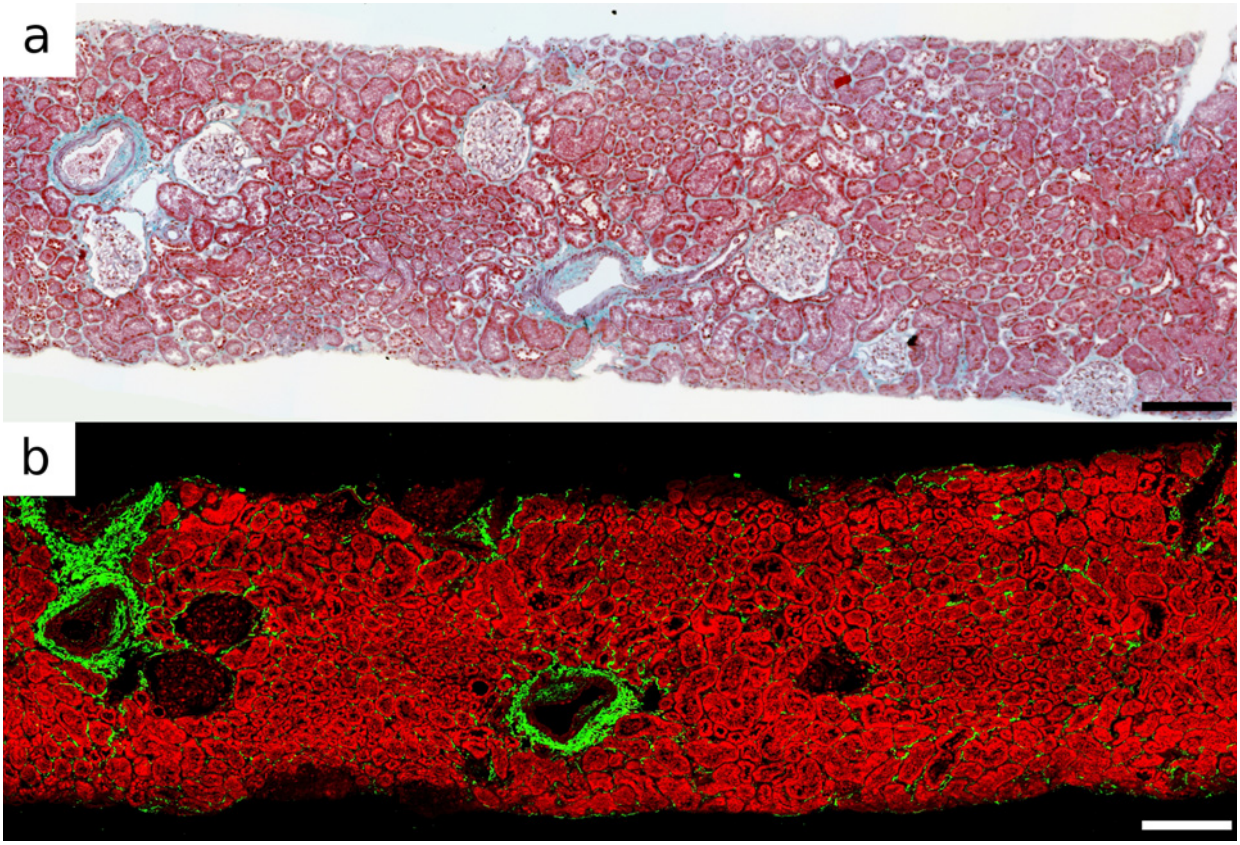


FIGURE 4.14 – Biopsie du patient $N°5$ à M0 : (a) Trichrome de Masson (b) Micorscopie Multiphoton ; barre d'échelle 200 μm

La figure 4.14 montre les mosaïques d'images de la biopsie de rein greffé au patient 5 à M0 acquises avec les 2 techniques. On remarque que les coupes ne sont pas tout à fait les mêmes dans les 2 cas, mais la structure est très proche. La figure 4.14(b) permet aussi de réaliser la différence entre ce type d'échantillon et les échantillons de rein de souris. Alors que ce rein est considéré comme sain, de nombreuses fibres de collagène sont présentes dans l'interstitium et la distance intertubulaire est plus grande que chez les souris. Cela s'explique en partie par l'âge du donneur puisqu'il est connu que la fibrose se développe progressivement avec l'âge, mais pourrait aussi être expliquée par des différences entre les espèces. Les tubules et les glomérules ont eux aussi des diamètres un peu supérieurs à ceux de la souris. Il est tout

de même intéressant de noter que nous aurions évalué cette coupe en microscopie multiphoton comme dans un état de fibrose très avancé dans les études précédentes chez la souris.

Afin d'analyser qualitativement la sensibilité des scores IF_{AMT} et IF_{SHG}, nous nous sommes intéressés à des zones restreintes caratéristiques. Les figures 4.15 et 4.16 s'intéressent à 2 cas : une zone peu fibrosée de la biopsie M0 du patient $N°1$ et une zone très fibrosée de la biopsie M12 du patient $N°5$.

Dans le cas de la biopsie M0 du patient $N°1$, on voit que les images 4.15(c) et 4.15(d) se ressemblent beaucoup. Les pixels détectés comme *vert* sont donc à peu près les mêmes que ceux avec un signal de SHG significatif. Toutefois, la dernière étape de l'algorithme sur le trichrome de Masson supprime de nombreuses petites fibres et ajoute des pixels dans certaines zones pour former des blocs homogènes. Cette étape est nécessaire car, comme on peut le voir sur la figure 4.16((c) en haut à gauche de l'image), l'algorithme retient parfois des pixels des glomérules ou de l'intérieur des tubules qu'il faut éliminer dans la seconde étape du traitement. L'algorithme utilisé en microscopie multiphoton ne fait lui que soustraire le bruit de fond lié à la fluorescence, puis seuille le signal SHG. Ainsi, il conserve les petites fibres et les zones d'accumulation focale de collagène sont parsemées de pixels non sélectionnés.

L'étude de la biopsie M12 du patient $N°5$ est elle aussi très informative. L'image en trichrome de Masson [fig.4.16(a)] présente une zone très fibrosée (en bas à droite), avec de nombreuses cellules individualisées à la place des tubules. Le traitement automatisé du trichrome retient de nombreux pixels de cette zone comme *vert*. Au final, l'algorithme détecte une grande partie de la surface de la zone comme étant fibrosée, ce qui correspond bien à l'impression visuelle. Par contre, l'amas cellulaire, très vert au trichrome de Masson, ne génère pas énormément de signal SHG et *in fine* une partie beaucoup plus faible de cette zone sera retenue comme fibrosée par notre algorithme. Cette différence entre le marquage vert du trichrome et la détection de fibre par microscopie SHG est étonnante. On peut toutefois avancer plusieurs hypothèses pour l'expliquer : la matrice extracellulaire dans des zones présentant de telles lésions pourrait être composée d'autres composantes que des collagènes fibrillaires, ou bien les fibrilles de collagènes pourraient être mal organisées réduisant du même coup l'efficacité de génération de second harmonique. Des études supplémentaires, tels que des marquages immunohistochimiques du collagène I, seront nécessaires pour préciser cette interprétation.

La sensibilité des scores IF_{AMT} et IF_{SHG} n'est donc pas identique. Il semblerait que notre méthode, basée sur la SHG du collagène, soit plus sensible aux petites fibres que le

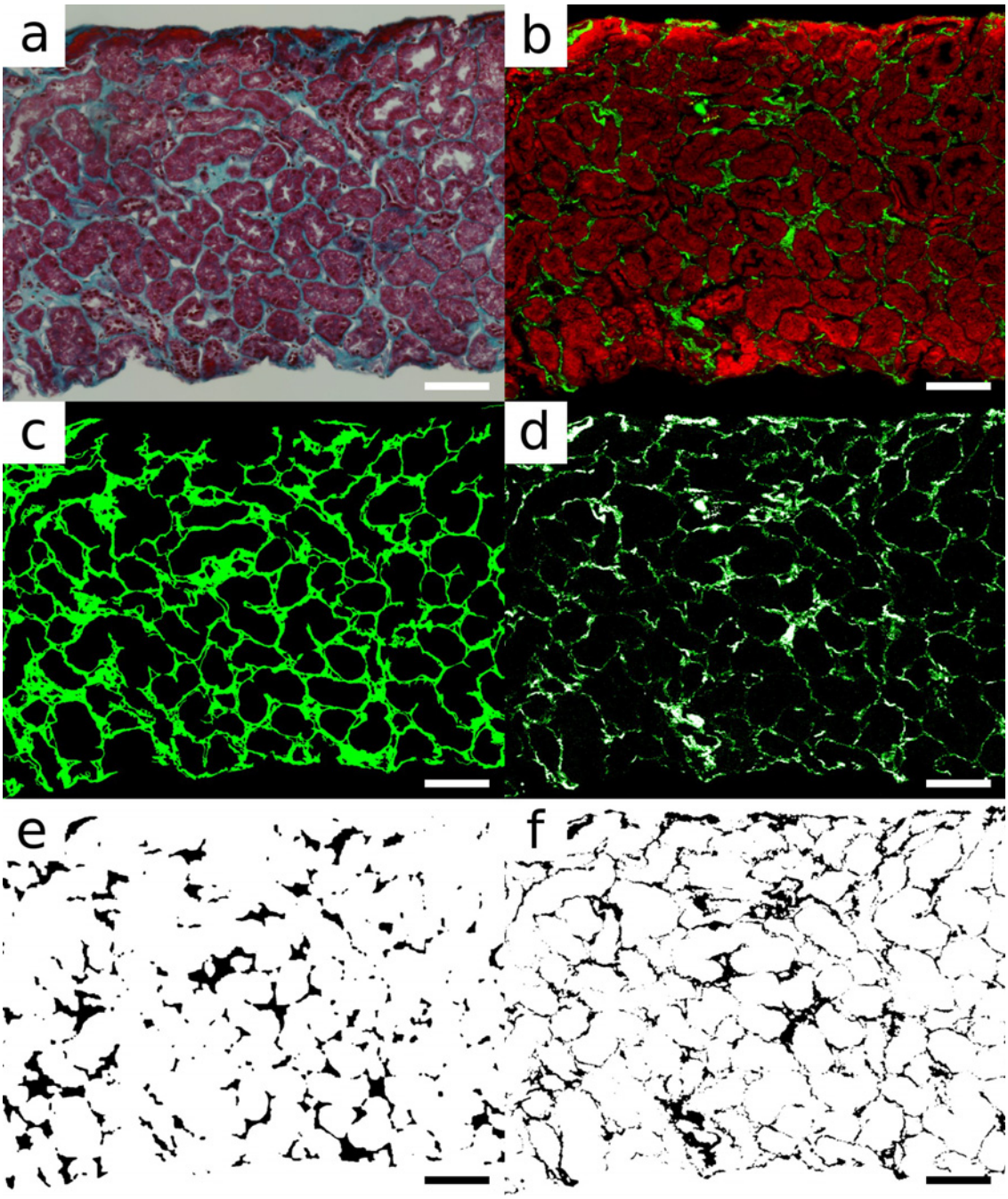


FIGURE 4.15 – Traitement automatisé de la fibrose, biopsie M0 du patient $N°1$: (a) Trichrome de Masson ; (b) Microcopie multiphoton 2PEF(Rouge)/SHG(Vert) ; (c) Détection et regroupement des pixels *verts* du trichrome de Masson ; (d) image SHG seule (échelle de couleur Noir-Vert-Blanc) ; (e) Masque final à partir du Trichrome de Masson (Noir = fibrose) ; (f) Masque final à partir de la SHG (Noir = fibrose) ; barre d'échelle 100 μm

