

Université du Québec
INRS Énergie, Matériaux et Télécommunication

**Microscopie à Génération de Seconde Harmonique appliquée à l'imagerie
de l'ostéo-arthrite.**

Par

Marie-Andrée Houle

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Science de l'Énergie et des Matériaux

Jury d'évaluation

Examineur Externe	Sheila Laverty Université de Montréal
Examineur Externe	Santiago Constantino Université de Montréal
Examineur Interne	Tsuneyuki Ozaki INRS-ÉMT
Directeur de Recherche	François Légaré INRS-ÉMT

Résumé

La microscopie à Génération de Seconde Harmonique (GSH) est une technique d'imagerie qui permet, à l'aide d'un faisceau laser à impulsion, de produire un signal dont la fréquence est le double de la fréquence du faisceau laser. Ce type de microscopie est utilisé principalement en biologie pour étudier les tissus riches en collagène de type I, II et III. Ceci est possible grâce à la structure non centrosymétrique des fibrilles de collagène. Le collagène est présent partout dans le corps et peut être classifié en plusieurs types. Le collagène de type I est celui qui est présent en plus grande quantité dans le corps et se retrouve dans les tissus connectifs. Le collagène de type II est présent presque exclusivement dans le cartilage et forme la majeure proportion du poids sec de la matrice extracellulaire de ce dernier. L'ostéo-arthrite est une des maladies qui affecte le cartilage articulaire et mène ultimement à la dégradation du tissu. Une des étapes à ce processus de dégradation est la modification de l'arrangement ultrastructural de collagène et, éventuellement, à la dégradation des fibrilles de collagène.

Dans ce mémoire, le collagène de type II fut imagé à l'aide de la microscopie GSH. Des échantillons de genoux en santé et malades furent utilisés pour notre analyse. La structure de collagène fut étudiée de deux manières. Premièrement, la surface du cartilage fut analysée grâce à des échantillons épais de la surface du cartilage provenant de genoux de bovins. Nous avons ainsi constaté que la modification du maillage de collagène se produit tout d'abord à la surface du cartilage pour se propager vers l'intérieur de l'articulation. Ensuite, nous avons découvert que des concentrations de contrainte sur la surface du cartilage créent un alignement dans les fibrilles qui constitue le maillage de collagène, ce qui favorise la formation de regroupements de fibrilles allant jusqu'à quelques dizaines de microns, affaiblissant l'arrangement ultrastructural de collagène.

Des échantillons minces de sections transversales de tissus ont également été analysés. On retrouvait, parmi ceux-ci, des échantillons de genoux atteints d'ostéo-arthrite ainsi que des échantillons de genoux en santé. Dans les échantillons de genoux atteints

d'ostéo-arthrite, on observe des régions endommagées d'environ $500 \mu m^2$ où le signal de seconde harmonique est plus élevé qu'ailleurs dans le tissu. Nous montrons que ceci est causé par la formation de regroupements de fibrilles dans ces régions. Bref, la microscopie GSH semble être une technique d'imagerie prometteuse pour le diagnostic précoce de l'ostéo-arthrite. Avec la miniaturisation des endoscopes utilisant des fibres optiques, la combinaison de ceux-ci avec la microscopie GSH permettrait son utilisation *in vivo* en causant très peu de dommages aux patients.

Étudiant

Directeur de recherche

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, François Légaré pour m'avoir offert ce projet de maîtrise et de m'avoir guidé dans sa progression. J'ai beaucoup appris à ses côtés et la passion qu'il met à son travail m'a donné l'envie de poursuivre mes études au doctorat. Je le remercie également d'avoir mis à ma disposition son laboratoire de microscopie et d'avoir veillé à ma réussite. Également, j'aimerais remercier Cameron Brown pour avoir fournis les échantillons nécessaires à la réalisation de ma maîtrise et de m'avoir enseigné les rudiments de la préparation d'échantillons de cartilage. Également, ses connaissances sur la biologie du cartilage ont été d'une grande aide pour la compréhension de mes résultats. J'aimerais aussi remercier Lora Ramunno et Konstantin Popov pour leur aide grâce aux simulations numériques qu'ils ont effectués sans quoi il aurait été très difficile de trouver une explication valable pour nos résultats.

J'aimerais également remercier toute l'équipe du laboratoire pour m'avoir aidé tout au long de ma maîtrise et de m'avoir aidé à faire fonctionner le microscope les nombreuses fois où il refusait de marcher.

J'aimerais aussi remercier ma famille pour m'avoir soutenue durant ces deux années. À mon papa et ma maman pour continuer de veiller sur moi et de prendre de mes nouvelles. J'aimerais également remercier mes amies Kathryn, Andrée-Anne, Myriam et Catherine pour leur amitié et leur soutien.

Table des matières

Résumé	ii
Remerciements	iv
1 Introduction	1
2 Histologie et Ostéo-arthrite	7
2.1 Collagène de type I	7
2.2 Collagène de type II	7
2.3 Structure du collagène	8
2.4 Cartilage	10
2.5 Os	12
2.5.1 Articulation de l'os	13
2.6 Ostéo-arthrite	13
2.6.1 Stade précoce de l'ostéo-arthrite	16
3 Optique non-linéaire	17
3.1 Microscopie optique non-linéaire	17
3.1.1 Microscopie à Génération de Seconde Harmonique	19
3.1.2 Microscopie à Génération de Troisième Harmonique	19
3.1.3 Microscopie CARS	20
3.2 Génération de Seconde Harmonique (GSH)	21
3.2.1 Introduction	21
3.2.2 Oscillateur anharmonique	22
3.2.3 Description de la génération de seconde harmonique en utilisant les équations d'ondes	26
3.2.4 Accord de phase	31
3.2.5 Génération de seconde harmonique dans les fibrilles de collagène	33
4 Montage expérimental	35
4.1 Source laser	35
4.2 Microscope	36
4.3 Ellipticité du faisceau laser	37
4.3.1 Sans miroirs dichroïques	37
4.3.2 Avec un miroir dichroïque	41
4.4 Préparation des échantillons	43
4.4.1 Échantillons épais	43

4.4.2	Échantillons minces	44
5	Microscopie GSH de la surface de cartilage	46
5.1	Arrangement ultrastructural normal	47
5.2	Fibrillation avancée du cartilage	48
5.3	Initiation et progression de la formation de regroupement de fibrilles .	48
5.4	Modification de l'arrangement ultrastructural de collagène selon la profondeur	53
6	Microscopie GSH dans des échantillons minces de cartilage	57
6.1	Genoux sains - cartilage normal	58
6.2	Genoux atteints d'ostéo-arthrite	59
6.3	Comparaison du signal GSH	65
6.4	Simulations numériques	71
7	Conclusion	78

Table des figures

1.1	Représentation des fibres de collagène.	2
1.2	Image de microscopie électronique à balayage (MEB) de cartilage articulaire.	4
2.1	Schéma représentant le modèle de Benninghoff de l'arrangement des fibrilles de collagène dans la matrice extracellulaire.	8
2.2	Représentation du modèle d'architecture de collagène actuel.	9
2.3	Représentation d'une fibre de collagène.	11
2.4	Illustration de l'os montrant l'os compact et l'os spongieux.	14
2.5	Schéma d'une articulation diarthrose entre deux os.	15
3.1	Localisation de la fluorescence.	18
3.2	Diagramme de Jabloski	20
3.3	Représentation de la génération de seconde harmonique.	23
3.4	Fonction du potentiel d'énergie pour un milieu non centrosymétrique.	24
3.5	Fonction du potentiel d'énergie pour un milieu centrosymétrique.	26
3.6	Variation spatiale de l'amplitude du champ de l'onde fondamentale et de sa seconde harmonique.	30
3.7	Graphique représentant l'accord de phase des vecteurs d'onde dans le cas de la génération de seconde harmonique.	32
4.1	Schéma du montage expérimental.	36
4.2	Puissance à la sortie du microscope en fonction de l'angle de la polarisation du faisceau entrant.	39
4.3	Puissance à la sortie du microscope pour une polarisation parallèle et perpendiculaire à celui du laser pour différents angles d'entrée de la polarisation. Sans miroir dichroïque.	40
4.4	Puissance à la sortie du microscope pour une polarisation parallèle et perpendiculaire à celle du laser pour différents angles d'entrée de la polarisation. Avec un miroir dichroïque.	42
4.5	Image de genoux de bovin atteint d'ostéo-arthrite.	44
5.1	Image de microscopie de seconde harmonique (GSH) de la surface de cartilage provenant d'un genou en santé.	47
5.2	Tissu hautement fibrillé provenant d'une région de dégradation visible.	49

5.3	Origine de fibrillation visible montrant la transition à partir d'un niveau microscopique de la perturbation vers un niveau macroscopique.	50
5.4	Tissu d'apparence normal dans une zone de transition.	52
5.5	Tissu macroscopiquement normal dans la zone de transition montrant une dégradation plus avancée que celle de la figure 5.4.	54
5.6	La progression de la dégradation du collagène en fonction de la profondeur (intervalle de 2 μm de A à H).	56
6.1	Image GSH de cartilage articulaire.	59
6.2	Graphique de l'intensité normalisée du signal GSH en fonction de l'angle de la polarisation linéaire du faisceau laser dans un échantillon en santé.	60
6.3	Images de collagène contenu dans le cartilage articulaire provenant de genoux atteints d'ostéo-arthrite.	61
6.4	Images de collagène contenu dans le cartilage articulaire provenant de genoux atteints d'ostéo-arthrite.	62
6.5	Images de collagène contenu dans le cartilage articulaire provenant de genoux atteints d'ostéo-arthrite.	63
6.6	Graphiques de l'intensité normalisée du signal GSH en fonction de l'angle de la polarisation du faisceau laser.	64
6.7	Graphique du signal GSH acquis dans la direction backward dans des régions endommagées et normales de genoux malades et des régions normales de genoux en santé.	67
6.8	Graphique du signal GSH acquis dans la direction forward dans des régions endommagées et normales de genoux malades et des régions normales de genoux en santé.	68
6.9	Ratio normalisé du signal dans la direction forward et backward dans des régions endommagées et normales de genoux malades et des régions normales de genoux en santé.	70
6.10	Représentation du volume occupé par les fibrilles dans le volume focal.	73
6.11	Graphique des résultats des simulations numériques utilisant les fonctions de Green du ratio de l'intensité dans la direction forward sur celle dans la direction backward dans un maillage normale de collagène en fonction du ratio de remplissage ρ	74
6.12	Graphique des résultats des simulations numériques utilisant les fonctions de Green du ratio de l'intensité dans la direction forward sur celle dans la direction backward dans un maillage endommagé de collagène en fonction du nombre de fibrilles.	75
6.13	Graphique des résultats des simulations numériques utilisant les fonctions de Green de l'intensité du signal GSH dans la direction forward en fonction du ratio de remplissage pour un tissus normal.	75
6.14	Graphique des résultats des simulations numériques utilisant les fonctions de Green de l'intensité du signal GSH dans la direction backward en fonction du ratio de remplissage pour un tissus normal.	76

6.15	Graphique des résultats des simulations numériques utilisant les fonctions de Green de l'intensité du signal GSH dans la direction forward en fonction du nombre de fibrilles par regroupement N_b dans un tissu endommagé à un ratio de remplissage de $\rho=0,35$	76
6.16	Graphique des résultats des simulations numériques utilisant les fonctions de Green de l'intensité du signal GSH dans la direction backward en fonction du nombre de fibrilles par regroupement N_b dans un tissu endommagé à un ratio de remplissage de $\rho=0,35$	77

Liste des tableaux

4.1	Table de la puissance pour différents angles avec et sans compensateur de Berek.	43
-----	--	----

Chapitre 1

Introduction

L'ostéo-arthrite est une famille de maladies qui affecte les articulations, principalement au niveau des genoux et des hanches. Bien qu'il affecte toute l'articulation, le changement le plus important et le plus reconnu par la communauté scientifique est la dégradation du cartilage articulaire [1, 2]. Le cartilage est un tissu conjonctif dont la fonction principale est de réduire la friction entre les os dans les articulations et de distribuer les contraintes sur toute la surface de l'articulation. Une des principales composantes de la matrice extracellulaire est le collagène de type II. Il est constitué de fibrilles de diamètres variables formant un maillage et dont les propriétés mécaniques sont assurées par un entremêlement des fibrilles encapsulant les protéoglycanes, qui toutefois conservent une direction radiale générale (voir figure 1.1c). À un niveau structural plus élevé, les fibrilles de collagène forment une structure d'arc, partant de l'os pour courber à la surface du cartilage. Ils produisent un entrelacement dense et pseudoaléatoire, ce qui leur confère une très bonne résistance à la compression [1]. La fonction principale des protéoglycanes est de contribuer au maintien de la matrice et à l'adhésion cellulaire en retenant les molécules d'eau [3]. L'attraction des molécules d'eau fait gonfler le cartilage et le maillage de collagène crée une force de résistance à ce gonflement et confère une certaine rigidité au cartilage. À un certain stade de la progression de la maladie, il y a modification de l'organisation du maillage de collagène, causée par les métalloprotéinases (MMPs), des enzymes qui dégradent la matrice extracellulaire [4, 5], et des facteurs mécaniques. Ceci affaiblit les propriétés

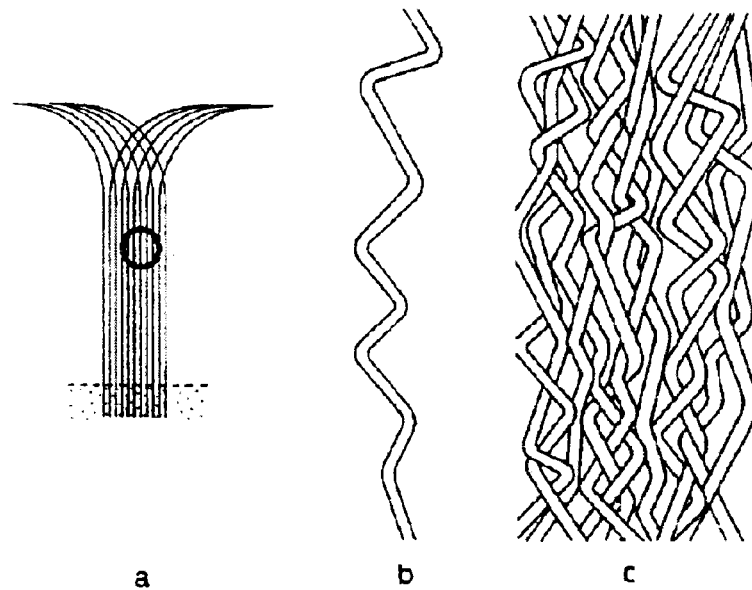


FIGURE 1.1 – Représentation des fibres de collagène. (a) Fibrilles sur toute leur longueur, allant de l’os jusqu’à la surface. (b) Fibrille individuelle. (c) Plusieurs fibrilles entremêlées pour former un maillage. [9]

mécaniques du cartilage, particulièrement sa résistance à la compression, ce qui mène à sa dégradation. Lorsque le corps n’est plus capable de régénérer le cartilage à la même vitesse que sa dégradation, l’ostéo-arthrite apparaît [1, 4]. Plusieurs facteurs peuvent causer cette perte d’équilibre, que ce soit des facteurs héréditaires, constitutionnels, métaboliques, environnementaux ou biomécaniques [4]. De ce fait, il y a dégradation du cartilage jusqu’au point où l’os se trouve à découvert, ce qui cause des douleurs [4, 6]. Malheureusement, il n’existe actuellement aucun traitement qui permette de guérir complètement cette maladie, bien que plusieurs recherches soient en cours en ce sens [4, 7]. Présentement, lorsque la progression de l’ostéo-arthrite est à un stade trop avancé, la seule solution reste le remplacement de l’articulation par une prothèse [4, 8].

Les étapes menant à la dégradation du cartilage sont un sujet encore débattu de nos jours. Toutefois, il est reconnu dans la littérature que la perte des protéoglycanes et la modification de la structure du maillage de collagène sont des changements biologiques associés à l’ostéo-arthrite [2, 4, 10, 11]. À l’échelle ultrastructurale, la mo-

dification du maillage de collagène peut être représentée comme un "démêlement" des fibrilles de collagène entre elles pour former des regroupements de fibrilles ("bundles") (voir la figure 1.2) [1, 12]. Cette étape de la dégradation du maillage de collagène est considérée comme irréversible [12]. La perte des protéoglycanes est fortement interdépendante de l'état du maillage de collagène. En effet, la perte de protéoglycanes mène à la dégradation du collagène et la dégradation du collagène mène à la perte de protéoglycanes. Ce dernier se produit généralement sur toute la profondeur du cartilage [4].

Pour trouver un moyen de guérir l'ostéo-arthrite, il est nécessaire de pouvoir mesurer sa progression. Ainsi, en ce moment, les techniques utilisées pour imager le cartilage *in-vivo* est la radiographie, l'imagerie magnétique, la scintigraphie, l'ultrasonographie et l'endoscopie [13]. Or, comme ces techniques n'offrent pas des images ayant une très grande résolution, il est difficile d'y discriminer les différentes étapes de dégradation du cartilage ce qui ne permet pas de distinguer avec précision les régions atteintes d'ostéo-arthrite des régions saines. Également, il existe plusieurs techniques d'imageries *ex-vivo* tel que la microscopie optique et la microscopie électronique qui sont largement utilisées dans la recherche [1, 10, 14] et offrent une très bonne résolution, mais il est impossible de mesurer une progression sur le temps de la maladie ou encore de les utiliser pour diagnostiquer des patients. Également, ces techniques offrent soit peu d'informations (la microscopie optique offrant un très mauvais contraste puisque le collagène et les protéoglycanes ont un indice de réfraction semblable) [15] ou nécessitent une préparation des échantillons minutieuse (microscope électronique) [1]. Toutefois, la grande majorité de la matrice extracellulaire du cartilage est composée de collagène de type II, une protéine non centrosymétrique, ce qui permet l'imagerie du cartilage à l'aide de la microscopie GSH. De plus, comme mentionnée précédemment, une des étapes principales de la progression de l'ostéo-arthrite est la dégradation du maillage de collagène [16]. Ainsi, la GSH est une technique de microscopie de choix pour imager ces changements de la structure de collagène et permet d'obtenir des images où la structure du maillage de collagène est visible.

La microscopie GSH est présentement largement utilisée pour imager plusieurs

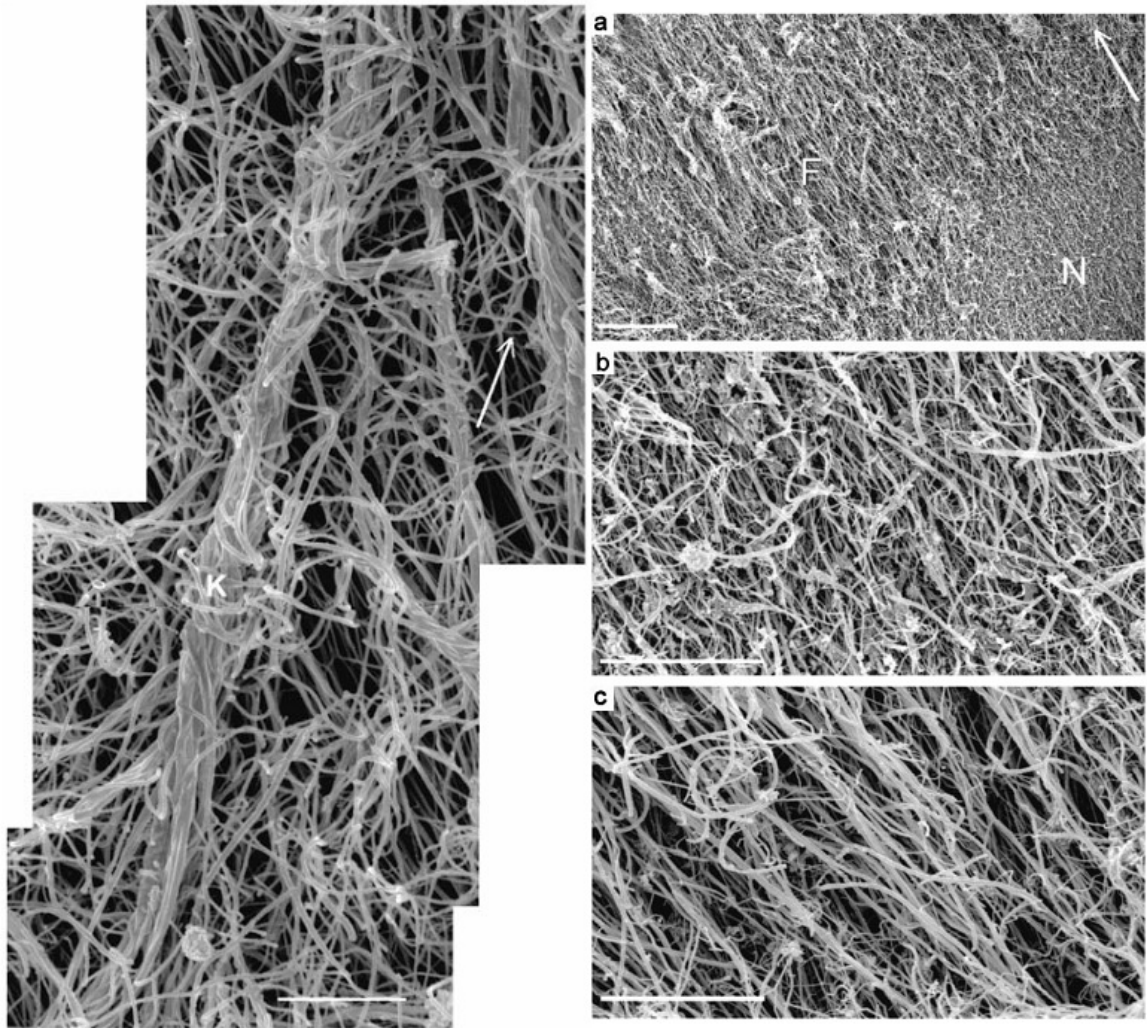


FIGURE 1.2 – Image de Microscopie électronique à balayage (MEB) du collagène provenant du cartilage articulaire. Gauche : Large regroupement de fibrilles orienté approximativement perpendiculaire à la surface de l'os et associé à une structure en "noeuds". Barre d'échelle, $2\mu\text{m}$. Droite : (a) Image montrant la transition entre du cartilage endommagé ou fibrillé (F) et du cartilage normal (N). Barre d'échelle, $20\mu\text{m}$. (b) Un agrandissement de l'image (a) du cartilage normal (région N) montrant sa structure pseudoaléatoire. (c) Un agrandissement de l'image (a) du cartilage endommagé (région F) montrant le "démêlement" du maillage de collagène. Barre d'échelle, $5\mu\text{m}$. [1]

structures telles que le sarcomère contenu dans les muscles [17, 18], la tubuline contenue dans les microtubules [17, 19, 20], le collagène de type I (que l'on retrouve dans plusieurs tissus biologiques tels que le fascia [21–23], les muscles squelettiques [17, 21, 24], le foie [25], les tendons [21, 26–34], les neurones [20], le derme [28, 31, 34–36], la dentine [28, 34] et l'os [28, 34, 37]), le collagène de type II [16, 29, 38–41] (que l'on retrouve principalement dans le cartilage) et le collagène de type III [29] (que l'on peut retrouver dans les vaisseaux sanguins).

Plusieurs recherches sont présentement en cours ayant pour but de trouver de nouvelles techniques pour imager le cartilage articulaire. Certains groupes de recherche travaillent entre autres sur la tomographie à cohérence optique sensible à la polarisation (PS-OCT) qui, contrairement à la tomographie à cohérence optique (OCT), est sensible à la polarisation de l'onde réfléchie. Ainsi, il indique la présence d'éléments ayant une forte anisotropie tels que le collagène de type I et II [39]. Cette technique fut utilisée pour détecter la dégradation du cartilage à un stade précoce [42]. Également, des recherches au niveau de la microscopie optique non-linéaire ont été effectuées. La première équipe de recherche à avoir imagé le cartilage à l'aide de la microscopie GSH a observé que le signal GSH est beaucoup plus dépendant de la polarisation laser dans des régions atteintes d'ostéo-arthrite [38], contrairement aux régions en santé. De plus, une autre équipe de recherche s'est penchée sur la sensibilité de la polarisation du signal GSH et a observé un changement du comportement du signal GSH dans les régions atteintes d'ostéo-arthrite [16].

Dans ce mémoire, la possibilité d'utiliser la microscopie GSH comme outils de recherche et de diagnostic de l'ostéo-arthrite sera démontrée. Tout d'abord, aux chapitres 2 et 3, une revue de la théorie concernant principalement l'anatomie des articulations, l'ostéo-arthrite, la microscopie optique non-linéaire et la génération de seconde harmonique sera faite. Par la suite, au chapitre 4, une description du montage expérimental sera faite ainsi que l'analyse de l'ellipticité induite dans le microscope. De plus, une description de la préparation des échantillons biologiques sera présentée. Ensuite au chapitre 5, les résultats concernant l'imagerie GSH de la surface de cartilage sur des échantillons épais provenant de bovins seront présentés. Au chapitre 6, les résul-

tats concernant l'imagerie de sections transversales minces de cartilage provenant de genoux humains seront présentés. Finalement, le chapitre 7 présentera la conclusion de nos recherches.

Chapitre 2

Histologie et Ostéo-arthrite

Le collagène est une des protéines les plus abondantes du corps humain [43]. Il représente de 20 à 25 % de toutes les protéines contenues dans le corps. Il se trouve essentiellement dans la matrice extracellulaire et permet à cette dernière de résister aux forces de tension. Il existe au-dessus de 20 types de collagène, mais dans le contexte de cette maîtrise, seulement les types I et II sont étudiés. La différence entre ces différents types de collagène est essentiellement la séquence d'amino-acides composant les chaînes α qui composent la fibrille de collagène. Chaque type de collagène a une fonction particulière et se trouve à un endroit particulier dans le corps.

2.1 Collagène de type I

Le collagène de type I est le plus commun. Il se trouve dans plusieurs endroits dans le corps, tel que dans les tissus connectifs comme le derme, les tendons, les ligaments, mais également les os, la dentine et le cementum. Sa principale fonction est d'assurer une bonne résistance au tension.