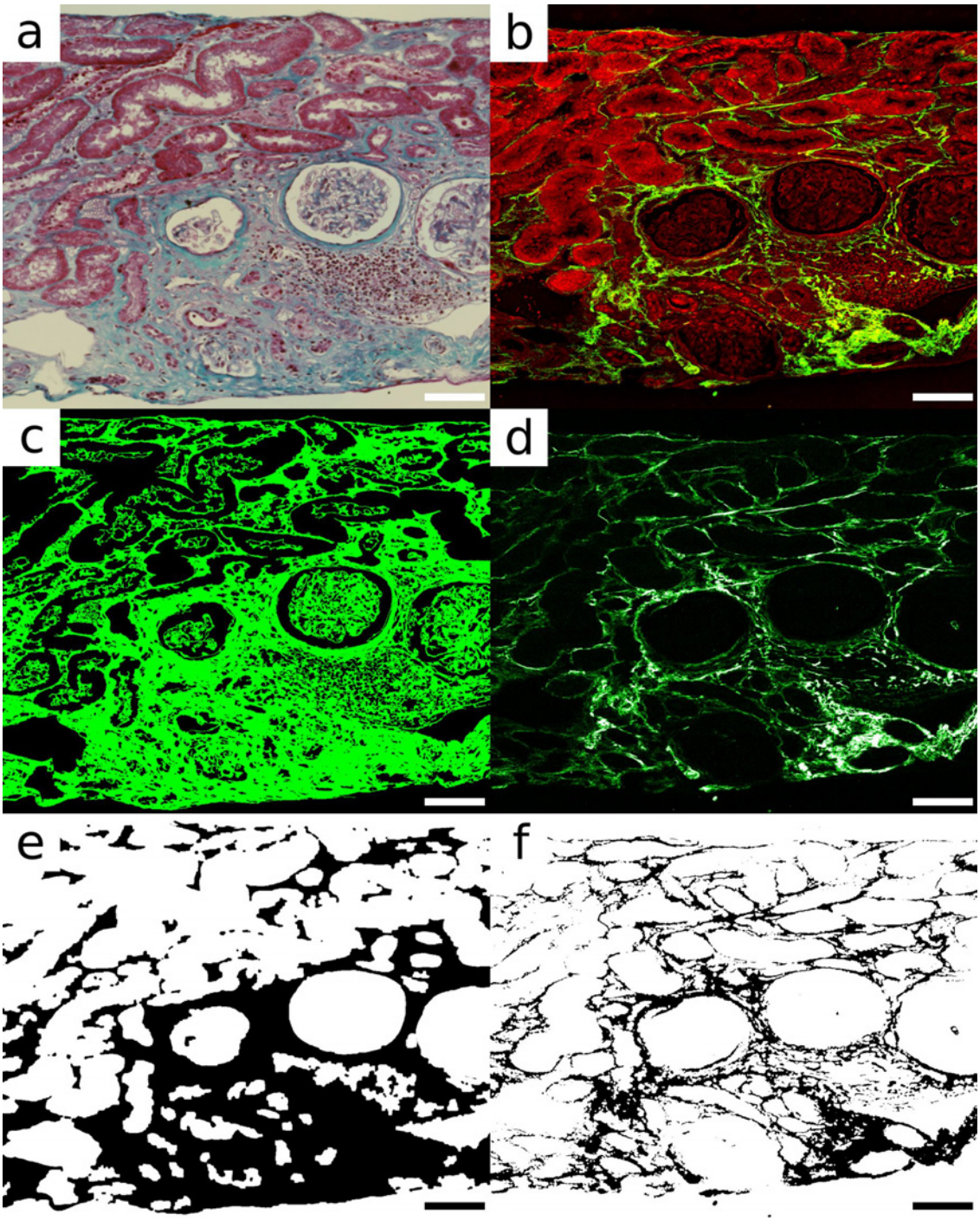


FIGURE 4.16 – Traitement automatisé de la fibrose, biopsie M12 du patient $N°5$: (a) Trichrome de Masson ; (b) Microcopie multiphoton 2PEF(Rouge)/SHG(Vert) ; (c) Détection et regroupement des pixels *verts* du trichrome de Masson ; (d) image SHG seule (échelle de couleur Noir-Vert-Blanc) ; (e) Masque final à partir du Trichrome de Masson (Noir = fibrose) ; (f) Masque final à partir de la SHG (Noir = fibrose) ; barre d'échelle 100 μm

score IF_{AMT}. Par contre les amas de fibrose seront, eux, mieux détectés par cette dernière technique.

Corrélation entre les différents scores

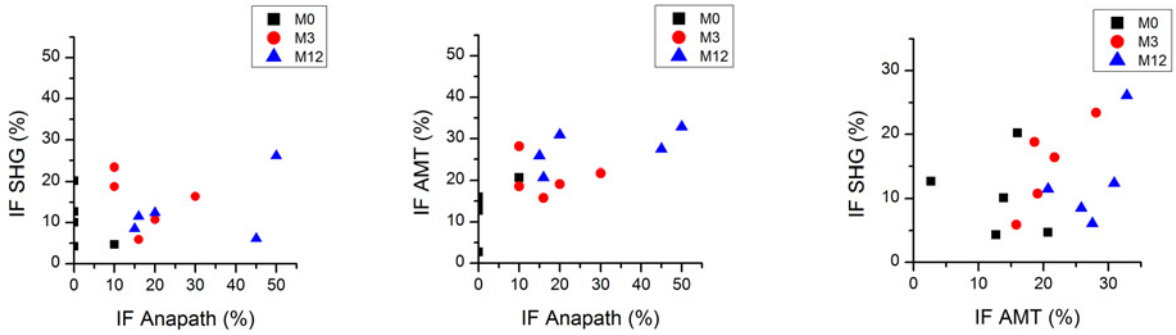


FIGURE 4.17 – Corrélation entre les différents score de fibrose : (gauche) IF_{SHG} en fonction de $IF_{AnaPath}$ $\tau = 0,12$ $(p = 0,58)$; (centre) IF_{AMT} en fonction de $IF_{AnaPath}$ $\tau = 0,60$ $(p = 0,007)$; (droite) IF_{SHG} en fonction de IF_{AMT} $\tau = 0,25$ $(p = 0,21)$

La corrélation entre IF_{AMT} et $IF_{AnaPath}$ est bonne, comme en témoigne le graphique central de la figure 4.17 et un coefficient de Kendall $\tau = 0,60$ $(p < 0,01)$. Ceci était attendu puisque cette méthode a été conçue pour automatiser l'évaluation de la fibrose selon les critères des anatomopathologistes. En revanche, le score IF_{SHG} ne se corrèle pas avec le score $IF_{AnaPath}$ $(\tau = 0,12$ $p = 0,58)$, ni avec le score IF_{AMT} bien que dans ce cas, la valeur de $\tau = 0,25$ $(p = 0,21)$ soit un peu plus élevé. Plusieurs raisons pourraient expliquer cela. Tout d'abord les scores IF_{AMT} et $IF_{AnaPath}$ sont évalués sur les mêmes coupes et à l'aide du même marquage tandis que la coupe utilisée pour le score IF_{SHG} est distante de quelque micromètre ce qui diminue la corrélation possible avec les 2 autres méthodes. Ensuite, nous avons vu que la sensibilité des 2 méthodes n'est pas identique et les différences pourraient très bien venir de l'accumulation de matrice extracellulaire invisible en SHG, c'est-à-dire des composants autres que des collagènes fibrillaires.

Corrélation des scores avec le débit de filtration glomérulaire

Nous avons ensuite comparé les différents scores de fibroses aux débits de filtration glomérulaire mesurés à M3 et M12 de chacun des patients. Ceux-ci ont été calculés à partir

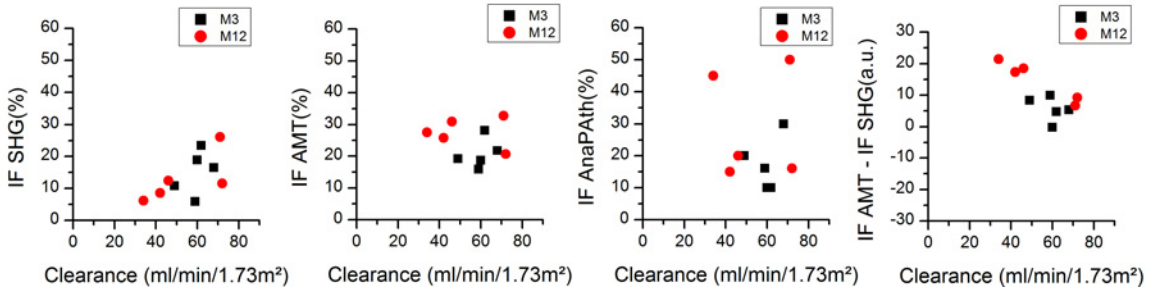


FIGURE 4.18 – Corrélation entre le débit de filtration glomérulaire et de gauche à droite : IF_{SHG} $\tau = 0,47$ $(p = 0,07)$; IF_{AMT} $\tau = -0,02$ $(p = 1)$; $IF_{AnaPath}$ $\tau = 0,05$ $(p = 0,93)$; $IF_{AMT} - IF_{SHG}$ $\tau = -0,41$ $(p = 0,1)$

des mesures de concentration de créatine dans le sang par la formule MDRD proposé par Levey[166]. Un débit de filtration glomérulaire est considéré comme normal s'il est supérieur à 90 $ml/min/1,73m^2$ et l'atteinte rénale est légère entre 60 et 90, modéré entre 30 et 60, sévère entre 15 et 30 et en dessous de 15 $ml/min/1,73m^2$ on parle de défaillance rénale.

On voit sur la figure 4.18 que les scores de fibrose interstitielle IF_{AMT} et $IF_{AnaPath}$ ne sont pas corrélés avec la filtration rénale. Par contre, le score IF_{SHG} semble être corrélé positivement avec un coefficient de Kendall $\tau = 0,47$ $(p = 0,07)$. Si cette corrélation était confirmée, cela signifierait que plus le score IF_{SHG} est faible, plus la défaillance rénale est grande. Ce résultat paradoxal pourrait s'expliquer par la sensibilité forte de notre score pour une fibrose diffuse inter-tubulaire, mais faible pour des lésions plus importantes.

Comme les sensibilités des scores IF_{SHG} et IF_{AMT} ne sont pas les mêmes en fonction du type de lésion liée à la fibrose, nous avons mesuré la corrélation de la filtration rénale avec la différence entre ces scores $IF_{AMT} - IF_{SHG}$. Le faible nombre d'échantillons ne nous permet pas de conclure définitivement, mais il semblerait que $IF_{AMT} - IF_{SHG}$ soit anticorrélé avec le débit de filtration glomérulaire. Ce résultat étonnant pourrait être compris comme suit : le score IF_{SHG} est très sensible à la fibrose diffuse, mais peu sensible aux zones d'accumulation focale de matrice extracellulaire, alors que c'est l'inverse pour le score IF_{AMT}. La soustraction de ces 2 scores créerait donc un indice qui lorsqu'il est faible, voire négatif indique plutôt une fibrose diffuse alors que lorsqu'il est élevé indique de nombreuses accumulations focales de fibrose.

4.4.4 Conclusion

A première vue, les conclusions de cette étude et de celle réalisée dans le chapitre 2, où nous comparions déjà le score IF_{SHG} et un score de fibrose réalisé par un anatomopathologiste, sont opposées. Toutefois, le type d'échantillons et la distribution de la fibrose sont aussi très différents. Dans le cas du modèle murin de fibrose rénale induite par l'AngII, les souris témoins n'étaient presque pas atteintes par la fibrose dans le cortex, et les souris traitées à l'AngII atteignaient au maximum 1% de fibrose dans le cortex. Le score réalisé par l'anatomopathologiste avait alors été adapté pour détecter ces fibroses très faibles. Au contraire, dans l'étude de biopsies humaines, le score de fibrose IF_{SHG} s'étend de 4% à 26%, soit un ordre de grandeur de plus. Alors que le score de l'anatomopathologiste et le score IF_{AMT} ont été conçus pour rendre compte de ce type de fibrose, nous n'avons pas optimisé notre technique dans ce cadre. De plus, il semblerait que certains types de lésions correspondant à une forte accumulation locale de matrice extracellulaire sont mal détectées par notre méthode, soit car elles ne sont pas constituées de collagène fibrillaire, soit parce que celui-ci est peu structuré. Ainsi, la méthode de quantification de la fibrose par IF_{SHG} est sensible à des lésions de fibrose légère, mais rend mal compte des états de fibrose plus avancés, d'où la différence avec les 2 autres scores. Cette différence de sensibilité avec le trichrome de Masson montre que les 2 techniques sont complémentaires : elles peuvent donc s'enrichir mutuellement, ce qui montre l'utilité de notre méthode même si celle développée par le laboratoire d'analyse d'image quantitative de l'Institut Pasteur est plus rapide, plus simple et moins onéreuse.

Quoiqu'il en soit, l'essentiel n'est pas tant de mimer le score de l'anatomopathologiste, mais de donner une information utile pour le néphrologue que ce soit sur l'état du rein ou son devenir. Même si IF_{SHG} évalue mal l'état de fibrose rénale selon les critères usuels, il semblerait être indicatif de l'état fonctionnel du rein puisqu'il se corrèle le mieux avec le débit de filtration glomérulaire. Encore une fois, cette corrélation est étonnante puisqu'elle implique que plus le score IF_{SHG} est élevé plus le débit de filtration glomérulaire est élevé. Cela est peut-être dû au type de fibrose auquel notre score est sensible, ce qui expliquerait aussi pourquoi l'indice $IF_{ATM} - IF_{SHG}$ est anticorrélé avec la filtration rénale. Ainsi, cet indice composite devrait plus être compris comme un indicateur du type de fibrose que de l'étendue de la fibrose. Si ce résultat se vérifiait dans une étude plus complète, il faudrait alors approfondir le lien entre ces 2 scores et mettre au point un indice tirant le maximum

d'informations disponibles dans ces 2 approches.

Cette étude préliminaire devra être complété avant d'envisager d'utiliser la microscopie SHG en routine sur des biopsies humaines. Tout d'abord, il sera utile d'optimiser l'algorithme de traitement pour mieux l'adapter à ce contexte. Il serait d'ailleurs très intéressant d'utiliser exactement la même lame pour les 2 techniques afin de pouvoir comparer pixel par pixel les 2 méthodes. Cela est possible en imageant par microscopie SHG une lame blanche qui serait ensuite colorée au trichrome de Masson et analysée par l'équipe de l'institut Pasteur et un anatomopathologiste. Enfin, nous n'avons pas pu tester la qualité pronostique de notre méthode dans cette étude préliminaire à cause du faible nombre de patients et des traitements médicamenteux différents qu'ils ont reçu. Dans une prochaine étude, il serait intéressant de sélectionner des patients dont la filtration rénale évolue différemment entre M3 et M12 mais qui ont reçu des traitements identiques ou proches. Nous pourrions alors corréler l'évolution de la fibrose entre M0 et M3 avec la filtration rénale à M12. Toutefois, il faudra se poser la question de la représentativité des biopsies. En effet, dans nos modèles expérimentaux de fibrose, nous avions remarqué l'hétérogénéité de la fibrose dans le cortex. Or, la biopsie ne permet d'accéder qu'à une surface du cortex très limitée.

Même si cette étude ne permet pas de conclure sur l'utilité de la quantification de la fibrose rénale par microscopie multiphoton chez l'homme, elle nous engage à poursuivre nos études pour mieux comprendre la sensibilité de notre méthode à la fibrose rénale.

4.5 Conclusion

4.5.1 Pertinence de la microscopie SHG pour des études biomédicales

Nous avons montré que la sensibilité de la microscopie SHG et sa reproductibilité en font un outil idéal pour les études pharmacologiques. En effet, cette technique permet de comparer des protocoles médicaux effectués à des dates ou des lieux différents. Dans le cas plus spécifique de la TG2, nous avons démontré que les souris déficientes en TG2 bénéficiaient d'une protection contre la fibrose et nous poursuivrons cette étude avec des inhibiteurs pharmacologiques de la TG2. Le but est de limiter la progression de la pathologie, mais aussi d'induire sa régression.

L'imagerie SHG du collagène simplifie aussi l'étude des interactions entre les cellules et

le collagène ou de molécules avec le collagène. En effet, la microscopie multiphoton permet d'observer un premier marqueur fluorescent grâce à la 2PEF et de visualiser le collagène sans marquage avec la SHG.

D'un point de vue général, nos études ont ainsi démontré la pertinence de la microscopie SHG pour la recherche biomédicale en complément des méthodes plus conventionnelles. Le cas particulier de son apport pour la problématique des fibroses rénales est abordé au paragraphe suivant.

4.5.2 Apports de la microscopie SHG sur la compréhension des mécanismes de la fibrose rénale

Nous avons montré au cours de ce travail qu'il existe une continuité entre les fibres de collagène interstitielles péritubulaires, périglomérulaires et périvasculaires, et ce, dans des modèles expérimentaux aux mécanismes variés. Nous remarquons aussi une présence récurrente d'artérioles fibrosées passant dans les zones de fibrose plus importante du cortex rénal. Enfin, la fibrose est constamment contigüe aux capillaires interstitiels. Les rapports précis de ces structures devront être étudiés plus en détail.

Nous avons aussi observé que la TG2 avait un rôle péjoratif dans la progression de la fibrose rénale : son activité et sa présence interstitielle augmentent avec l'hypertension, et surtout, les souris déficientes en TG2 sont protégées contre les effets de l'hypertension. Nous avons alors cherché les mécanismes qui liaient la TG2 et la fibrose.

Par le dosage des ICTP, nous avons démontré que bien que les souris TG2(-/-) présentent moins de fibrose interstitielle, ce sont elles dont les reins dégradent le plus de collagène I alors que lŠabsence dŠinfluence sur la synthèse de ce collagène, appréciée par l'expression de l'ARNm de proCol-α_1-I en RT-PCR, a été vérifiée. LŠabsence de TG2 a donc favorisé un bilan négatif de lŠaccumulation de collagène I par lŠintermédiaire dŠune meilleure solubilisation de celui-ci. Il reste cependant à déterminer si la TG2 limite lŠactivité des collagénases, ce qui nŠa pas été étudié à notre connaissance. En conclusion, l'un des mécanismes d'action de la TG2 sur la fibrose semble être de rendre les fibres de collagène plus résistantes à la dégradation.

Un co-marquage anti-NG2/anti-TG2 a révélé une bonne corrélation entre les 2 signaux de fluorescence. Il se pourrait alors que les principales cellules responsables de la production de TG2 interstitielle soient les pericytes. Cette hypothèse nous ramène à notre premier point,

puisqu'elle renforce l'idée que la fibrose interstitielle pourrait être reliée aux vaisseaux sanguins par les péricytes des artérioles qui synthétiseraient la TG2.

Au final, ces études nous conduisent à suggérer que le stimulus fibrogène est d'origine vasculaire, non seulement dans un modèle dŠhypertension, mais également dans des modèles de néphropathies inflammatoires. Cette hypothèse, logique dans le modèle de fibrose induite par l'AngII où l'agression est avant tout vasculaire, semble paradoxale dans les autres modèles de fibrose, qui présentent pourtant une distribution similaire des fibres de collagène, dès les stades précoces.