2.2 Collagène de type II

Le collagène de type II est présent presque exclusivement dans le cartilage hyalin et le cartilage élastique. Sa principale fonction est d'assurer une bonne résistance à

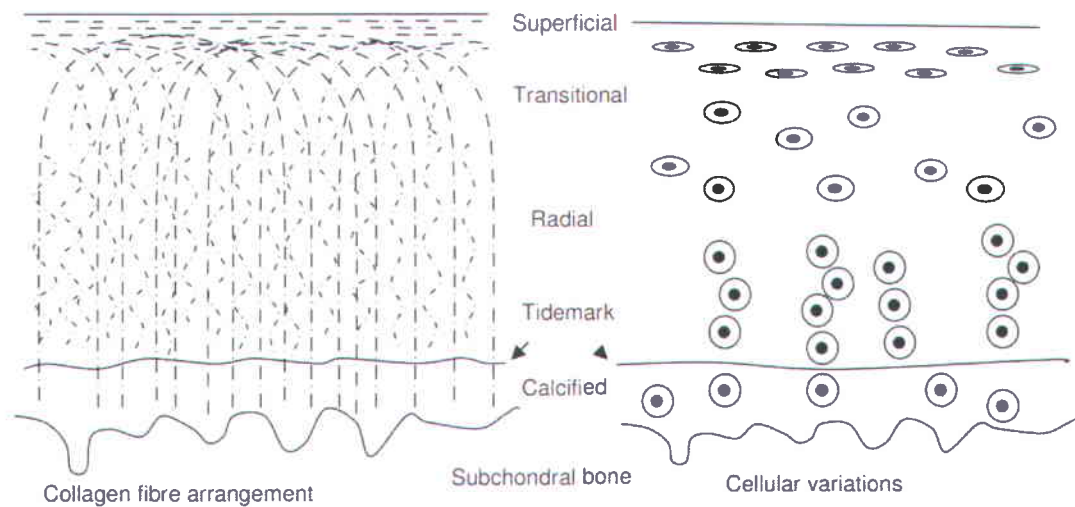


FIGURE 2.1 – (Gauche) Schéma représentant le modèle de Benninghoff de l'arrangement des fibrilles de collagène dans la matrice extracellulaire. (Droite) Schéma représentant la forme des cellules dans les différentes couches du cartilage. [39]

la pression. Plusieurs modèles ont été étudiés pour déterminer la structure du collagène dans le cartilage hyalin. Le modèle classique présenté par Benninghoff [44] (voire figure 2.1) suggère que les fibrilles de collagène prennent naissance dans l'os sous-chondral, se courbent au niveau de la zone transitionnelle, devenant donc parallèle à la surface dans la zone superficielle, et redescendent jusqu'à l'os sous-chondral. À la surface du cartilage, les fibres sont parallèles à celle-ci, formant une couche "tangentielle" ayant une épaisseur de $100 \mu\text{m}$. Toutefois, des recherches plus récentes [15] suggèrent que les fibrilles de collagène forment des feuilles qui prennent naissance à l'os sous-chondral et ensuite courbent pour être parallèle à la surface du cartilage, mais, contrairement au modèle classique, termine à la couche superficielle, ne redescendant pas vers l'os sous-chondral (figure 2.2).

2.3 Structure du collagène

Le collagène se présente sous forme de fibres qui ont habituellement un diamètre de l'ordre de $10 \mu\text{m}$. Les fibres de collagène sont formées d'agrégats de fibrilles plus fines d'un diamètre variant entre 10 et 300 nm et de plusieurs micromètres de long. Ces

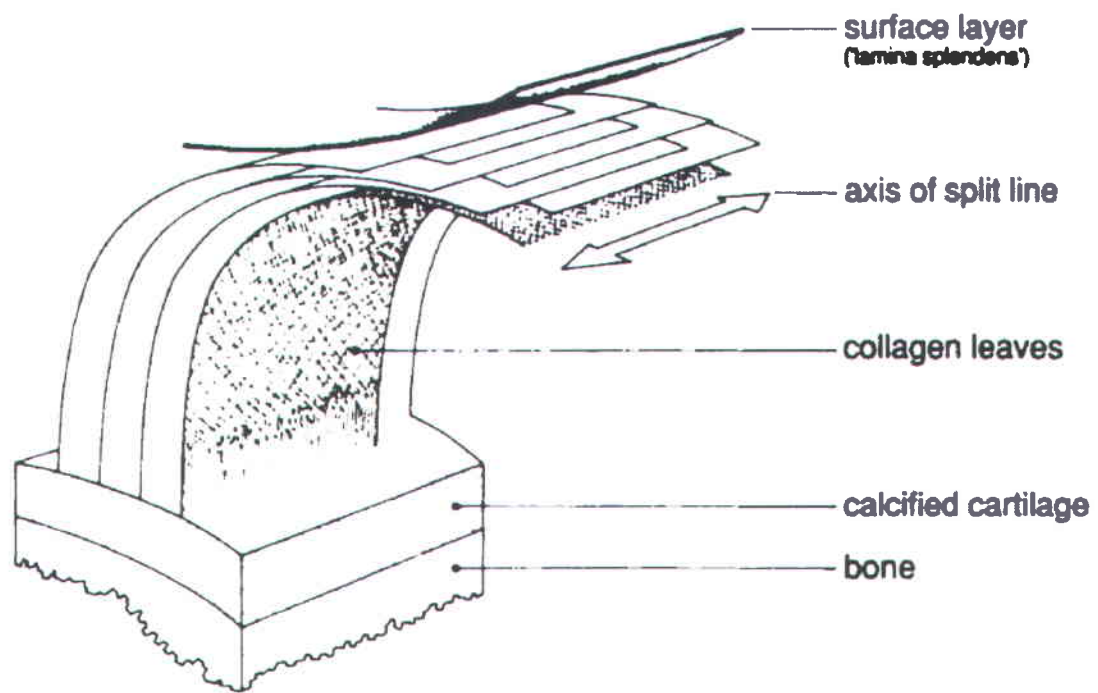


FIGURE 2.2 – Représentation du modèle d'architecture de collagène actuel. Les feuilles de collagène prennent naissance à la jonction de l'os et se courbent à la zone superficielle. [14]

fibrilles sont composées de molécules de tropocollagène qui sont elles-mêmes constituées de trois chaînes de polypeptides, des chaînes α , enroulées entre elles selon une configuration hélicale (voire figure 2.3) [45]. Ces molécules de tropocollagène sont longues d'environ 280 nm et ont un diamètre de 1,5 nm. Elles sont mises bout à bout pour former de longues chaînes et plusieurs de ces chaînes sont regroupées pour former les fibrilles. Il existe un certain espacement entre la tête d'une molécule et la queue d'une autre et, à cause de l'organisation des fibrilles, il y a une périodicité dans la structure des fibrilles sur une longueur de 67 nm. Sur cette longueur, il y a alternance entre les régions où toutes les molécules de tropocollagène se superposent et où certaines présentent des trous. Ceci est dû aux espacements entre les molécules de tropocollagène, comme le montre la figure 2.3.

2.4 Cartilage

Les articulations contiennent du cartilage hyalin, le type de cartilage le plus présent dans le corps humain [46]. Il forme une couche mince sur les os au niveau des articulations et est constitué de trois types de cellules (cellules chondrogéniques, chondroblastes, chondrocytes) qui sont supportées par une matrice extracellulaire. Le collagène constitue 40% du poids sec de la matrice extracellulaire, principalement celui de type II, mais contient également des types IX, X et XI en faible proportion. La matrice extracellulaire du cartilage contient également des protéoglycans, des glycoprotéines, et du fluide extracellulaire.

La matrice de cartilage est riche en agrécans, une large molécule protéoglycane qui est composée d'une protéine au centre autour de laquelle sont attachées, par des liens covalents, des molécules glycosaminoglycanes [47, 48]. De 100 à 200 agrécans sont liés entre eux de manière non covalente, ce qui forme d'énormes composites agrécans de 3 à 4 μm de long. Ces grosses molécules protéoglycane possèdent une grande charge négative, ce qui a pour effet d'attirer les cations, notamment les ions de sodium (Na^+), qui, à leur tour, attirent des molécules d'eau. Ainsi, une grande quantité d'eau se retrouve "emprisonné" dans le cartilage de telle sorte qu'il

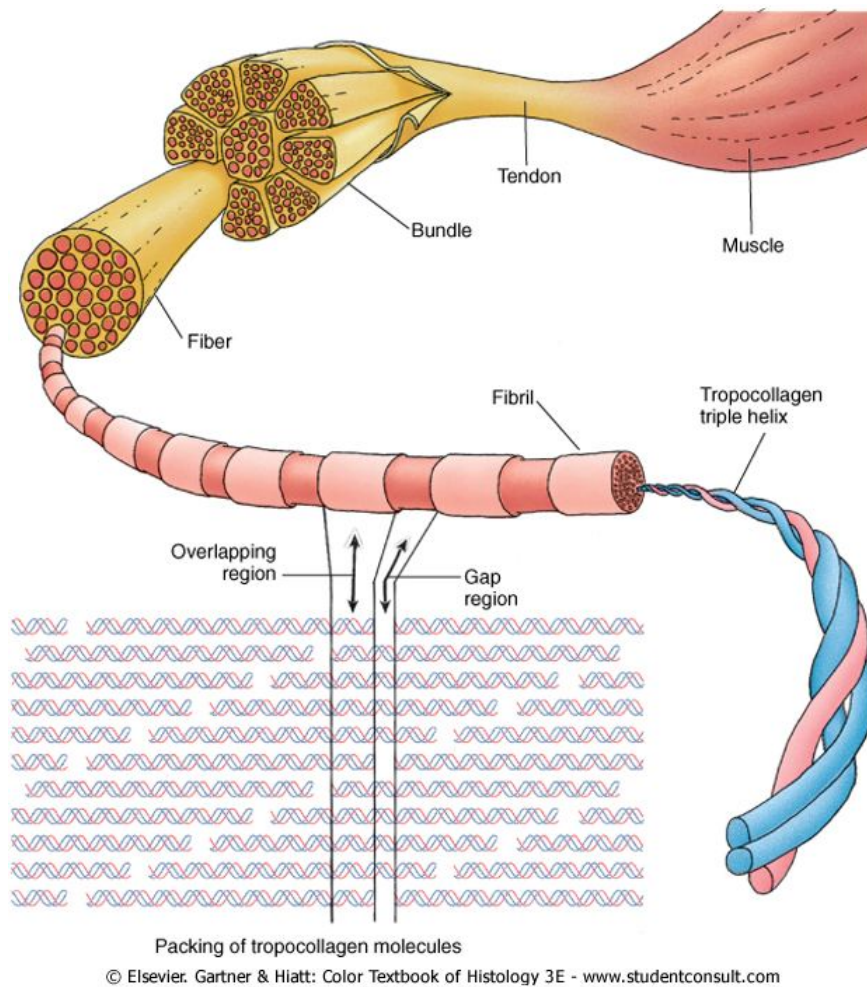


FIGURE 2.3 – Représentation d’une fibre de collagène. Les fibrilles sont formées de molécules de tropocollagène et présentent une structure périodique sur une longueur de 67 nm. [43]

compose 80% du poids humide du cartilage. Ces molécules d'eau permettent ainsi au cartilage de résister à une grande force de compression. Les protéoglycans remplissent les interstices entre les fibres de collagène et leurs chaînes glycosaminoglycanes forment des liens électrostatiques avec le collagène. La structure moléculaire composée de fibres de collagène et de substances fondamentales permet ainsi de résister à la force de tension créée par la pression osmotique.

2.5 Os

L'os est la substance la plus dure du corps humain [49]. Il est composé de cellules entourées d'une matrice extracellulaire calcifiée. Cette matrice extracellulaire calcifiée est composée de fibres, en grande majorité du collagène de type I, et de substances fondamentales. Les cellules contenues dans l'os incluent les cellules ostéoprogénitrices, qui se différencient en ostéoblastes. Ces derniers ont pour fonction de sécréter la matrice extracellulaire et lorsqu'ils s'en retrouvent entourés, deviennent inactifs et se transforment en ostéocytes. L'espace occupé par celle-ci est appelé lacuna. Les ostéoclastes, des cellules provenant de précurseurs de moelle osseuse fusionnés, sont responsables de la résorption et du remodelage osseux.

La matrice extracellulaire est composée d'éléments organiques et inorganiques. Les éléments inorganiques composent 65% du poids sec de l'os et sont constitués essentiellement de calcium et de phosphore. Ils existent principalement sous la forme de cristaux hydroxyapatites ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) mais également sous forme amorphe. Les cristaux hydroxyapatites sont disposés de manière ordonnée le long des fibres de collagène. Les surfaces libres des cristaux sont entourées de substances fondamentales amorphes et les ions en surface des cristaux attirent les molécules de H_2O , ce qui forme des bulles d'hydratation et permet l'échange d'ions avec le fluide extracellulaire. La composante organique principale de l'os est le collagène de type I. En effet, il constitue de 80 à 90 % des composantes organiques de l'os. Il est formé en large regroupement de fibrilles (entre 50 et 70 nm de diamètre) et est hautement cross-linked pour empêcher qu'il soit facilement extrait.