4.5.3 Applications à l'Homme

Nous présentons des résultats préliminaires sur deux applications potentielles de la technique chez l'homme. La première est le diagnostic de la fibrose par endoscopie multiphoton dont nous avons tenté d'évaluer la faisabilité sur un rein intact de souris. La profondeur de pénétration de la technique est relativement faible sur un dispositif de microscopie (100 μm, cf. annexe 5.2) et sera encore plus limitée sur un endoscope. Cela ne donnera accès qu'à une partie très superficielle du rein puisque chez l'homme le cortex a une épaisseur de l'ordre du centimètre. L'intérêt de la technique dépendra alors de la confirmation de la présence d'un fibrose sous-capsulaire et de son lien avec la fibrose dans l'ensemble du rein.

La deuxième application est la quantification de la fibrose sur des biopsies de rein humain. Nous avons comparé notre méthode à une analyse automatisée d'images de coupes colorées au trichrome de Masson. Notre technique semble peu efficace pour évaluer des états de fibrose avancés et certaines lésions apparaissent fortement au trichrome, sans apparaître en microscopie multiphoton. Il faudrait caractériser ces lésions pour mieux comprendre le processus de fibrose puisque les constituants ou l'organisation de ces lésions doivent être différent de ceux de la fibrose intertubulaire. Cette variation de sensibilité nous laisse envisager la mise au point d'une procédure plus sophistiquée et plus informative pour les médecins en combinant les différentes techniques.

Conclusion

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit s'est attaché à étudier la génération de second harmonique par le collagène, à l'appliquer à l'évaluation des fibroses rénales et à comparer cette méthode avec les autres méthodes existantes.

Nous avons tout d'abord proposé une modélisation pour étudier la relation entre l'organisation submicrométrique du collagène et le signal de génération de second harmonique. Nous avons vu que dans les conditions d'imagerie usuelles en microscopie multiphoton, la génération de second harmonique est surtout sensible à l'organisation spatiale des fibrilles selon l'axe optique. Le signal de second harmonique généré vers l'avant sonde des distances caractéristiques plus grandes qu'environ $\lambda_{ex}/2,5$ alors que le signal généré en contrapropagatif sonde des distances caractéristiques comprises entre $\lambda_{ex}/2,5$ et $\lambda_{ex}/5$. On peut donc théoriquement obtenir des informations sur la structure de l'échantillon, à partir de l'étude du diagramme de rayonnement du second harmonique, ou du rapport entre l'émission vers l'avant et vers l'arrière. Toutefois, de nombreuses fréquences spatiales de l'échantillon étant perdues dans ce processus, il est peu probable que l'on puisse remonter à l'organisation 3D submicrométrique du collagène. Il sera donc nécessaire de combiner des techniques plus résolutives avec l'imagerie SHG et de travailler sur des systèmes modèles pour mieux caractériser expérimentalement la relation entre l'organisation du collagène dans les tissus et la génération de second harmonique.

Nous avons également évalué les avantages et les inconvénients de la microscopie SHG par rapport aux techniques conventionnelles pour la visualisation du collagène. Nous avons démontré que la génération de second harmonique est une technique sensible spécifique des collagènes fibrillaires. Comme elle s'applique à tout type d'échantillons, elle est robuste et se combine sans manipulation supplémentaire à toutes les études utilisant des marqueurs fluorescents. Enfin, c'est la seule technique qui permet d'accéder à l'organisation 3D du collagène

dans les tissus. Toutefois, la microscopie multiphoton reste une méthode plus onéreuse et plus lente que les colorations histologiques visualisées en microscopie plein champ.

Nous avons ensuite mis au point une méthodologie de quantification des fibroses rénale par microscopie multiphoton. Cette méthode a été validée sur un modèle de fibrose rénale hypertensive chez la souris. Comme attendu, nous avons mis en évidence un augmentation du volume occupé par les fibres de collagène dans le cortex rénal de souris traitées à l'angiotensine II. La pertinence de notre score a été confirmée par la corrélation avec un score de fibrose interstitielle semi-quantitatif évalué par un médecin sur des coupes colorées au trichrome de Masson. Comme la microscopie SHG permet de différencier les collagènes fibrillaires des collagènes non fibrillaire, nous avons vérifié que la sclérose des glomérules correspond à l'accumulation de matrice extracellulaire non fibrillaire (collagène IV) et non pas de collagène fibrillaire comme mentionné dans certaines études. La reproductibilité de notre méthodologie facilite aussi la comparaison de mesures effectuées à des dates et sur des dispositifs différents, alors que de telles comparaisons sont problématiques dans le cas des évaluations dépendante d'un opérateur. Enfin, la combinaison de la génération de second harmonique et de la fluorescence excitée à deux photons nous a permis de révéler un remodelage eutrophique des artères arquées suite à la perfusion d'angiotensine II.

Une fois validée, cette méthode d'évaluation de la fibrose a été appliquée à différentes études biologiques. Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de la déficience en transglutaminase 2 sur la progression de la fibrose induite par l'angiotensine II. Tous les indices de gravité de la néphropathie que nous avons mesurés indique une protection relative des souris déficientes en TG2 par rapport aux souris sauvages.

Nous avons également mis en évidence qu'au moins à des stades précoces, la distribution de la fibrose semble identique dans les modèles murins de néphropathie différent alors que les causes de cette fibrose sont extrêmement différentes. Il est donc probable que quelles que soient les cellules agressées, une partie des voies de signalisation qui permettent la synthèse et l'assemblage des fibres de collagène soit identique. La confirmation de cette hypothèse est toutefois au delà du propos de ce travail et nécessitera de nombreuses autres études.

Enfin, nous avons aussi appliqué notre technique à l'évaluation de biopsies de rein transplanté. En collaboration avec l'équipe d'analyse d'image quantitative de l'institut Pasteur et le service de néphrologie de l'hôpital Necker, nous avons comparé notre score à celui donné par un anatomopathologiste et celui obtenu par l'analyse automatique des coupes colorées au

trichrome de Masson. Nous avons remarqué que le score mesuré en microscopie multiphoton semble ne pas être sensible aux mêmes lésions que les 2 autres scores. Si tel était le cas, nous pourrions combiner notre technique et l'analyse automatique de la coloration au trichrome de Masson pour proposer un indice plus sensible et plus informatif pour les médecins.

Ce manuscrit démontre ainsi tout le potentiel de la génération de second harmonique pour l'observation des collagènes fibrillaires. De nombreuses applications sont envisageables, allant de l'étude de l'assemblage des fibrilles de collagène à l'évaluation de la fibrose, que ce soit dans le rein ou dans d'autres organes. De plus, dans les études liées à l'interaction entre le collagène et des cellules ou des protéines, l'approche de la visualisation du collagène par le signal SHG et des autres entités par le signal 2PEF devrait être toujours envisagée tant elle simplifie les protocoles. Concernant la quantification de la fibrose rénale chez l'homme, l'utilité et l'intérêt de la méthode, que nous avons mise au point, reste en grande partie à démontrer. Quoiqu'il en soit, sa sensibilité et sa reproductibilité sur modèle murin, en font un très bon outil pour des études pharmacologiques. La prochaine étape sera d'ailleurs de démontrer l'effet bénéfique d'inhibiteurs de la TG2 sur la fibrose rénale.

Chapitre 5

Annexes

5.1 Analyse statistique des scores de fibrose interstitielle au trichrome de Masson

Nos collaborateurs ont évalué chaque souris sur une échelle allant de 0 à 4+. L'analyse statistique de ces données a d'abord été réalisée selon une approche bayésienne. Toutefois, comme ici le score est discret nous ne pouvions pas utiliser un modèle gaussien. Notre modèle consiste en un ensemble de quintuplets $\{p_0, p_1, p_2, p_3, p_4\}$ qui représentent la probabilité pour le rein d'une souris appartenant à un groupe donné d'avoir un score respectivement de $\{0, 1+, 2+, 3+, 4+\}$. Les calculs ont été effectués avec une précision sur les différentes probabilités de $0,04$.

Les observations pour le groupe témoin montrent que toutes les souris (N=6) ont un score de 0. Le quintuplé le plus probable est alors $\{1_{[0,45;1]}, 0_{[0;0,55]}, 0_{[0;0,55]}, 0_{[0;0,55]}, 0_{[0;0,55]}\}$ où les intervalles de confiance à 95% sont donnés entre crochets. Ces intervalles sont calculés en intégrant la densité de probabilité par rapport aux autres variables du quintuplé.

Pour le groupe traité pendant 28 jours nous observons 3, 3 et 2 souris qui ont des scores respectifs de 0, 1+ et 2+ ce qui donne des probabilités pour les différents scores de $\{0,375_{[0,08;0,8]}, 0,375_{[0,08;0,8]}, 0,25_{[0,04;0,72]}, 0_{[0;0,4]}, 0_{[0;0,4]}\}$. Enfin, pour le groupe traité pendant 49 jours nous obtenons 1, 4 et 2 souris classées respectivement aux scores 1+, 2+ et 3+. Nous obtenons les probabilités a postériori de $\{0_{[0;0,44]}, 0,14_{[0,04;0,64]}, 0,57_{[0,12;0,92]}, 0,29_{[0,04;0,76]}, 0_{[0;0,44]}\}$.

Au final, la probabilité pour que la moyenne du score des souris du groupe témoin soit inférieure à celle des groupes D28 et D49 est respectivement de 78% et 99%. Il faut noter

que le choix d'une loi a priori uniforme pour les quintuplets défavorise les cas ou l'une des probabilités est élevée. En effet, il n'y a qu'un seul quintuplet avec $p_0 = 1$ alors qu'il y en a énormément avec $p_0 = 0$.

On peut raisonner un peu différement, en calculant la probabilité pour une souris de chaque groupe d'avoir un classement supérieur à 0, c'est à dire regrouper les scores 1+ à 4+ en une seule catégorie. Dans ce cas, la probabilité pour une souris du groupe controle d'avoir un niveau normal, ie de 0, est de $1,00_{[0,65;1,00]}$. Pour les groupes AngII D28 et AngII D49, elle est respectivement de $0,37_{[0,12;0,69]}$ et $0,00_{[0,00;0,31]}$, et la différence entre le groupe contrôle et D28 est significative (p>99%). La différence apparaît ici car à la place de rechercher la probabilité pour chaque score, nous recherchons seulement si une souris est malade ou non, il a donc une intégration de l'information.