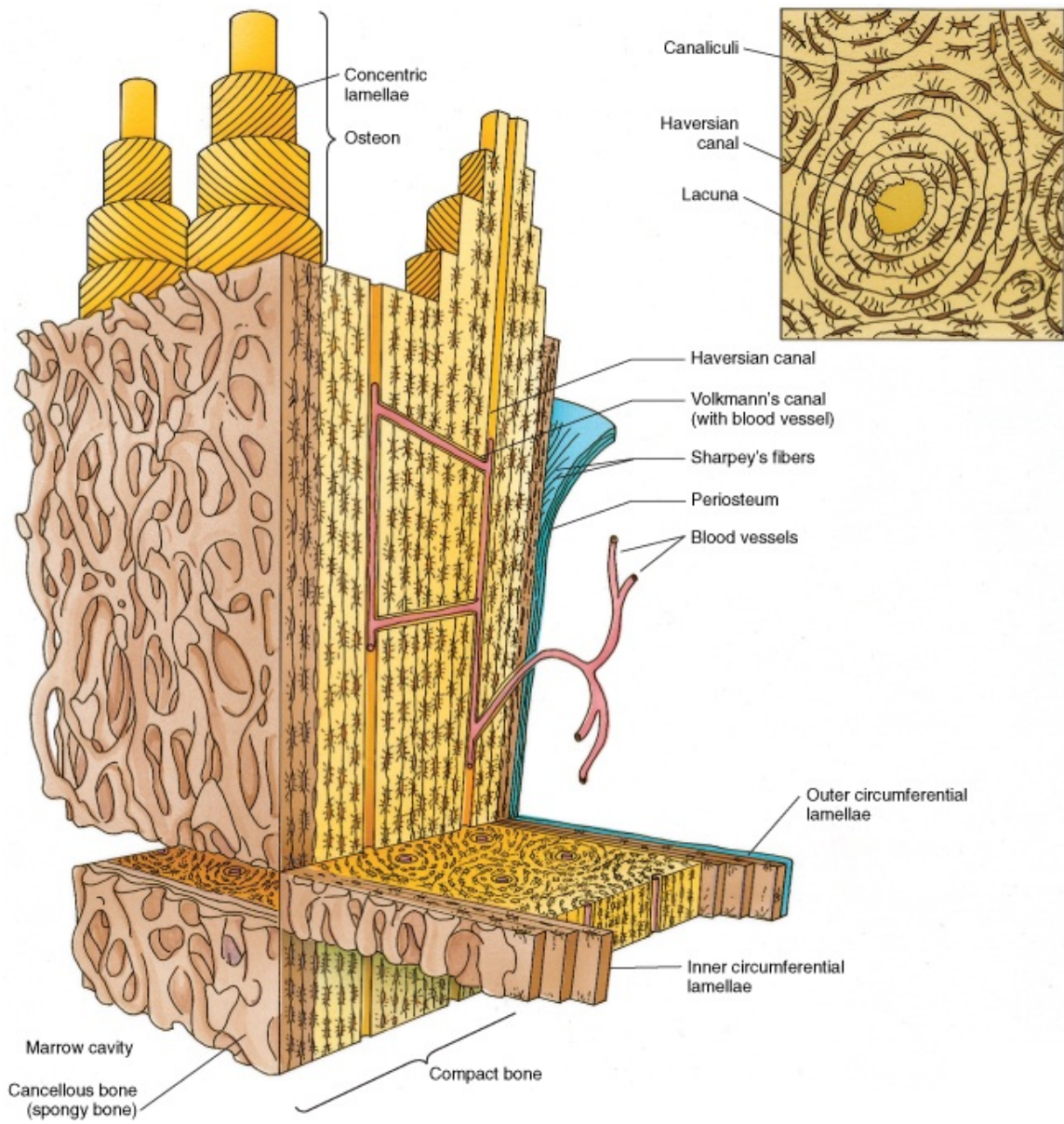
Les os sont classifiés selon leurs formes. On retrouve les os longs, les os courts, les os plats, les os irréguliers et les os sésamoïdes. Lorsque l'on regarde la structure d'un os long, on remarque deux différentes structures de l'os (figure 2.4). La structure compacte sur la surface extérieure de l'os est appelée l'os compact tandis que la région poreuse au centre de l'os, entourant la cavité contenant la moelle osseuse, est appelée l'os spongieux. Il existe deux types d'os, l'os primaire et l'os secondaire. L'os primaire est présent lors de la formation de l'os, durant le développement foetal et la réparation des os. La structure est abondante en ostéocytes ainsi qu'en regroupements irréguliers de fibres de collagène et la quantité de minéraux est moins abondante que dans l'os secondaire. L'os secondaire est composé de lamelles osseuses disposées de manière parallèle l'une à l'autre ou concentrique. Les fibres de collagène sont arrangées pour qu'elles soient parallèles les unes aux autres à l'intérieur des lamelles. De plus, la structure est plus calcifiée, ce qui la rend plus solide que l'os primaire.

2.5.1 Articulation de l'os

Les articulations sont classifiées selon le degré de mouvement disponible entre les os du joint. Les articulations où le mouvement est très minime sont appelées synarthroses tandis que celles dont le mouvement est relativement grand (comme l'articulation du genou) sont classifiées comme étant une articulation diarthrose. La plupart des articulations situées aux extrémités des os sont diarthroses (voire figure 2.5). Ces dernières sont recouvertes d'une couche de cartilage hyalin (cartilage articulaire). Habituellement, des ligaments maintiennent le contact entre les os de l'articulation et celui-ci est scellé avec une capsule d'articulation.

2.6 Ostéo-arthrite

L'ostéo-arthrite est la forme la plus commune de l'arthrite [50]. Elle regroupe plusieurs maladies distinctes dont les symptômes du point de vue biologique, morphologique et clinique sont semblables. La maladie n'affecte pas seulement le cartilage, mais l'articulation entière, incluant l'os sous-chondral, les ligaments, la membrane



© Elsevier. Gartner & Hiatt: Color Textbook of Histology 3E - www.studentconsult.com

FIGURE 2.4 – Illustration de l'os montrant l'os compact et l'os spongieux [49].

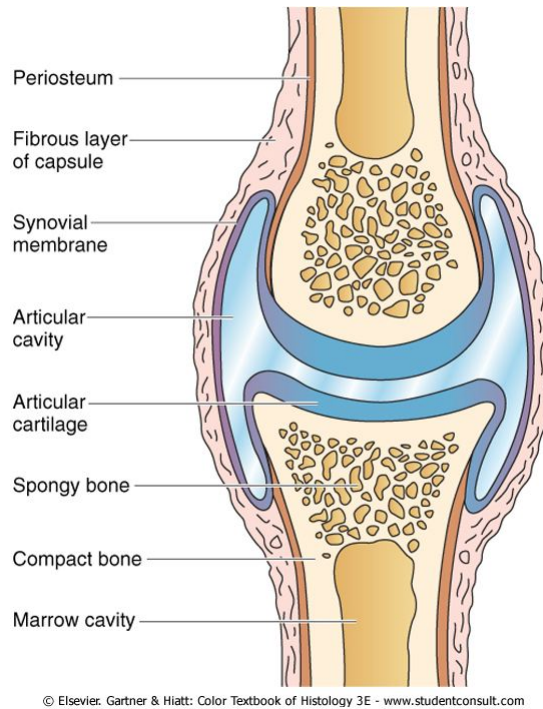


FIGURE 2.5 – Schéma d'une articulation diarthrose entre deux os. [49]

synoviale et les muscles péri-articulaires [51]. Ultimement, il y a dégénération du cartilage articulaire se traduisant par la fibrillation du collagène, des fissures, des ulcérations et la perte complète de l'épaisseur de la surface articulaire. L'ostéo-arthrite est le résultat d'évènements mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre de la dégradation et de la synthèse des chondrocytes, de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral. Bien qu'elle puisse être initiée par plusieurs facteurs, que ce soit génétique, développemental, métabolique et traumatique, l'ostéo-arthrite implique tous les tissus de l'articulations diarthrose. L'ostéo-arthrite se manifeste par des changements morphologiques, biochimiques, moléculaires et biomécaniques dans la matrice et les cellules, ce qui mène à l'"adoucissage", la fibrillation, l'ulcération, la perte de cartilage articulaire, la sclérose et l'éburnation de l'os sous-chondral, des ostéophytes et des kystes sous-chondral. Lorsqu'elle est cliniquement visible, l'ostéo-arthrite est caractérisée par des douleurs au niveau des articulations, des endolorissements, une limitation des mouvements, des crépitations, des épanchements occasionnels et des inflammations à différents degrés sans effet systémique.

2.6.1 Stade précoce de l'ostéo-arthrite

L'ostéo-arthrite est principalement diagnostiquée cliniquement grâce à l'historique du patient, par l'imagerie à rayons X et des douleurs [52]. Étant donné que ces caractéristiques apparaissent seulement à un stade avancé de l'ostéo-arthrite, peu de choses sont connues sur les événements se produisant au début de la maladie. Ainsi, plusieurs des recherches récentes se sont concentrées sur les événements se produisant au début de la progression de la maladie. Les études ont démontré que la totalité du cartilage est touchée lorsque l'articulation est affectée par l'ostéo-arthrite et non seulement des régions localisées. Il a en effet été démontré que des échantillons ayant une légère fibrillation de la surface montrent des changements métaboliques similaires à ceux présents dans une section de cartilage d'apparence normale dans une articulation gravement affectée par l'ostéo-arthrite, indiquant que les changements biochimiques sont présents dans la totalité de l'articulation [52].

Un des événements clairement identifiable dans le développement de l'ostéo-arthrite est l'augmentation du volume (gonflement) du tissu. Ceci est possible si les propriétés de résistance de l'arrangement ultrastructural de collagène sont affectées, empêchant ce dernier de résister à la pression créée par les propriétés osmotiques des aggrécans. Ceci explique que les événements précoces à l'ostéo-arthrite impliquent des processus influant sur l'arrangement ultrastructural de collagène, mais pas nécessairement sur la structure des fibrilles de collagène. Également, il a été démontré qu'il y a perte de protéoglycans dans le tissu à un stade précoce de la maladie pour être remplacés par des chondrocytes (cellules du tissu cartilagineux) dans le but de maintenir l'intégrité tissulaire.

Chapitre 3

Optique non-linéaire

3.1 Microscopie optique non-linéaire

Dans la plupart des interactions entre la lumière et la matière, la polarisation induite dans le matériau est linéairement proportionnelle à la composante électrique du champ électromagnétique de la lumière. Toutefois, lorsque l'intensité appliquée est suffisamment intense, soit une composante électrique élevée, cette approximation n'est plus valide et il faut considérer la polarisation en utilisant une expansion en série de puissance de la force du champ électrique appliqué \vec{E} [53]. La polarisation du milieu peut donc être exprimée comme suit :

$$P = \chi^{(1)} \cdot \vec{E} + \chi^{(2)} : \vec{E} \cdot \vec{E} + \chi^{(3)} : \vec{E} \cdot \vec{E} \cdot \vec{E} \quad (3.1)$$

Les lasers ont permis l'obtention de champs électromagnétiques suffisamment intenses pour permettre l'observation d'effets non-linéaires. La GSH fut d'abord observée en 1961 par Franken et *al.*, soit un an après la découverte du laser à rubis [54], et depuis, la possibilité d'utiliser cet effet non-linéaire pour imager les matériaux fut également démontrée [55]. Plus tard, il fut démontré qu'il est possible d'obtenir un contraste d'imagerie du signal GSH dans les tissus biologiques [56], ce qui ouvra la porte au développement de techniques de microscopie optique non-linéaire. La microscopie à génération de seconde harmonique (GSH), la microscopie CARS ("Co-

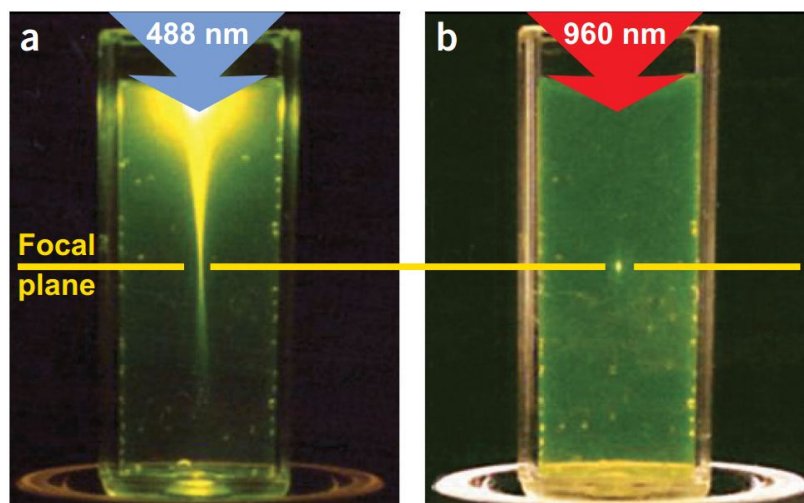


FIGURE 3.1 – Localisation de la fluorescence. (a) Signal émis par la fluorescence à un photon. (b) Signal émis par la fluorescence à deux photons, un processus non-linéaire de la conversion de la lumière [30].

herent Anti-Stokes Raman Scattering") et la microscopie à génération de troisième harmonique (GTH) sont parmi les plus utilisées. Ces trois techniques de microscopie utilisent des lasers pulsés dont la durée des impulsions va de l'ordre de la centaine de femtosecondes à quelques picosecondes. Ceux-ci permettent d'obtenir une puissance crête suffisamment élevée pour la génération d'effets non-linéaires tout en gardant une puissance moyenne basse, ce qui prévient l'endommagement des tissus biologiques via des effets thermiques [57].

Contrairement à plusieurs techniques de microscopie à balayage laser tel que la microscopie à fluorescence à un photon, la microscopie optique non-linéaire offre une très bonne résolution. En effet, étant donné la grande puissance nécessaire pour produire les effets non-linéaires, ceux-ci sont générés seulement au plan focal de l'objectif, là où l'intensité est la plus élevée (voire figure 3.1b). Toutefois, dans le cas de la fluorescence à un photon, le signal est généré sur toute l'épaisseur de l'échantillon, produisant ainsi beaucoup de signal provenant d'éléments à l'extérieur du plan focal (voir figure 3.1a) et diminuant ainsi le contraste de l'image. De plus, le signal produit par la plupart des techniques de microscopie optique non-linéaire provient d'une propriété intrinsèque du matériau, son utilisation ne nécessite donc pas de marquage ou de coloration pour obtenir un contraste d'imagerie, rendant possible son utilisation *in vivo*.

3.1.1 Microscopie à Génération de Seconde Harmonique

La génération de seconde harmonique (GSH) est un processus non-linéaire se produisant seulement dans des milieux non centrosymétriques [54]. Pour cette technique de microscopie, un laser à impulsion de fréquence centrale ν est focalisé dans un échantillon et l'interaction non-linéaire résulte en la génération de photons dont la fréquence est le double de la fréquence laser (2ν), soit la moitié de la longueur d'onde, comme le montre le diagramme de Jablonski à la figure 3.2(a). Étant donné que la génération de seconde harmonique n'implique pas d'absorption d'énergie (si l'intensité n'est pas trop élevée), il ne se produit pas de dommages thermiques ou de photoblanchiment si la longueur d'onde du faisceau pompe est à l'extérieur de la bande d'absorption [58]. Il est très facile de discriminer le signal de seconde harmonique du faisceau pompe ou d'un signal d'autofluorescence puisqu'il possède une longueur d'onde qui est exactement la moitié de la longueur d'onde du faisceau pompe. La microscopie GSH ne peut être utilisée que dans un milieu ne possédant pas de centre d'inversion, permettant son utilisation pour imager des milieux non centrosymétriques, des interfaces ou des environnements dont la non centrosymétrie a été induite par un champ électrique [58]. Cette condition à la production du signal peut être un avantage puisqu'il permet de cibler un élément de l'échantillon étudié tel que le collagène, comme il peut être un désavantage en rendant son utilisation peu versatile.

3.1.2 Microscopie à Génération de Troisième Harmonique

La génération de troisième harmonique (GTH) est un processus non-linéaire où le faisceau pompe, de fréquence ν , génère un signal cohérent d'une fréquence 3ν [59] (voir figure 3.2(c)). Tout comme la génération de seconde harmonique, ce processus n'implique pas d'absorption de photons et donc pas de photoblanchiment associé à une exposition trop prolongée. Toutefois, contrairement à la GSH, un milieu non centrosymétrique n'est pas nécessaire pour obtenir un signal. Le signal de troisième harmonique peut être obtenu à partir d'interfaces et de particules dont la taille avoisine la grosseur de la tache focale [60]. La microscopie GTH est d'ailleurs principalement

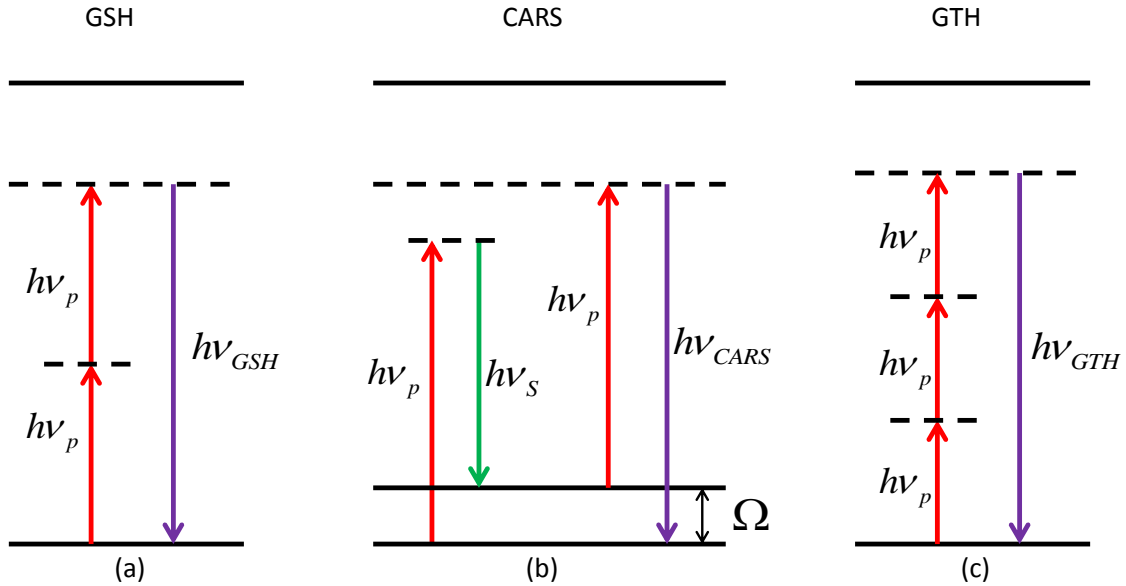


FIGURE 3.2 – Diagramme de Jablonski (a) de la GSH (b) de la génération de signal CARS et (c) de la GTH.

utilisée pour imager les corps gras tel que les membranes cellulaires [60, 61] ainsi que les neurones et les structures sous-cellulaires [62].

3.1.3 Microscopie CARS

La microscopie CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) est un processus optique non-linéaire résonant du troisième ordre $\chi^{(3)}$ qui permet l'imagerie avec un contraste spectroscopique basé sur l'effet Raman. Dans ce processus, deux faisceaux laser de fréquence ν_p et ν_S génèrent un signal de fréquence $2\nu_p - \nu_S$. Le milieu est composé de molécules ayant une fréquence vibrationnel Ω observée dans le spectre Raman de telle sorte que $\nu_p - \nu_S = \Omega$. Ainsi, en stimulant le mode vibrationnel de la molécule à la fréquence de Raman Ω , il est possible d'obtenir un signal Anti-Stokes à une fréquence $\nu_{CARS} = 2\nu_p - \nu_S$ (figure 3.2(b)) générée seulement par une molécule spécifique, créant le contraste d'imagerie [63]. Un des avantages de la microscopie CARS est qu'il ne requiert pas d'agents fluorescents, qui sont sujets au photoblanchiment, étant donné que le contraste vibrationnel Raman est inhérent à l'espèce moléculaire présent dans la structure biologique imagée [64]. De plus, la microscopie CARS est

un processus cohérent et offre donc une meilleure sensibilité que le processus Raman spontané. Étant donné que le signal CARS provient d'un processus non-linéaire, il affiche une forte dépendance à l'intensité et le signal est généré seulement dans le volume focal du faisceau laser, permettant d'imager des sections d'échantillons épais et d'obtenir des images en trois dimensions de haute résolution (tout comme la GSH et la GTH d'ailleurs). Également, il peut offrir une grande sélectivité chimique étant donné qu'il est possible de changer le mode Raman à imager en modifiant la longueur d'onde du faisceau pompe ou Stokes. Finalement, le signal CARS peut être détecté en présence de signal d'autofluorescence puisque la fréquence du signal CARS est très bien définie. Toutefois, la problématique majeure avec la microscopie CARS est la contribution non-résonnante du signal qui peut diminuer le contraste d'imagerie. Ce dernier provient de deux sources, la contribution électronique non résonnante qui est présente même lorsque les conditions de résonance Raman ne sont pas rencontrées et la contribution électronique et Raman du milieu environnant. Pour ce type de microscopie, il est préférable d'utiliser des impulsions picosecondes plutôt que des impulsions femtosecondes puisqu'il permet d'obtenir un meilleur ratio de signal sur bruit en ayant une largeur spectrale équivalente à celle d'un mode vibrationnel de Raman. La popularité de ce type de microscopie ne cesse d'augmenter depuis plusieurs années [65–70] et les principales applications biologiques pour laquelle il est utilisé est l'imagerie de la myéline [71, 72] et des cellules [65, 68, 69, 73]. Ceux-ci offrent en effet un bon contraste d'imagerie étant donné la présence de liens C-H qui produit un fort signal CARS.

3.2 Génération de Seconde Harmonique (GSH)

3.2.1 Introduction

La génération de seconde harmonique est un processus optique non-linéaire qui se produit lorsqu'un champ électromagnétique suffisamment intense interagit avec un milieu non centrosymétrique possédant une susceptibilité non-linéaire $\chi^{(2)}$ [74]. Il y

a ainsi une modification des propriétés optiques du matériau et il y a conversion de deux photons en un seul photon ayant le double de la fréquence originale.

Lorsqu'un matériau est soumis à un champ électrique intense, la polarisation induite peut être décrite par l'équation 3.1 où $\chi^{(1)}$ est la susceptibilité linéaire et $\chi^{(2)}$ et $\chi^{(3)}$ sont respectivement la susceptibilité optique non-linéaire du second et troisième ordre. Par mesure de simplicité, nous posons $\tilde{P}^{(2)}(t) = \chi^{(2)}\tilde{E}^2(t)$ et $\tilde{P}^{(3)}(t) = \chi^{(3)}\tilde{E}^3(t)$. La composante électrique du faisceau laser peut être représentée comme

$$\tilde{E}(t) = Ee^{-i\omega t} + c.c. \quad (3.2)$$

et si la susceptibilité optique non-linéaire $\chi^{(2)}$ est non nulle, on retrouve une polarisation induite donnée par

$$\tilde{P}^{(2)}(t) = \chi^{(2)}\tilde{E}^2(t) = 2\epsilon_0\chi^{(2)}EE^* + (\epsilon_0\chi^{(2)}E^2e^{-i2\omega t} + c.c.). \quad (3.3)$$

On remarque que cette dernière équation contient un terme indépendant de la fréquence (la rectification optique) ainsi qu'un terme apportant une contribution à une fréquence 2ω (la contribution non-linéaire). Ainsi, ce second terme peut mener à la génération de radiation dont la fréquence est le double de la fréquence d'origine. Comme le montre les figures 3.2(a) et 3.3, lors de la génération de seconde harmonique, deux photons de fréquence ω sont annihilés et un photon de fréquence 2ω est créé simultanément.

3.2.2 Oscillateur anharmonique

Le processus de génération de seconde harmonique se produit seulement dans des milieux non centrosymétriques. En effet, si l'on représente la position d'un électron dans le modèle de Lorentz comme suit :

$$\ddot{\tilde{x}} + 2\gamma\dot{\tilde{x}} + \omega_0^2\tilde{x} + a\tilde{x}^2 = -e\tilde{E}(t)/m \quad (3.4)$$

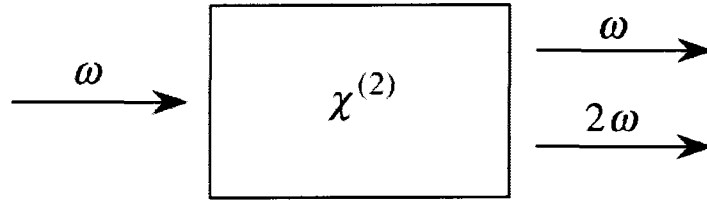


FIGURE 3.3 – Géométrie de la seconde harmonique. Un faisceau de fréquence ω passe à travers un milieu possédant une susceptibilité non-linéaire $\chi^{(2)}$ et le faisceau de fréquence ω ainsi qu'un faisceau ayant le double de la fréquence (2ω) en ressort. [74]

où $\tilde{E}(t)$ est le champ électrique appliqué sur un électron de charge $-e$. Ainsi, dans cette équation, nous avons la force d'amortissement qui est donnée par $-2m\gamma\dot{\tilde{x}}$ et la force de rappel est donnée par

$$\tilde{F}_{rappel} = -m\omega_0^2\tilde{x} - ma\tilde{x}^2. \quad (3.5)$$

L'énergie potentielle correspondante à cette force de rappel est donné par :

$$U(\tilde{x}) = -\int \tilde{F}_{rappel} d\tilde{x} = \frac{1}{2}m\omega_0^2\tilde{x}^2 + \frac{1}{3}ma\tilde{x}^3 \quad (3.6)$$

Ce potentiel d'énergie correspond à la parabole présente à la figure 3.4. Le premier terme du potentiel correspond au potentiel harmonique (forme de parabole) tandis que le second terme correspond à la correction anharmonique. Ce potentiel correspond à celui d'un milieu non centrosymétrique en raison de l'absence d'un centre d'inversion par rapport à $x = 0$.