Au final, on voit que le risque pour une souris traitée à l'angiotensine de développer une fibrose (score supérieur ou égal à 1+) est significativement plus élevé, et que plus le traitement est long, plus les scores obtenus sont important.

5.2 Profondeur de pénétration dans le rein

Afin d'évaluer les capacités de la microscopie multiphoton pour effectuer des biopsies virtuelles du rein, il est nécéssaire de connaitre la profondeur de pénétration de notre technique dans le tissu rénal. Lorsque nous avons mesuré les spectres de fluorescence endogène sur des reins fraichement disséqués et non fixés (voir chapitre 3.1.3), nous avons aussi réalisé des études sur l'atténuation du signal en fonction de la profondeur d'imagerie.

Nous avons réalisé 2 piles d'images en z pour des longueurs d'onde d'excitation de 730 nm et 860 nm à une puissance sur l'échantillon d'environ 50 mW. Ces piles d'images sont constituées de 50 images d'une même zone de 270×270 μm^2 ($339 \times 339 pixels^2$) espacées de 4 μm, soit une profondeur totale de 200 μm. L'intensité moyenne de chaque image en fonction de la profondeur de pénétration est tracée sur le graphique 5.1.

On observe que le signal 2PEF augmente lors de la pénétration dans l'échantillon sur les premiers micromètres, puis le signal 2PEF est atténué exponentiellement. En approchant les 2 courbes par une fonction exponentielle décroissante, nous trouvons que les coefficients d'extinction sont respectivement de $0,0244 \pm 0,0004$ μm^{-1} et $0,0182 \pm 0,0004$ μm^{-1}, soit des longueurs caractéristiques (atténuation à $1/e$) de 41 ± 1 μm et 55 ± 1 μm à respectivement

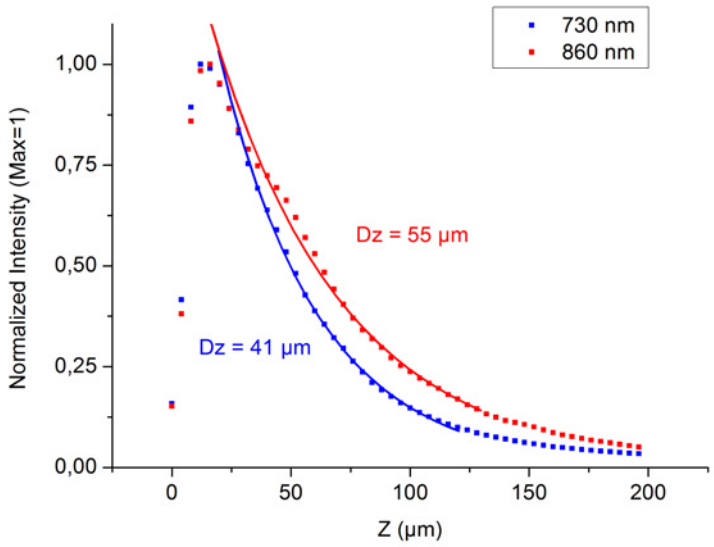


FIGURE 5.1 – Atténuation du signal de fluorescence sous excitation à deux photons en fonction de la profondeur d'imagerie pour deux longueurs d'onde d'excitation : 730 nm et 860 nm. Nous avons approché les 2 courbes par une fonction exponentielle décroissante pour obtenir la distance caractéristique d'atténuation à $1/e$, soit 41 μm à 730 nm et 55 μm à 860 nm

730 nm et 860 nm. Comme attendu, la profondeur de pénétration est plus grande à 860 nm.

En théorie, cette diminution du signal pourrait être compensée en augmentant progressivement l'intensité laser. Toutefois, à l'atténuation du signal s'ajoute la défocalisation du faisceau liée aux déformations du front d'onde introduite par la propagation dans l'échantillon, ce qui diminue la netteté des images. Au final, il est possible de reconnaître des tubules jusqu'à des profondeurs d'environ 100 μm.

Bibliographie

[1] PA Franken, AE Hill, CW Peters, and G. Weinreich. Generation of Optical Harmonics. *Physical Review Letters*, 7(4) :118–119, 1961.

[2] S. Roth and I. Freund. Second harmonic generation in collagen. *The Journal of Chemical Physics*, 70 :1637, 1979.

[3] J. Taipale and J. Keski-Oja. Growth factors in the extracellular matrix. *The FASEB Journal*, 11(1) :51–59, 1997.

[4] J. Condeelis and J.E. Segall. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nature Reviews Cancer*, 3(12) :921–930, 2003.

[5] G.A. Di Lullo, S.M. Sweeney, J. Korkko, L. Ala-Kokko, and J.D. San Antonio. Mapping the Ligand-binding Sites and Disease-associated Mutations on the Most Abundant Protein in the Human, Type I Collagen. *Journal of Biological Chemistry*, 277(6) :4223–4231, 2002.

[6] S. Ricard-Blum and F. Ruggiero. The collagen superfamily : from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathologie Biologie*, 53(7) :430–442, 2005.

[7] F. Grinnell. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *The Journal of Cell Biology*, 124(4) :401–404, 1994.

[8] J.J. Tomasek, G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier, R.A. Brown, et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3 :349–363, 2002.

[9] K. Beck and B. Brodsky. Supercoiled Protein Motifs : The Collagen Triple-Helix and the α-Helical Coiled Coil. *Journal of Structural Biology*, 122(1-2) :17–29, 1998.

[10] D.J.S. Hulmes. Building Collagen Molecules, Fibrils, and Suprafibrillar Structures. *Journal of Structural Biology*, 137(1-2) :2–10, 2002.

[11] E.G. Canty and K.E. Kadler. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *Journal of Cell Science*, 118(7) :1341–1353, 2005.

[12] A. Boutaud, D.B. Borza, O. Bondar, S. Gunwar, K.O. Netzer, N. Singh, Y. Ninomiya, Y. Sado, M.E. Noelken, and B.G. Hudson. Type IV Collagen of the Glomerular Basement Membrane EVIDENCE THAT THE CHAIN SPECIFICITY OF NETWORK ASSEMBLY IS ENCODED BY THE NONCOLLAGENOUS NC1 DOMAINS. *Journal of Biological Chemistry*, 275(39) :30716–30724, 2000.

[13] Y. Komai and T. Ushiki. The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 32(8) :2244–2258, 1991.

[14] T. USHIKI. Collagen Fibers, Reticular Fibers and Elastic Fibers. A Comprehensive Understanding from a Morphological Viewpoint. *Archives of Histology and Cytology*, 65(2) :109–126, 2002.

[15] Y. Ezura, S. Chakravarti, A. Oldberg, I. Chervoneva, and D.E. Birk. Differential Expression of Lumican and Fibromodulin Regulate Collagen Fibrillogenesis in Developing Mouse Tendons. *The Journal of Cell Biology*, 151(4) :779–788, 2000.

[16] DR Keene. Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils. *The Journal of Cell Biology*, 104(3) :611–621, 1987.

[17] C.W. Franzke, P. Bruckner, and L. Bruckner-Tuderman. Collagenous Transmembrane Proteins : Recent Insights into Biology and Pathology. *Journal of Biological Chemistry*, 280(6) :4005, 2005.

[18] P.C. Trackman. Diverse biological functions of extracellular collagen processing enzymes. *J. Cell. Biochem*, 96 :927–937, 2005.

[19] J. ROSSERT, G. BRIDEAU, C. TERRAZ, and ETV LEJARD. Régulation de l'expression des gènes codant pour le collagène de type I. *Flammarion Médecine Sciences - Actualités Néphrologiques*, 2003.

[20] A.K. Ghosh. Factors Involved in the Regulation of Type I Collagen Gene Expression : Implication in Fibrosis. *Experimental Biology and Medicine*, 227(5) :301–314, 2002.

[21] J. Rossert and B. de Crombrugghe. Type I collagen : structure, synthesis, and regulation. *Principles of Bone Biology*, pages 127–142, 1996.

[22] J. Massague and D. Wotton. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO JOURNAL*, 19(8) :1745–1754, 2000.

[23] AB Roberts, MB Sporn, RK Assoian, JM Smith, NS Roche, LM Wakefield, UI Heine, LA Liotta, V. Falanga, JH Kehrl, et al. Transforming growth factor type beta : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(12) :4167, 1986.

[24] M. Griffin, R. Casadio, and C.M. Bergamini. Transglutaminases : nature's biological glues. *Biochemical Journal*, 368(Pt 2) :377, 2002.

[25] PJ Birckbichler, GR Orr, MK Patterson, E. Conway, and HA Carter. Increase in Proliferative Markers after Inhibition of Transglutaminase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(8) :5005–5008, 1981.

[26] CR Knight, RC Rees, and M. Griffin. Apoptosis : a potential role for cytosolic transglutaminase and its importance in tumour progression. *Biochim Biophys Acta*, 1096(4) :312–8, 1991.

[27] D. Aeschlimann and V. Thomazy. Protein Crosslinking in Assembly and Remodelling of Extracellular Matrices : The Role of Transglutaminases. *Connective Tissue Research*, 41(1) :1–27, 2000.

[28] Z. Balklava, E. Verderio, R. Collighan, S. Gross, J. Adams, and M. Griffin. Analysis of Tissue Transglutaminase Function in the Migration of Swiss 3T3 Fibroblasts THE ACTIVE-STATE CONFORMATION OF THE ENZYME DOES NOT AFFECT CELL MOTILITY BUT IS IMPORTANT FOR ITS SECRETION. *Journal of Biological Chemistry*, 277(19) :16567–16575, 2002.

[29] TS Johnson, M. Griffin, GL Thomas, J. Skill, A. Cox, B. Yang, B. Nicholas, PJ Birckbichler, C. Muchaneta-Kubara, and A.M. El Nahas. The role of transglutaminase in the rat subtotal nephrectomy model of renal fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 99(12) :2950, 1997.

[30] T.S. JOHNSON, N.J. SKILL, A.M. EL NAHAS, S.D. OLDROYD, G.L. THOMAS, J.A. DOUTHWAITE, J.L. HAYLOR, and M. GRIFFIN. Transglutaminase Transcription and Antigen Translocation in Experimental Renal Scarring. *Journal of the American Society of Nephrology*, 10(10) :2146–2157, 1999.

[31] T.S. Johnson, A.F. El-Koraie, N.J. Skill, N.M. Baddour, A.M. El Nahas, M. Njloma, A.G. Adam, and M. Griffin. Tissue Transglutaminase and the Progression of Human Renal Scarring. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(8) :2052–2062, 2003.

[32] N.J. Skill, M. Griffin, A.M. El Nahas, T. Sanai, J.L. Haylor, M. Fisher, M.F. Jamie, N.N. Mould, and T.S. Johnson. Increases in Renal epsilon-(gamma-Glutamyl)-Lysine Cross-links Result from Compartment-Specific Changes in Tissue Transglutaminase in Early Experimental Diabetic Nephropathy : Pathologic Implications. *Lab Invest*, 81 :705–716, 2001.

[33] N.J. Skill, T.S. Johnson, I.G.C. Coutts, R.E. Saint, M. Fisher, L. Huang, A.M. El Nahas, R.J. Collighan, and M. Griffin. Inhibition of Transglutaminase Activity Reduces Extracellular Matrix Accumulation Induced by High Glucose Levels in Proximal Tubular Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(46) :47754, 2004.

[34] AM El Nahas, H. Abo-Zenah, NJ Skill, S. Bex, G. Wild, M. Griffin, and TS Johnson. Elevated ε-(γ-Glutamyl) lysine in Human Diabetic Nephropathy Results from Increased Expression and Cellular Release of Tissue Transglutaminase. *Nephron Clin Pract*, 97(3) :108–117, 2004.

[35] B.M. Stramer, R. Mori, and P. Martin. The Inflammation|[ndash]| Fibrosis Link ? A Jekyll and Hyde Role for Blood Cells during Wound Repair. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(5) :1009–1017, 2007.

[36] AM Pena, A. Fabre, D. Débarre, J. Marchal-Somme, B. Crestani, J.L. Martin, E. Beaurepaire, and M.C. Schanne-Klein. Three-dimensional investigation and scoring of ex-

tracellular matrix remodeling during lung fibrosis using multiphoton microscopy. *Microsc. Res. Tech*, 70 :162–170, 2007.

[37] J. Gauldie. Inflammatory Mechanisms Are a Minor Component of the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 165(9) :1205–1206, 2002.

[38] F. Böhmer. Zur pathologischen Anatomie der Meningitis cerebromedularis epidemia. *Ärztliches Intelligenzblatt*, 12 :539–50, 1865.

[39] P. Masson. Some histological methods. Trichrome stainings and their preliminary technique. *Bull Int. Assoc. Med.*, 12 :75, 1929.

[40] A. Servais, V. Meas-Yedid, M. Buchler, E. Morelon, J.-C. Olivo-Marin, Y. Lebranchu, C. Legendre, and E. Thervet. Quantification of interstitial fibrosis by image analysis on routine renal biopsy in patients receiving cyclosporine. *Transplantation*, 84 :1595Ũ1601, 2007.

[41] F. Sweat, H. Puchtler, and S. I. Rosenthal. Sirius Red F3BA as stain for connective tissue. *Archs Pathology*, 78 :69–72, 1964.

[42] V.S. Constantine and R.W. Mmowry. The selective staining of human dermal collagen II. The use of Picrosirius Red F3BA with polarization microscopy. *J. invest. Derm.*, 50 :419–23, 1968.

[43] L.C.U. Junqueira, G. Bignolas, and R.R. Brentani. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochemicat Journal*, 11 :447–455, 1979.

[44] D. Dayan, Y. Hiss, A. Hirshberg, JJ Bubis, and M. Wolman. Are the polarization colors of Picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers ? *Histochemistry and Cell Biology*, 93(1) :27–29, 1989.

[45] P. Whittaker, R.A. Kloner, Boughner D. R., and J. G. Pickering. Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Research in Cardiology*, 89 :397–410, 1994.

[46] P.C. Grimm, P. Nickerson, J. Gough, R. McKenna, E. Stern, J. Jeffery, and D.N. Rush. Computerized Image Analysis of Sirius Red-Stained Renal Allograft Biopsies as a Surrogate Marker to Predict Long-Term Allograft Function. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(6) :1662, 2003.

[47] R. Richards-Kortum and E. Sevick-Muraca. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 47 :555–606, 1996.

[48] S.B. Bruehlmann, J.R. Matyas, and N.A. Duncan. Collagen Fibril Sliding Governs Cell Mechanics in the Anulus Fibrosus : An In Situ Confocal Microscopy Study of Bovine Discs. *Spine*, 29(23) :2612, 2004.

[49] PF Davison and EJ Galbavy. Fluorescent dyes demonstrate the uniform expansion of the growing rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 26(9) :1202–9, 1985.

[50] K.N. Krahn, C.V.C. Bouten, S. van Tuijl, M.A.M.J. van Zandvoort, and M. Merkx. Fluorescently labeled collagen binding proteins allow specific visualization of collagen in tissues and live cell culture. *Analytical Biochemistry*, 350(2) :177–185, 2006.

[51] AO Brightman, BP Rajwa, JE Sturgis, ME McCallister, JP Robinson, and SL Voytik-Harbin. Time-lapse confocal reflection microscopy of collagen fibrillogenesis and extracellular matrix assembly in vitro. *Biopolymers*, 54(3) :222–234, 2000.

[52] B. Laude-Boulesteix, A. De Martino, B. Drévillon, and L. Schwartz. Mueller Polarimetric Imaging System with Liquid Crystals. *Applied Optics*, 43(14) :2824–2832, 2004.

[53] D.E. Birk, E.I. Zycband, D.A. Winkelmann, and R.L. Trelstad. Collagen fibrillogenesis in situ : fibril segments are intermediates in matrix assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(12) :4549–4553, 1989.

[54] K.E. Kadler, D.F. Holmes, J.A. Trotter, and J.A. Chapman. Collagen fibril formation. *Biochem J*, 316(Pt 1) :1–11, 1996.

[55] DR Baselt, JP Revel, and JD Baldeschwieler. Subfibrillar structure of type I collagen observed by atomic force microscopy. *Biophysical Journal*, 65(6) :2644, 1993.

[56] T. Gutsmann, G.E. Fantner, J.H. Kindt, M. Venturoni, S. Danielsen, and P.K. Hansma. Force Spectroscopy of Collagen Fibers to Investigate Their Mechanical Properties and Structural Organization. *Biophysical Journal*, 86 :3186–3193, 2004.

[57] L. Bozec and M. Horton. Topography and Mechanical Properties of Single Molecules of Type I Collagen Using Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal*, 88(6) :4223–4231, 2005.

[58] B. Drake, CB Prater, AL Weisenhorn, SA Gould, TR Albrecht, CF Quate, DS Cannell, HG Hansma, and PK Hansma. Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope. *Science*, 243(4898) :1586–1589, 1989.

[59] R.Z. Kramer, L. Vitagliano, J. Bella, R. Berisio, L. Mazzarella, B. Brodsky, A. Zagari, and H.M. Berman. X-ray crystallographic determination of a collagen-like peptide with the repeating sequence (Pro-Pro-Gly). *Journal of Molecular Biology*, 280(4) :623–638, 1998.

[60] D.J.S. Hulmes and A. Miller. Quasi-hexagonal molecular packing in collagen fibrils. *Nature*, 282(5741) :878–880, 1979.

[61] RD Fraser, TP MacRae, and A. Miller. Molecular packing in type I collagen fibrils. *J Mol Biol*, 193(1) :115–25, 1987.

[62] DJ Hulmes, TJ Wess, DJ Prockop, and P. Fratzl. Radial packing, order, and disorder in collagen fibrils. *Biophysical Journal*, 68(5) :1661, 1995.

[63] W. Denk, JH Strickler, and WW Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951) :73–76, 1990.

[64] Y. Barad, H. Eisenberg, M. Horowitz, and Y. Silberberg. Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation. *Applied Physics Letters*, 70 :922, 1997.

[65] M.D. Duncan, J. Reintjes, and TJ Manuccia. Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope. *Opt. Lett*, 7(8) :350–352, 1982.

[66] M. Göppert-Mayer. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annalen der Physik*, 401(3) :273–294, 1931.

[67] YR Shen. *The principles of nonlinear optics*. Wiley-Interscience Hoboken, NJ, 2003.

[68] R.W. Boyd. *Nonlinear Optics*. Academic Press, 2003.

[69] W.R. Zipfel, R.M. Williams, and W.W. Webb. Nonlinear magic : multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature Biotechnology*, 21(11) :1369–1377, 2003.

[70] W. Supatto, D. Debarre, B. Moulia, E. Brouzes, J.L. Martin, E. Farge, and E. Beaurepaire. In vivo modulation of morphogenetic movements in Drosophila embryos with femtosecond laser pulses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(4) :1047, 2005.

[71] D. Débarre, W. Supatto, and E. Beaurepaire. Structure sensitivity in third-harmonic generation microscopy. *Optics Letters*, 30(16) :2134–2136, 2005.

[72] C. Xu, W. Zipfel, J.B. Shear, R.M. Williams, and W.W. Webb. Multiphoton fluorescence excitation : new spectral windows for biological nonlinear microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(20) :10763–10768, 1996.

[73] J.A. Palero, HS de Bruijn, A. van der Ploeg-van den Heuvel, H. Sterenborg, and HC Gerritsen. In vivo nonlinear spectral imaging in mouse skin. *Optics Express*, 14(10) :4395–4402, 2006.

[74] W.R. Zipfel. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12) :7075–7080, 2003.

[75] G.A. Wagnieres, W.M. Star, and B.C. Wilson. In Vivo Fluorescence Spectroscopy and Imaging for Oncological Applications. *Photochemistry and Photobiology*, 68(5) :603–632, 1998.

[76] S. Huang, A.A. Heikal, and W.W. Webb. Two-Photon Fluorescence Spectroscopy and Microscopy of NAD (P) H and Flavoprotein. *Biophysical Journal*, 82(5) :2811–2825, 2002.

[77] A. Pena, M. Strupler, T. Boulesteix, and M. Schanne-Klein. Spectroscopic analysis of keratin endogenous signal for skin multiphoton microscopy. *Optics Express*, 13(16) :6268–6274, 2005.

[78] A. Zoumi, A. Yeh, and B.J. Tromberg. Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(17) :11014, 2002.

[79] M. Born and E. Wolf. *Principles of optics*. Pergamon Press New York, 1980.