Si l'on considère le champ électrique de la forme :

$$\tilde{E}(t) = E_1e^{-i\omega_1t} + E_2e^{-i\omega_2t} + c.c. \quad (3.7)$$

aucune solution générale de l'équation 3.4 n'est connue pour un champ électrique de cette forme. Toutefois, en utilisant une procédure semblable à la théorie de pertur-

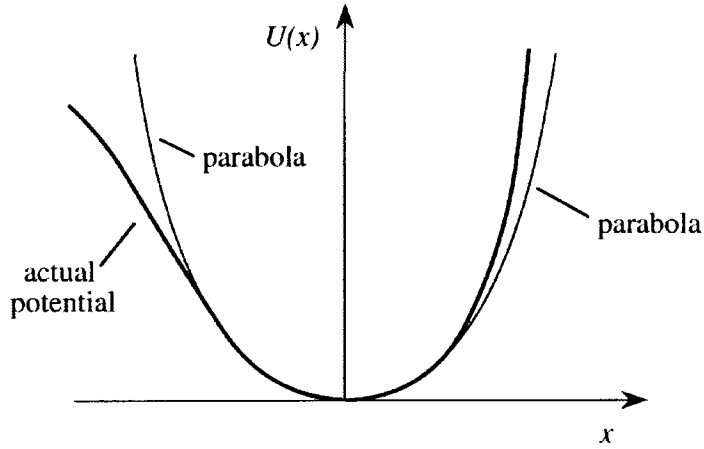


FIGURE 3.4 – Fonction du potentiel d'énergie pour un milieu non centrosymétrique. [74]

bation Rayleigh-Schrödinger en mécanique quantique, il est possible d'obtenir une solution. En effet, en appliquant cette méthode, on retrouve les équations du mouvement pour les différentes contributions (du premier au troisième ordre) :

$$\ddot{\tilde{x}}^{(1)} + 2\gamma\dot{\tilde{x}}^{(1)} + \omega_0^2\tilde{x}^{(1)} = -e\tilde{E}(t)/m \quad (3.8)$$

$$\ddot{\tilde{x}}^{(2)} + 2\gamma\dot{\tilde{x}}^{(2)} + \omega_0^2\tilde{x}^{(2)} + a[\tilde{x}^{(1)}]^2 = 0 \quad (3.9)$$

$$\ddot{\tilde{x}}^{(3)} + 2\gamma\dot{\tilde{x}}^{(3)} + \omega_0^2\tilde{x}^{(3)} + 2a\tilde{x}^{(1)}\tilde{x}^{(2)} = 0 \quad (3.10)$$

La contribution de la polarisation linéaire correspondant à la solution est donnée par :

$$P^{(1)}(\omega_j) = \epsilon_0\chi^{(1)}(\omega_j)E(\omega_j) = -Nex^{(1)}(\omega_j) \quad (3.11)$$

tandis que la susceptibilité linéaire correspondante est donnée par

$$\chi^{(1)}(\omega_j) = \frac{N(e^3/m^2)}{\epsilon_0 D(\omega_j)}. \quad (3.12)$$

Dans le cas de la génération de seconde harmonique, la polarisation non-linéaire

oscillant à une fréquence $2\omega_1$ est donnée par

$$P^{(2)}(2\omega_1) = \epsilon_0 \chi^{(2)}(2\omega_1, \omega_1, \omega_1) E(2\omega_1)^2 = -Nex^{(2)}(2\omega_1) \quad (3.13)$$

ce qui nous donne la susceptibilité non-linéaire suivante

$$\chi^{(2)}(2\omega_1, \omega_1, \omega_1) = \frac{\epsilon_0^2 ma}{N^2 e^3} \chi^{(1)}(2\omega_1) [\chi^{(1)}(\omega_1)]^2. \quad (3.14)$$

On voit ainsi qu'il est possible d'obtenir une susceptibilité non-linéaire du second ordre du champ électrique appliqué contribuant à la polarisation dans un milieu non centrosymétrique.

Toutefois, si l'on refait le même exercice dans un milieu centrosymétrique, on retrouve la force de rappel suivante

$$\tilde{F}_{rappel} = -m\omega_0^2 \tilde{x} + mb\tilde{x}^3. \quad (3.15)$$

Le potentiel associé est le suivant :

$$U(\tilde{x}) = - \int \tilde{F}_{rappel} d\tilde{x} = \frac{1}{2} m\omega_0^2 \tilde{x}^2 - \frac{1}{4} mb\tilde{x}^4. \quad (3.16)$$

qui est un potentiel symétrique comme présenté à la figure 3.5. En appliquant un champ de la forme

$$\tilde{E}(t) = E_1 e^{-i\omega_1 t} + E_2 e^{-i\omega_2 t} + E_3 e^{-i\omega_3 t} + c.c. \quad (3.17)$$

sur des électrons dont le déplacement à partir de l'équilibre est donné par

$$\ddot{\tilde{r}} + 2\gamma\dot{\tilde{r}} + \omega_0^2 \tilde{r} - b(\tilde{r} \cdot \tilde{r})\tilde{r} = -e\tilde{E}(t)/m \quad (3.18)$$

on peut trouver une solution en appliquant la méthode Rayleigh-Schrödinger comme dans le cas d'un milieu non-centrosymétrique. Avec cette méthode, on retrouve les

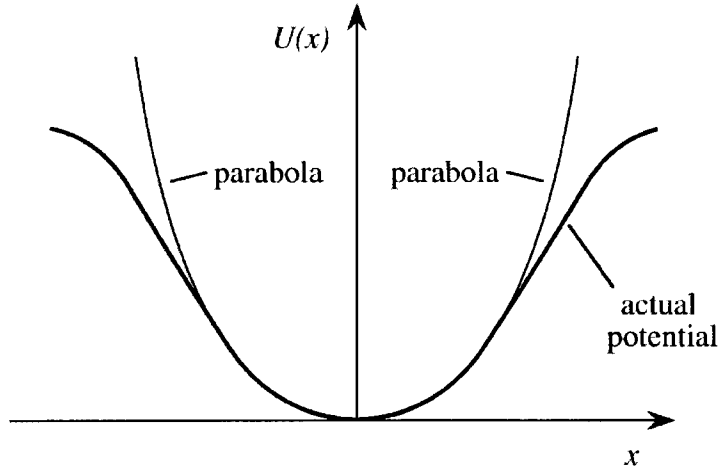


FIGURE 3.5 – Fonction du potentiel d'énergie pour un milieu centrosymétrique. [74]

équations du déplacement présentées comme suit :

$$\ddot{\tilde{r}}^{(1)} + 2\gamma\dot{\tilde{r}}^{(1)} + \omega_0^2\tilde{r}^{(1)} = -e\tilde{E}(t)/m. \quad (3.19)$$

$$\ddot{\tilde{r}}^{(2)} + 2\gamma\dot{\tilde{r}}^{(2)} + \omega_0^2\tilde{r}^{(2)} = 0. \quad (3.20)$$

$$\ddot{\tilde{r}}^{(3)} + 2\gamma\dot{\tilde{r}}^{(3)} + \omega_0^2\tilde{r}^{(3)} - b(\tilde{r}^{(1)} \cdot \tilde{r}^{(1)})\tilde{r}^{(1)} = 0. \quad (3.21)$$

Étant donné que le déplacement du second ordre décrit par l'équation 3.20 est amorti, mais pas entraîné, la solution en régime permanent disparaît. Ainsi,

$$\tilde{r}^{(2)} = 0 \quad (3.22)$$

et il ne peut y avoir de génération de seconde harmonique dans un milieu centrosymétrique.

3.2.3 Description de la génération de seconde harmonique en utilisant les équations d'ondes

Pour décrire le processus de seconde harmonique utilisant les équations d'onde, nous allons supposer que le milieu est sans perte à la fréquence fondamentale ω_1 et

à la fréquence de seconde harmonique $\omega_2 = 2\omega_1$ [75]. Avec le champ électrique total donné par

$$\tilde{E}(z, t) = \tilde{E}_1(z, t) + \tilde{E}_2(z, t) \quad (3.23)$$

$$\tilde{E}_j(z, t) = A_j(z)e^{ik_j z}e^{-i\omega_j t} + c.c. \quad (3.24)$$

où

$$k_j = n_j\omega_j/c \quad (3.25)$$

$$n_j = [\epsilon^{(1)}(\omega_j)]^{1/2}. \quad (3.26)$$

L'équation d'onde est donnée par

$$\frac{\partial^2 \tilde{E}_j}{\partial z^2} - \frac{\epsilon^{(1)}(\omega_j)}{c^2} \frac{\partial^2 \tilde{E}_j}{\partial t^2} = \frac{1}{\epsilon_0 c^2} \frac{\partial^2 \tilde{P}_j}{\partial t^2} \quad (3.27)$$

dont obéissent toutes les composantes de fréquences du champ électrique.

La polarisation non-linéaire est représentée par :

$$\tilde{P}^{NL}(z, t) = \tilde{P}_1(z, t) + \tilde{P}_2(z, t) \quad (3.28)$$

où

$$\tilde{P}_j(z, t) = P_j(z)e^{-i\omega_j t} + c.c. \quad (3.29)$$

avec $j = 1, 2$. Les expressions de l'amplitude de la polarisation du faisceau pompe et de la seconde harmonique sont données respectivement par

$$P_1(z) = 4\epsilon_0 d_{\text{eff}} E_2 E_1^* = 4\epsilon_0 d_{\text{eff}} A_2 A_1^* e^{i(k_2 - k_1)z} \quad (3.30)$$

et

$$P_2(z) = 2\epsilon_0 d_{\text{eff}} E_1^2 = 2\epsilon_0 d_{\text{eff}} A_1^2 e^{2ik_1 z}. \quad (3.31)$$

En substituant les équations 3.30 et 3.31 dans l'équation d'onde 3.27 et en dérivant les équations d'amplitude couplées pour la génération de somme de fréquences, on

obtient :

$$\frac{dA_1}{dz} = \frac{2i\omega_1^2 d_{\text{eff}}}{k_1 c^2} A_2 A_1^* e^{-i\Delta k z} \quad (3.32)$$

et

$$\frac{dA_2}{dz} = \frac{i\omega_2^2 d_{\text{eff}}}{k_2 c^2} A_1^2 e^{i\Delta k z} \quad (3.33)$$

où

$$\Delta k = 2k_1 - k_2. \quad (3.34)$$

Par mesure de simplicité, nous exprimons l'amplitude du champ (qui est complexe et varie lentement) comme suit :

$$A_1 = \left(\frac{I}{2n_1 \epsilon_0 c} \right)^{1/2} u_1 e^{i\phi_1} \quad (3.35)$$

et

$$A_2 = \left(\frac{I}{2n_2 \epsilon_0 c} \right)^{1/2} u_2 e^{i\phi_2} \quad (3.36)$$

avec l'intensité totale des deux ondes qui est donnée par :

$$I = I_1 + I_2 \quad (3.37)$$

dont chaque terme d'intensité est donné par :

$$I_j = 2n_j \epsilon_0 c |A_j|^2. \quad (3.38)$$

Étant donné que l'intensité du champ ne varie pas avec la propagation, l'amplitude des champs normalisé u_1 et u_2 est définie de tel sorte que $u_1^2 + u_2^2$ est également conservé et satisfait la relation

$$u_1(z)^2 + u_2(z)^2 = 1 \quad (3.39)$$

Nous introduisons le paramètre de la distance normalisée $\zeta = z/l$ où

$$l = \left(\frac{2n_1^2 n_2}{\epsilon_0 c I} \right)^{1/2} \frac{c}{2\omega_1 d_{\text{eff}}}, \quad (3.40)$$

la phase relative des champs interagissants

$$\theta = 2\phi_1 - \phi_2 + \Delta kz \quad (3.41)$$

et le paramètre d'accord de phase normalisé

$$\Delta s = \Delta kl. \quad (3.42)$$

En substituant les quantités u_j , ϕ_j , ζ et Δs introduites précédemment dans les équations (3.32) et (3.33), nous obtenons, après plusieurs réductions, les équations couplées des trois quantités réelles u_1 , u_2 et θ :

$$\frac{du_1}{d\zeta} = u_1 u_2 \sin \theta, \quad (3.43)$$

$$\frac{du_2}{d\zeta} = -u_1^2 \sin \theta, \quad (3.44)$$

$$\frac{d\theta}{d\zeta} = \Delta s + \frac{\cos \theta}{\sin \theta} \frac{d}{d\zeta} (\ln u_1^2 u_2). \quad (3.45)$$

Par mesure de simplicité, nous assumons un accord de phase parfait, c'est-à-dire que $\Delta k = \Delta s = 0$. Nous pouvons donc réécrire l'équation précédente comme suit :

$$\frac{d}{d\zeta} \ln (u_1^2 u_2 \cos \theta) = 0. \quad (3.46)$$

Étant donné que $\ln (u_1^2 u_2 \cos \theta)$ est une quantité constante, que nous définirons comme Γ , la solution à l'équation précédente est donnée par

$$u_1^2 u_2 \cos \theta = \Gamma. \quad (3.47)$$

Γ est indépendant de la distance de propagation ζ et ainsi est déterminé seulement par les valeurs connues de u_1 , u_2 et θ à l'entrée du milieu non-linéaire.

En utilisant l'équation précédente et l'équation (3.39), nous pouvons découpler les

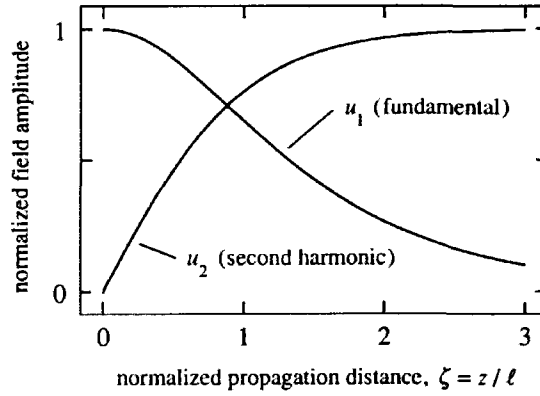


FIGURE 3.6 – Variation spatiale de l’amplitude du champ de l’onde fondamentale et de sa seconde harmonique dans le cas d’un accord de phase parfait à la condition de frontière $u_2(0) = 0$ [75].

équations (3.43) à (3.45). Ainsi, l’équation (3.44) devient

$$\frac{du_2^2}{d\zeta} = \pm 2 \left[(1 - u_2^2)^2 u_2^2 - \Gamma^2 \right]^{1/2}. \quad (3.48)$$

Ceci est l’équation de l’amplitude du champ de la seconde harmonique. La solution dépend des conditions initiales.

Si l’on prend par exemple les conditions initiales où il n’y a pas de lumière de seconde harmonique incidente ($u_1(0) = 1$ et $u_2(0) = 0$), on obtient la solution suivante :

$$u_2(\zeta) = \tanh \zeta \quad (3.49)$$

tandis que la solution pour l’onde fondamentale est donnée par

$$u_1(\zeta) = \operatorname{sech} \zeta \quad (3.50)$$

Ce qui nous donne les courbes présentées à la figure 3.6. Toutefois, en microscopie optique non-linéaire, très peu de signal de seconde harmonique est produit et on peut considérer que u_1 reste constant lors de la propagation dans le tissus biologique.