[80] P.J. Campagnola, A.C. Millard, M. Terasaki, P.E. Hoppe, C.J. Malone, and W.A. Mohler. Three-Dimensional High-Resolution Second-Harmonic Generation Imaging of Endogenous Structural Proteins in Biological Tissues. *Biophysical Journal*, 82(1) :493–508, 2002.

[81] D.A. Dombeck. Uniform polarity microtubule assemblies imaged in native brain tissue by second-harmonic generation microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12) :7081–7086, 2003.

[82] M. Both, M. Vogel, O. Friedrich, F. von Wegner, T. Künsting, R.H.A. Fink, and D. Uttenweiler. Second harmonic imaging of intrinsic signals in muscle fibers in situ. *Journal of Biomedical Optics*, 9 :882, 2004.

[83] S.V. Plotnikov, A.C. Millard, P.J. Campagnola, and W.A. Mohler. Characterization of the Myosin-Based Source for Second-Harmonic Generation from Muscle Sarcomeres. *Biophysical Journal*, 90(2) :693–703, 2006.

[84] T. Boulesteix, E. Beaurepaire, M.P. Sauviat, and M.C. Schanne-Klein. Second-harmonic microscopy of unstained living cardiac myocytes : measurements of sarcomere length with 20-nm accuracy. *Optics Letters*, 29(17) :2031–2033, 2004.

[85] V. Nucciotti, C. Stringari, L. Sacconi, F. Vanzi, M. Linari, G. Piazzesi, V. Lombardi, and FS Pavone. Structural dynamics of the skeletal muscle fiber by second harmonic generation. *Proceedings of SPIE*, 6860 :68600A, 2008.

[86] V. Nucciotti, C. Stringari, L. Sacconi, F. Vanzi, C. Tesi, N. Piroddi, C. Poggesi, C. Castiglioni, A. Milani, M. Linari, et al. Functional imaging of skeletal muscle fiber in different physiological states by second harmonic generation. 6630 :663004, 2007.

[87] G. Cox, N. Moreno, and J. Feijó. Second-harmonic imaging of plant polysaccharides. *Journal of Biomedical Optics*, 10 :024013, 2005.

[88] D.A. Dombeck, M. Blanchard-Desce, and W.W. Webb. Optical Recording of Action Potentials with Second-Harmonic Generation Microscopy. *Journal of Neuroscience*, 24(4) :999, 2004.

[89] A.C. Millard, L. Jin, M. Wei, J.P. Wuskell, A. Lewis, and L.M. Loew. Sensitivity of Second Harmonic Generation from Styryl Dyes to Transmembrane Potential. *Biophysical Journal*, 86(2) :1169–1176, 2004.

[90] L. Sacconi, M. DŠAmico, F. Vanzi, T. Biagiotti, R. Antolini, M. Olivotto, and FS Pavone. Second-harmonic generation sensitivity to transmembrane potential in normal and tumor cells. *Journal of Biomedical Optics*, 10 :024014, 2005.

[91] L. Sacconi, DA Dombeck, and WW Webb. Overcoming photodamage in second-harmonic generation microscopy : Real-time optical recording of neuronal action potentials. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(9) :3124–3129, 2006.

[92] A.M. Pena, T. Boulesteix, T. Dartigalongue, and M.C. Schanne-Klein. Chiroptical effects in the second harmonic signal of collagens I and IV. *J. Am. Chem. Soc*, 127(29) :10314–10322, 2005.

[93] S. Roth and I. Freund. Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon. *Biopolymers*, 20(6) :1271–90, 1981.

[94] S. Roth and I. Freund. Second harmonic generation and orientational order in connective tissue : a mosaic model for fibril orientational ordering in rat-tail tendon. *J. Appl. Cryst.*, 15(1) :72–78, 1982.

[95] I. Freund, M. Deutsch, and A. Sprecher. Connective tissue polarity. Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon. *Biophysical Journal*, 50(4) :693, 1986.

[96] I. Freund and M. Deutsch. Macroscopic polarity of connective tissue is due to discrete polar structures. *Biopolymers*, 25(4) :601–6, 1986.

[97] TL Mazely and WM Hetherington III. Second-order susceptibility tensors of partially ordered molecules on surfaces. *The Journal of Chemical Physics*, 86 :3640, 1987.

[98] R.M. Williams, W.R. Zipfel, and W.W. Webb. Interpreting Second-Harmonic Generation Images of Collagen I Fibrils. *Biophysical Journal*, 88(2) :1377–1386, 2005.

[99] I. Freund and M. Deutsch. Second-harmonic microscopy of biological tissue. *Opt. Lett*, 11 :94–96, 1986.

[100] P. Stoller, B.M. Kim, A.M. Rubenchik, K.M. Reiser, and L.B. Da Silva. Polarization-dependent optical second-harmonic imaging of a rat-tail tendon. *Journal of Biomedical Optics*, 7 :205, 2002.

[101] I. Rocha-Mendoza, D.R. Yankelevich, M. Wang, K.M. Reiser, C.W. Frank, and A. Knoesen. Sum Frequency Vibrational Spectroscopy : The Molecular Origins of the Optical Second-Order Nonlinearity of Collagen. *Biophysical Journal*, 93(12) :4433, 2007.

[102] P. Stoller, K.M. Reiser, P.M. Celliers, and A.M. Rubenchik. Polarization-Modulated Second Harmonic Generation in Collagen. *Biophysical Journal*, 82(6) :3330–3342, 2002.

[103] E. Yew and C. Sheppard. Effects of axial field components on second harmonic generation microscopy. *Optics Express*, 14(3) :1167–1174, 2006.

[104] EYS Yew and CJR Sheppard. Second harmonic generation polarization microscopy with tightly focused linearly and radially polarized beams. *Optics Communications*, 275(2) :453–457, 2007.

[105] K. Yoshiki, K. Ryosuke, M. Hashimoto, T. Araki, and N. Hashimoto. Second-harmonic-generation microscope using eight-segment polarization-mode converter to observe three-dimensional molecular orientation. *Optics Letters*, 32(12) :1680–1682, 2007.

[106] L. Moreaux, O. Sandre, and J. Mertz. Membrane imaging by second-harmonic generation microscopy. *Journal of the Optical Society of America B*, 17(10) :1685–1694, 2000.

[107] L. Novotny and B. Hecht. *Principles of Nano-Optics*. Cambridge University Press, 2006.

[108] F. Legare, C. Pfeffer, and B.R. Olsen. The Role of Backscattering in SHG Tissue Imaging. *Biophysical Journal*, 93(4) :1312, 2007.

[109] DAD Parry, GRG Barnes, and AS Craig. A Comparison of the Size Distribution of Collagen Fibrils in Connective Tissues as a Function of Age and a Possible Relation between Fibril Size Distribution and Mechanical Properties. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences (1934-1990)*, 203(1152) :305–321, 1978.

[110] AS Craig and DAD Parry. Growth and Development of Collagen Fibrils in Immature Tissues from Rat and Sheep. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences (1934-1990)*, 212(1186) :85–92, 1981.

[111] S.W. Chu, S.P. Tai, M.C. Chan, C.K. Sun, I.C. Hsiao, C.H. Lin, Y.C. Chen, and B.L. Lin. Thickness dependence of optical second harmonic generation in collagen fibrils. *Optics Express*, 15(19) :12005–12010, 2007.

[112] T.A. Theodossiou, C. Thrasivoulou, C. Ekwobi, and D.L. Becker. Second Harmonic Generation Confocal Microscopy of Collagen Type I from Rat Tendon Cryosections. *Biophysical Journal*, 91(12) :4665, 2006.

[113] J.A. Palero, H.S. de Bruijn, et al. Spectrally Resolved Multiphoton Imaging of In Vivo and Excised Mouse Skin Tissues. *Biophysical Journal*, 93(3) :992, 2007.

[114] S.J. Lin, W. Lo, H.Y. Tan, J.Y. Chan, W.L. Chen, S.H. Wang, Y. Sun, W.C. Lin, J.S. Chen, C.J. Hsu, et al. Prediction of heat-induced collagen shrinkage by use of second harmonic generation microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 11 :034020, 2006.

[115] T. Theodossiou, GS Rapti, V. Hovhannisyan, E. Georgiou, K. Politopoulos, and D. Yova. Thermally Induced Irreversible Conformational Changes in Collagen Probed by Optical Second Harmonic Generation and Laser-induced Fluorescence. *Lasers in Medical Science*, 17(1) :34–41, 2002.

[116] BM Kim, J. Eichler, KM Reiser, AM Rubenchik, and LB Da Silva. Collagen structure and nonlinear susceptibility : effects of heat, glycation, and enzymatic cleavage on second harmonic signal intensity. *Lasers Surg Med*, 27(4) :329–35, 2000.

[117] R. LaComb, O. Nadiarnykh, S.S. Townsend, and P.J. Campagnola. Phase matching considerations in second harmonic generation from tissues : Effects on emission directionality, conversion efficiency and observed morphology. *Optics Communications*, 281(7) :1823–1832, 2008.

[118] V. Meas-Yedid, E. Glory, E. Morelon, C. Pinset, G. Stamon, and J.C. Olivo-Marin. Automatic color space selection for biological image segmentation. *Pattern Recognition, 2004. ICPR 2004. Proceedings of the 17th International Conference on*, 3, 2004.

[119] G.J. Tortora and S.R. Grabowski. *Introduction to the Human Body : The Essentials of Anatomy and Physiology*. Wiley, 2003.

[120] A. Gougoux. *Physiologie des reins et des liquides corporels*. MULTIMONDES, 2005.

[121] L. Hansson, L.H. Lindholm, L. Niskanen, J. Lanke, T. Hedner, A. Niklason, K. Luomanmaki, B. Dahlof, U. de Faire, C. Morlin, et al. Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension : the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *Lancet*, 353(9153) :611–6, 1999.

[122] G. Maschio, D. Alberti, G. Janin, F. Locatelli, JFE Mann, M. Motolese, C. Ponticelli, E. Ritz, and P. Zucchelli. Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. *N Engl J Med*, 334(15) :939–45, 1996.

[123] M.J. Mulvany. Small Artery Remodeling and Significance in the Development of Hypertension. *Physiology*, 17(3) :105–109, 2002.

[124] A.M. EL NAHAS. Plasticity of kidney cells : Role in kidney remodeling and scarring. *Kidney International*, 64(5) :1553, 2003.

[125] P. Fioretto, M.W. Steffes, D.E.R. Sutherland, F.C. Goetz, and M. Mauer. Reversal of Lesions of Diabetic Nephropathy after Pancreas Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 339(2) :69, 1998.

[126] O. Hotta, T. Furuta, S. Chiba, S. Tomioka, and Y. Taguma. Regression of IgA nephropathy : a repeat biopsy study. *Am J Kidney Dis*, 39(3) :493–502, 2002.

[127] J.J. Boffa, P.L. Tharaux, J.C. Dussaule, and C. Chatziantoniou. Regression of Renal Vascular Fibrosis by Endothelin Receptor Antagonism. *Hypertension*, 37(2) :490–496, 2001.

[128] L. Raij, S. Azar, W. Keane, et al. Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int*, 26(2) :137–143, 1984.

[129] R.F. Spurney, P.Y. Fan, P. Ruiz, F. Sanfilippo, D.S. Pisetsky, and T.M. Coffman. Thromboxane receptor blockade reduces renal injury in murine lupus nephritis. *Kidney Int*, 41(4) :973–982, 1992.

[130] H. Abdi. The Kendall Rank correlation. *Encyclopedia of Measurement and Statistics. Thousand Oaks (CA) : Sage*, 2007.

[131] S.D. Crowley, S.B. Gurley, M.J. Herrera, P. Ruiz, R. Griffiths, A.P. Kumar, H.S. Kim, O. Smithies, T.H. Le, and T.M. Coffman. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(47) :17985, 2006.

[132] S. Kim and H. Iwao. Molecular and Cellular Mechanisms of Angiotensin II-Mediated Cardiovascular and Renal Diseases. *Pharmacological Reviews*, 52(1) :11–34, 2000.

[133] PB Timmermans, PC Wong, AT Chiu, WF Herblin, P. Benfield, DJ Carini, RJ Lee, RR Wexler, JA Saye, and RD Smith. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacological Reviews*, 45(2) :205–251, 1993.

[134] GL Naviar, MC Prieto-Carrasquero, and H. Kobori. Molecular Aspects of the renal renin-angiotensin system. *Molecular Mechanisms in Hypertension. R. Re, D. DiPette, E. Schiffrin, and R. Sowers J., editors. Taylor and Francis, London and New York*, pages 3–14, 2006.

[135] J.R. Sowers. Hypertension, Angiotensin II, and Oxidative Stress. *New England Journal of Medicine*, 346(25) :1999–2001, 2002.

[136] C.C.K. Yu, T.S.B. Yen, C.A. Lowell, and A.L. DeFranco. Lupus-like kidney disease in mice deficient in the Src family tyrosine kinases Lyn and Fyn. *Current Biology*, 11(1) :34–38, 2001.

[137] F. Tam. Development of scarring and renal failure in a rat model of crescentic glomerulonephritis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 14(7) :1658–1666, 1999.

[138] M. Ye, J. Wysocki, J. William, M.J. Soler, I. Cokic, and D. Batlle. Glomerular Localization and Expression of Angiotensin-Converting Enzyme 2 and Angiotensin-Converting Enzyme : Implications for Albuminuria in Diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(11) :3067, 2006.

[139] FN Ziyadeh, K. Sharma, M. Ericksen, and G. Wolf. Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta. *Journal of Clinical Investigation*, 93(2) :536, 1994.

[140] A. Francki, K. Motamed, T.D. McClure, M. Kaya, C. Murri, D.J. Blake, J.G. Carbon, and E.H. Sage. SPARC regulates cell cycle progression in mesangial cells via its inhibition of IGF-dependent signaling. *Journal of Cellular Biochemistry*, 88(4) :802–811, 2003.

[141] G. Wolf, U. Haberstroh, and EG Neilson. Angiotensin II stimulates the proliferation and biosynthesis of type I collagen in cultured murine mesangial cells. *American Journal of Pathology*, 140(1) :95–107, 1992.

[142] C. Chatziantoniou, JJ Boffa, R. Ardaillou, and JC Dussaule. Nitric oxide inhibition induces early activation of type I collagen gene in renal resistance vessels and glomeruli in transgenic mice. Role of endothelin. *Journal of Clinical Investigation*, 101(12) :2780, 1998.

[143] N. Bueyuekbabani and D. Droz. Distribution of the Extracellular Matrix Components in Human Glomerular Lesions. *JOURNAL OF PATHOLOGY*, 172 :199–199, 1994.

[144] Y. CAI, M. SICH, A. BEZIAU, MM KLEPPEL, and M.C. GUBLER. Collagen distribution in focal and segmental glomerulosclerosis : An immunofluorescence and ultrastructural immunogold study. *Journal of pathology*, 179(2) :188–196, 1996.

[145] A. Nerlich and E. Schleicher. Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human diabetic glomerular lesions. *American Journal of Pathology*, 139(4) :889–899, 1991.

[146] AD Glick, HR Jacobson, and MA Haralson. Mesangial deposition of type I collagen in human glomerulosclerosis. *Hum Pathol*, 1992 :1373–9, 1912.

[147] Y. Yang, S. Zhang, M. Sich, A. Béziau, L.P.W.J. van den Heuvel, and MC Gubler. Glomerular extracellular matrix and growth factors in diffuse mesangial sclerosis. *Pediatric Nephrology*, 16(5) :429–438, 2001.

[148] PN Furness and N. Taub. Convergence of European Renal Transplant Pathology Assessment Procedures (CERTPAP) Project. International variation in the interpretation of renal transplant biopsies : report of the CERTPAP Project. *Kidney Int*, 60 :1998–2012, 2001.

[149] C.H. Kang, D. Tai, S. Xu, N. Tan, S.M. Chia, and H. Yu. Quantification of collagen in second harmonic imaging of liver fibrosis. In *Focus On Microscopy (Osaka)*, 2008.

[150] S.J. Lin, R.J. Wu, H.Y. Tan, W. Lo, W.C. Lin, T.H. Young, C.J. Hsu, J.S. Chen, S.H. Jee, and C.Y. Dong. Evaluating cutaneous photoaging by use of multiphoton fluorescence and second-harmonic generation microscopy. *Optics Letters*, 30(17) :2275–2277, 2005.

[151] M.J. Koehler, K. König, P. Elsner, R. Bückle, and M. Kaatz. In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography. *Optics Letters*, 31(19) :2879–2881, 2006.

[152] R. Cicchi, S. Sestini, V. De Giorgi, D. Massi, T. Lotti, and FS Pavone. Multidimensional two-photon imaging of diseased skin. In *Proceedings of SPIE*, volume 6859, page 685903. SPIE, 2008.

[153] K. Choi, M. Siegel, J.L. Piper, L. Yuan, E. Cho, P. Strnad, B. Omary, K.M. Rich, and C. Khosla. Chemistry and Biology of Dihydroisoxazole Derivatives : Selective Inhibitors of Human Transglutaminase 2. *Chemistry & Biology*, 12(4) :469–475, 2005.

[154] V. De Laurenzi and G. Melino. Gene Disruption of Tissue Transglutaminase. *Molecular and Cellular Biology*, 21(1) :148–155, 2001.

[155] Z. Szondy, Z. Sarang, P. Molnar, T. Nemeth, M. Piacentini, P.G. Mastroberardino, L. Falasca, D. Aeschlimann, J. Kovacs, I. Kiss, et al. Transglutaminase 2-/-mice reveal a phagocytosis-associated crosstalk between macrophages and apoptotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(13) :7812–7817, 2003.

[156] A. Hartner, N. Cordasic, B. Klanke, R. Veelken, and K.F. Hilgers. Strain differences in the development of hypertension and glomerular lesions induced by deoxycorticosterone acetate salt in mice. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 18(10) :1999–2004, 2003.

[157] E.N.T.P. Bakker, C.L. Buus, J.A.E. Spaan, J. Perree, A. Ganga, T.M. Rolf, O. Sorop, L.H. Bramsen, M.J. Mulvany, and E. VanBavel. Small Artery Remodeling Depends on Tissue-Type Transglutaminase. *Circulation Research*, 96(1) :119–126, 2005.

[158] J. Risteli, I. Elomaa, S. Niemi, A. Novamo, and L. Risteli. Radioimmunoassay for the pyridinoline cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen : a new serum marker of bone collagen degradation. *Clinical Chemistry*, 39(4) :635–640, 1993.

[159] Y. Furutani, A. Kato, M. Notoya, M.A. Ghoneim, and S. Hirose. A Simple Assay and Histochemical Localization of Transglutaminase Activity Using a Derivative of Green Fluorescent Protein as Substrate. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 49(2) :247, 2001.

[160] S. Jung, J. Aliberti, P. Graemmel, M.J. Sunshine, G.W. Kreutzberg, A. Sher, and D.R. Littman. Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. *Molecular and Cellular Biology*, 20(11) :4106–4114, 2000.

[161] P. Boor, A. Konieczny, L. Villa, A.L. Schult, E. Bucher, S. Rong, U. Kunter, C.R.C. van Roeyen, T. Polakowski, H. Hawlisch, et al. Complement C5 Mediates Experimental

Tubulointerstitial Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(5) :1508, 2007.

[162] F. Eitner, E. Bucher, C. van Roeyen, U. Kunter, S. Rong, C. Seikrit, L. Villa, P. Boor, L. Fredriksson, G. Backstrom, et al. PDGF-C Is a Proinflammatory Cytokine that Mediates Renal Interstitial Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2008.

[163] V.L.M. ESNAULT, A. MOREAU, A. TESTA, and D. BESNIER. Glomérulonéphrites extracapillaires. *Néphrologie & thérapeutique*, 2(7) :446–460, 2006.

[164] C.M. Lloyd, A.W. Minto, M.E. Dorf, A. Proudfoot, T.N.C. Wells, D.J. Salant, and J.C. Gutierrez-Ramos. RANTES and Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) Play an Important Role in the Inflammatory Phase of Crescentic Nephritis, but Only MCP-1 Is Involved in Crescent Formation and Interstitial Fibrosis. *Journal of Experimental Medicine*, 185(7) :1371–1380, 1997.

[165] KA Nath. Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *Am J Kidney Dis*, 20(1) :1–17, 1992.

[166] AS Levey, JP Bosch, JB Lewis, T. Greene, N. Rogers, and D. Roth. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine : a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med*, 130(6) :461–470, 1999.