3.2.4 Accord de phase

L'accord de phase est un paramètre essentiel à la génération de la seconde harmonique. En effet, lorsqu'il y a génération de signal de seconde harmonique dans le volume focale, s'il n'y a pas un accord entre la phase des ondes électromagnétiques générées, il se produit de l'interférence destructive entre ceux-ci et aucun signal n'est généré. Dans le cas de la génération de seconde harmonique, l'accord de phase est donné par

$$\Delta k = 2k_1 - k_2 \quad (3.51)$$

et l'intensité du signal produit, en utilisant l'approximation où l'intensité du faisceau laser reste constant, est donnée par

$$I_2 = I_2^{(max)} \left[\frac{\sin(\Delta k L/2)}{(\Delta k L/2)} \right]^2. \quad (3.52)$$

Si une condition d'accord de phase parfaite est rencontrée ($\Delta k = 0$), le signal qui peut être produit est maximum. Toutefois, si ce n'est pas le cas, il y a décroissance rapide de l'intensité du signal maximum qui peut être produit (voire figure 3.7). Également, étant donné que l'indice de réfraction d'un milieu dépend de la longueur d'onde du faisceau laser, pour que l'accord de phase soit parfait, il est nécessaire de satisfaire la condition suivante

$$\frac{2n_1\omega_1}{c} = \frac{n_2\omega_2}{c}. \quad (3.53)$$

Toutefois, la conservation de l'énergie dicte que

$$2\omega_1 = \omega_2, \quad (3.54)$$

ce qui ne peut être satisfait en même temps que la condition présentée à l'équation 3.53. En effet, dans le cas de la seconde harmonique, ceci nécessiterais que

$$n(\omega_1) = n(2\omega_1) \quad (3.55)$$

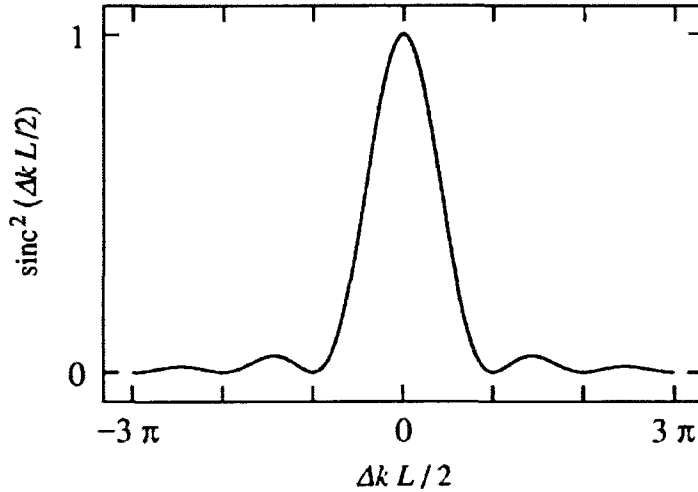


FIGURE 3.7 – Graphique représentant l'accord de phase des vecteurs d'onde dans le cas de la génération de seconde harmonique. [75]

ce qui n'est pas possible puisque $n(\omega)$ change avec ω . Dans les tissus biologiques, il est presque impossible d'obtenir un accord de phase parfait étant donné les conditions spécifiques pour l'obtenir. Toutefois, pour des applications où la génération du maximum de signal de seconde harmonique est requise, un accord de phase parfait peut être généré en utilisant des cristaux biréfringents.

En considérant le cas où $\Delta k = 0$, à mesure qu'un faisceau se propage à travers un milieu non centrosymétrique, l'amplitude du signal augmente linéairement avec z et, en conséquence, l'intensité augmente quadratiquement avec z . D'un point de vue microscopique, lorsque la condition d'accord de phase parfait est satisfaite, les dipôles atomiques individuels qui constituent le matériau sont orientés adéquatement pour que les champs émis par les dipôles soient additionnés de manière cohérente dans la direction de la propagation du faisceau laser. La puissance du signal émis est donc proportionnelle au carré du nombre d'atome. Si la condition d'accord de phase parfait n'est pas satisfaite, l'émission de signal est moins élevée. Cette diminution du signal est proportionnelle à $\text{sinc}^2(\Delta k L / 2)$ qui est représentée graphiquement à la figure 3.7 où L est la distance dans le milieu où il y a génération de seconde harmonique. Ainsi, on voit que l'efficacité de la génération de seconde harmonique

diminue lorsque $|\Delta k|L$ augmente. Lorsque L est plus grand qu'approximativement $1/\Delta k$, le champ électromagnétique de seconde harmonique produit devient déphasé par rapport à celui du faisceau pompe et il se produit de l'interférence destructive. Pour cette raison, la longueur pour lequel l'accord de phase est toujours valable dans un milieu uniforme, appelée longueur de cohérence, est définie par

$$L_{coh} = 2/\Delta k. \quad (3.56)$$

Donc, dans le cas où le signal est produit sur une distance plus grande que la longueur de cohérence, il y a interférence destructive et le signal généré est faible. Toutefois, si le signal est généré sur une plus petite distance que la longueur de cohérence, les champs électromagnétiques générés seront additionnés de manière constructive sur toute la longueur mais l'intensité maximale de seconde harmonique qui puisse être produit ne sera pas atteinte.

3.2.5 Génération de seconde harmonique dans les fibrilles de collagène

La polarisation induite par un champ électrique E est donnée par l'équation 3.1 où $\chi^{(1)}$ est la polarisabilité de la matrice et $\chi^{(2)}$ et $\chi^{(3)}$ sont les matrices d'hyperpolarisabilité du premier et du second ordre. En assumant une symétrie cylindrique et de Kleinmann [74], l'hyperpolarisabilité de premier ordre se réduit à deux éléments qui sont représentés comme suit :

$$P_{2\omega,y} = \chi_{yy}^{(2)} E_{\omega,y}^2 + \chi_{yx}^{(2)} E_{\omega,x}^2 \quad (3.57)$$

$$P_{2\omega,x} = \chi_{yx}^{(2)} E_{\omega,x} E_{\omega,y} \quad (3.58)$$

où $E_{\omega,x}$ et $E_{\omega,y}$ sont les champs électriques fondamentales polarisés dans la direction x et y respectivement (La direction z étant la direction de propagation du champ électrique) [26].

Ainsi, un faisceau laser polarisé linéairement selon un angle Φ par rapport à l'axe

de la fibrille produit un signal de seconde harmonique dont l'intensité est donnée par :

$$I_y(\Phi) = I_p [\phi \cos^2 \Phi + \sin^2 \Phi]^2 \quad (3.59)$$

$$I_x(\Phi) = I_p [\sin 2\Phi]^2 \quad (3.60)$$

où I_p est l'intensité totale mesurée avec un faisceau polarisé perpendiculairement et le ratio $\phi = \left(\chi_{yyy}^{(2)} / \chi_{yxx}^{(2)} \right)$ est une mesure de l'effet de la polarisation axiale de la fibrille.

L'angle entre l'orientation de la polarisation du faisceau laser et l'axe de la fibrille détermine l'intensité du signal produit. Lorsque la direction de propagation du faisceau laser incident est parallèle à l'axe de la fibrille, aucun signal de seconde harmonique n'est généré, peu importe la polarisation [28]. Ceci est causé par la symétrie cylindrique de la fibrille (C_∞) qui, le long des fibrilles, crée un arrangement centrosymétrique à l'échelle du volume focale pour toutes polarisations. Toutefois, toute autre orientation du faisceau laser crée un arrangement non centrosymétrique qui produit un signal de seconde harmonique. Lorsque la polarisation du faisceau laser est parallèle à l'axe des fibrilles, le signal GSH produit est maximum et lorsque la polarisation du faisceau laser est perpendiculaire à l'axe de la fibrille, le signal est plus faible [26].

Chapitre 4

Montage expérimental

4.1 Source laser

Pour effectuer les expériences, un laser à impulsion Titane :Saphir (Tsunami, Spectra Physics, Santa Clara, USA) qui peut générer des impulsions d'environ 150 femtosecondes avec un taux de répétition d'environ 80 MHz a été utilisé. Pour les besoins de l'expérience, la longueur d'onde centrale du faisceau laser est ajustée à 810 nm. À la sortie du laser, une lame demi-onde et un prisme de Glan-Thompson sont utilisés pour ajuster la puissance à environ 50 mW. Cette puissance permet d'obtenir suffisamment de signal de seconde harmonique sans toutefois endommager l'échantillon. Pour augmenter la résolution spatiale du microscope, la taille du point focale doit être minimisée par l'utilisation de toute l'ouverture numérique de l'objectif du microscope. Pour ce faire, le diamètre du faisceau laser est augmenté en utilisant deux lentilles ($f_{L1}=60$ mm et $f_{L2}=175$ mm) séparées de 235 mm. Devant l'entrée du microscope, une lame demi-onde est installée pour changer l'angle de la polarisation du faisceau laser qui est focalisé sur l'échantillon et permettre ainsi de faire des mesures de signal GSH en fonction de la polarisation. Également, un compensateur de Berek est installé après la lame demi-onde pour corriger l'ellipticité induite par le miroir dichroïque qui se trouve à l'intérieur du microscope. En effet, lorsque la polarisation n'est pas verticale ou horizontale, cette polarisation linéaire devient elliptique par son passage à travers le miroir dichroïque du microscope, une composante optique dont la fonction

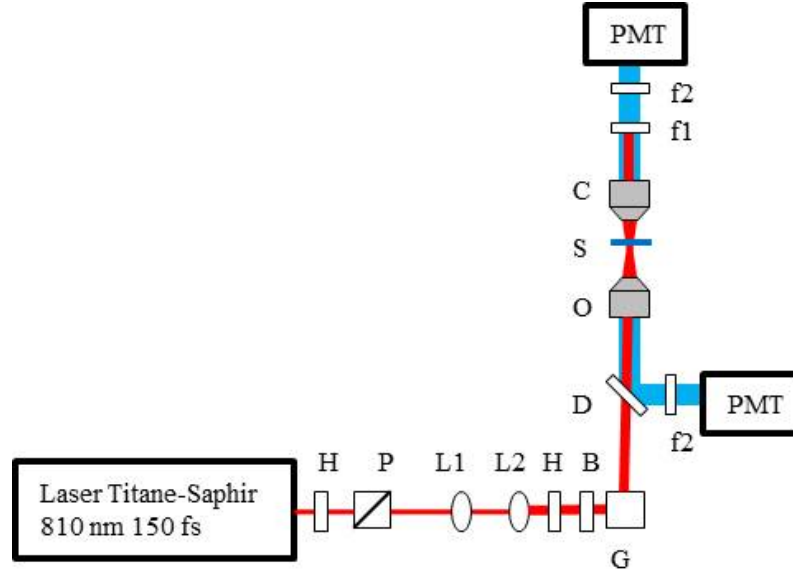


FIGURE 4.1 – Schéma du montage expérimental utilisé pour les expériences. H : Lame demi-onde ; P : Prisme de Glan ; L : Lentille ; G : Miroirs Galvanométriques ; D : Miroir dichroïque ; O : Objectif ; S : Échantillon ; C : Condenseur ; f : Filtre ; PMT : Tube Photomultiplicateur ; B : Compensateur de Berek.

est de transmettre les longueurs d'onde du laser et de réfléchir ceux de la seconde harmonique. Un schéma du montage est présenté à la figure 4.1.

4.2 Microscope

Pour acquérir les images, nous utilisons un microscope à balayage (Till Photonics GmbH, Munich, Germany) utilisant un système de miroirs galvanométriques pour balayer le faisceau laser sur l'échantillon. Pour focaliser le faisceau laser sur l'échantillon, un objectif de microscope Olympus UplanSApo 20X à immersion à air, avec une ouverture numérique de 0,75 est utilisé pour faire l'acquisition des images dans les sections transversales de genoux et les échantillons épais de cartilage sont imagés avec un objectif 40X à immersion à l'eau ayant une ouverture numérique de 1,15. La hauteur de l'objectif par rapport à l'échantillon est contrôlée par un moteur mécanique et piezoélectrique et une platine de translation permet de déplacer l'échantillon dans le plan XY. Le signal généré dans la direction forward (même direction que la direction de propagation du faisceau laser) est collecté avec un condenseur (IX2-

LWUCD, Olympus, Japan) possédant une ouverture numérique de 0,55. Également, pour des mesures où le ratio du signal forward et backward est important, un objectif 40X ayant une ouverture numérique de 0,80 (Olympus, Japan) est utilisé pour collecter le signal de GSH. Deux filtres (SEMRock, Rochester, NY, USA) sont utilisés pour filtrer le signal, le premier est un filtre à large bande pour bloquer le faisceau pompe de longueur d'onde de 810 nm, et le second est à bande étroite pour transmettre seulement les longueurs d'onde dans l'intervalle de 405 ± 10 nm. Le signal est détecté par un tube photomultiplicateur (PMT). Pour ce qui est de la collection du signal dans la direction backward (direction opposée à la direction de propagation de faisceau laser), l'objectif utilisé pour focaliser l'échantillon est également utilisé pour collecter le signal. Ce dernier est ensuite séparé du faisceau pompe à l'aide d'un miroir dichroïque qui transmet la lumière à une longueur d'onde autour de 810 nm et réfléchit celle autour de 405 nm. Finalement, le même filtre à bande étroite que celui utilisé dans la direction forward est utilisé pour laisser passer seulement le signal de seconde harmonique et celui-ci est détecté à l'aide d'un tube photomultiplicateur. La résolution du microscope dépend de la résolution de la tache focale du faisceau laser. Celui-ci est de l'ordre de la longueur d'onde du laser.

4.3 Ellipticité du faisceau laser

4.3.1 Sans miroirs dichroïques

Comme mentionné à la section précédente, lors des mesures où il est nécessaire de changer l'angle de la polarisation du faisceau laser pour observer la variation du signal, il est important de vérifier que le passage du faisceau laser à travers les optiques du microscope n'induit pas d'ellipticité. Pour ce faire, la puissance du laser à l'objectif a tout d'abord été mesurée à différents angles de la polarisation du faisceau laser pour vérifier que le changement d'angle du faisceau laser ne change pas son intensité transmise à travers le microscope. Par la suite, la linéarité de la polarisation à l'objectif du microscope a été mesurée en mesurant la puissance du laser à l'objectif

en fonction de l'angle de la polarisation du faisceau laser en utilisant un polariseur à la sortie. Ainsi, pour chaque angle de la polarisation du faisceau laser à l'entrée du microscope, nous avons effectué deux mesures ; la première est la puissance à l'objectif en positionnant un prisme de Glan à un angle tel que la puissance transmise est maximum si le faisceau ne subit pas de modification de sa polarisation et la deuxième est une mesure d'intensité avec le prisme de Glan positionné perpendiculairement à cet angle. En mesurant la puissance à la sortie du microscope, sans discriminer la polarisation d'entrée, nous obtenons le graphique présenté à la figure 4.2. En utilisant le prisme de Glan pour analyser la polarisation de sortie, nous obtenons les mesures présentées à la figure 4.3. La puissance initiale du faisceau laser à l'entrée du microscope est de 220 mW. Comme le montre la figure 4.2, la puissance à l'objectif est d'environ 144 mW. Ceci est dû principalement aux pertes dans le microscope, que ce soit dû à un trop grand diamètre du faisceau dont une partie n'est pas réfléchi sur certains miroirs, ceux-ci étant trop petits, ou par la trop petite taille du détecteur sur le puissance-mètre. Également, le signal parasite dans le puissance-mètre est autour de 2,3 à 3 mW. Lors des mesures en utilisant le prisme de Glan (figure 4.3), il est à noter qu'environ 20 % de pertes sont induites par le revêtement inadéquat sur le prisme de Glan et que d'autres pertes sont également présentes car le faisceau laser possède un plus grand diamètre que l'ouverture du prisme de Glan.

On remarque tout d'abord à la figure 4.2 un faible changement de l'intensité en fonction de l'angle de la polarisation (variation totale de 1,5 mW pour une puissance totale d'environ 143 mW) laissant supposer que les composantes optiques présentes dans le trajet optique à l'intérieur du microscope ne produisent pas de variation de l'intensité en fonction de la polarisation. Ensuite, en observant le graphique de la figure 4.3, on note une légère diminution de l'intensité de la polarisation parallèle lorsque la polarisation n'est pas horizontale (0 et 180 degrés) ou verticale (90 degré). L'inverse est observable avec la polarisation perpendiculaire lorsque la polarisation n'est pas horizontale ou verticale. Toutefois, ces changements sont assez minimes et ne méritent pas de corrections à notre opinion.

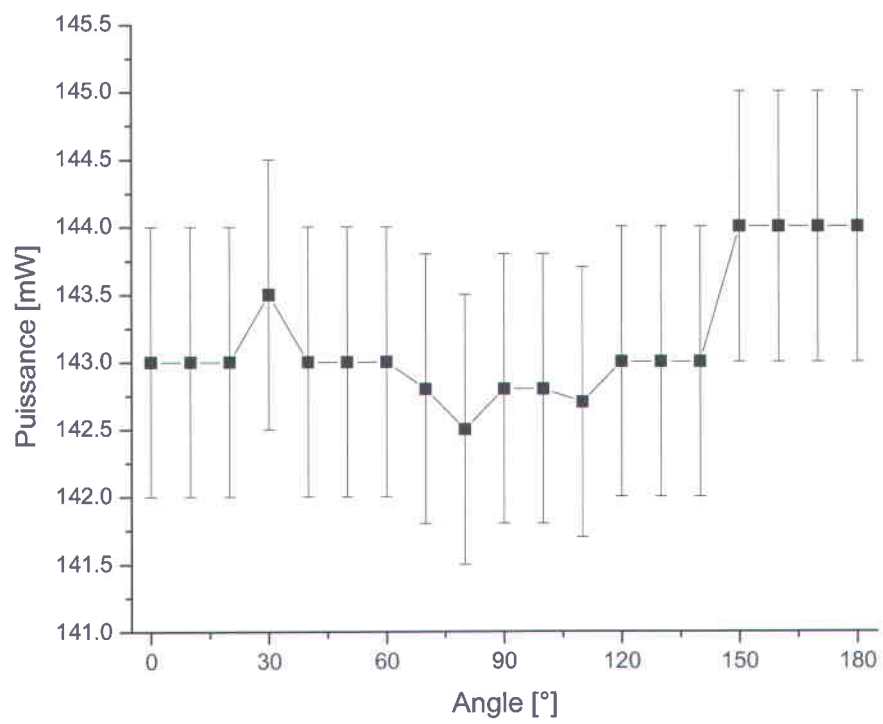


FIGURE 4.2 – Puissance à la sortie du microscope en fonction de l'angle de la polarisation du faisceau entrant.

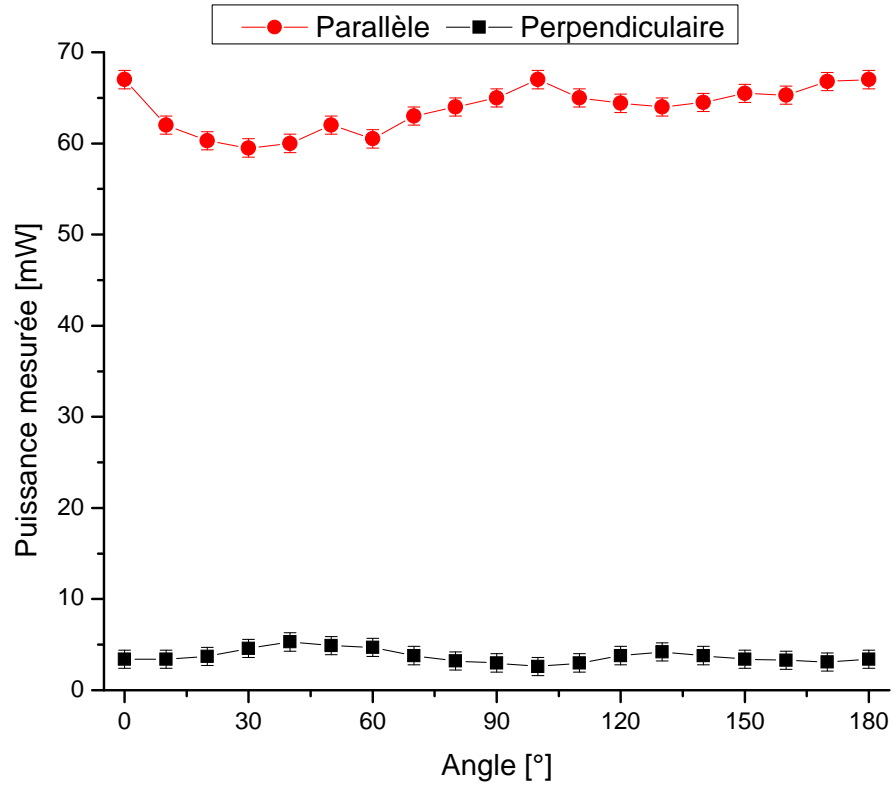


FIGURE 4.3 – Puissance à la sortie du microscope pour une polarisation parallèle et perpendiculaire à celui du laser pour différents angles d’entrée de la polarisation. Les mesures ont été prises à la polarisation parallèle à celle d’un faisceau polarisé linéairement ne subissant pas d’effets d’ellipticité ainsi que perpendiculaire à la polarisation ce même faisceau. La ligne noire (avec des points carrés) représente la puissance de la composante du faisceau à une polarisation parallèle à la polarisation d’un faisceau laser non affecté par les optiques et la ligne rouge (avec des points ronds) montre la puissance de la composante du faisceau laser perpendiculaire à la polarisation d’un faisceau laser non modifié. Sans miroir dichroïque.

4.3.2 Avec un miroir dichroïque

Pour l'acquisition d'images dans la direction backward, il est nécessaire de placer un miroir dichroïque dans le trajet optique du faisceau laser. Il a donc été vérifié comment l'installation de cette composante optique induit de l'ellipticité dans la polarisation du faisceau laser. Nous avons donc effectué les mêmes mesures que précédemment, soit mesurer la puissance à l'objectif pour la polarisation parallèle à celle que devrait avoir le faisceau laser si sa polarisation n'est pas modifiée par les composantes optiques et une mesure de la puissance à une polarisation perpendiculaire à cette dernière. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 4.4. La puissance à l'objectif du faisceau laser en fonction de l'angle de la polarisation d'entrée a également été mesurée et aucune modification notable de la puissance a été remarquée, indiquant que le miroir dichroïque ne modifie pas la transmission du faisceau laser.

Comme le montre la figure 4.4, la polarisation du faisceau laser est grandement modifiée par le passage de celle-ci à travers le miroir dichroïque. En effet, on remarque une forte diminution de la puissance de la composante parallèle lorsque la polarisation n'est pas horizontale (0 et 180 degrés) ou verticale (90 degré) et une augmentation de la puissance de la composante perpendiculaire, ce qui démontre un changement de la polarisation du faisceau laser vers une polarisation elliptique.

Pour palier à ce problème, un compensateur de Berek fut placé entre la lame demi-onde servant à changer l'angle de la polarisation et l'entrée du microscope. En changeant l'orientation du compensateur, il est possible d'induire un retard de phase entre la composante verticale et horizontale de la polarisation, compensant ainsi l'ellipticité créée par le miroir dichroïque. Nous obtenons ainsi les puissances présentées à la table 4.1. Le compensateur de Berek fut placé à un angle de 11,4 degrés. Nous voyons ainsi que la puissance de la composante perpendiculaire du faisceau laser a grandement diminué et il est plausible d'assumer que la polarisation du faisceau laser arrivant sur l'échantillon est maintenant linéaire. D'autres angles de la polarisation du faisceau laser ont également été mesurés sans toutefois que les mesures soient notées puisqu'elles s'apparentaient fortement à celles présentées à la

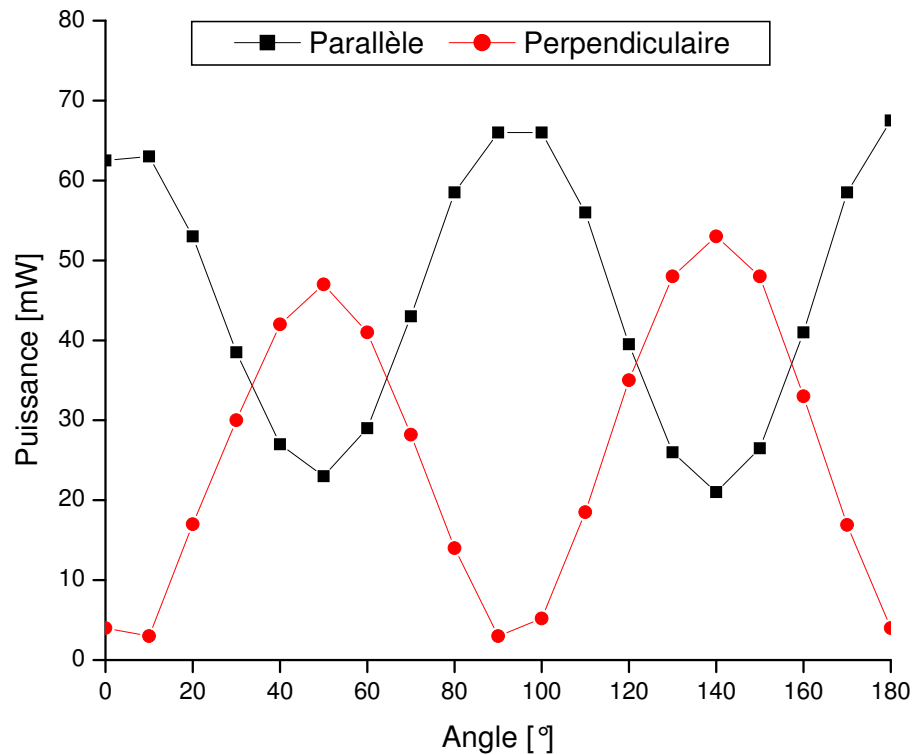


FIGURE 4.4 – Puissance à la sortie du microscope pour une polarisation parallèle et perpendiculaire à celle du laser pour différents angles d’entrée de la polarisation. La ligne noire (avec des points carrés) représente la puissance de la composante du faisceau à une polarisation parallèle à la polarisation d’un faisceau laser non affecté par les optiques et la ligne rouge (avec des points ronds) montre la puissance de la composante du faisceau laser perpendiculaire à la polarisation d’un faisceau laser non modifié. Avec un miroir dichroïque.

Angle [°]	Puissance [mW]			
	Sans compensateur de Berek		Avec compensateur de Berek	
	Parallèle	Perpendiculaire	Parallèle	Perpendiculaire
0	34	0	34	0
22.5	11	26	32	<1
67.5	8	26	28	<1

TABLE 4.1 – Table de la puissance pour différents angles avec et sans compensateur de Berek.

table 4.1.

4.4 Préparation des échantillons

4.4.1 Échantillons épais

Trois genoux normaux et sept genoux malades provenant de bovins furent utilisés pour obtenir des échantillons épais de 200 μm à 1 mm. Nous les avons obtenus d'un abattoir moins de 24 heures après l'abattage où ils ont été immédiatement congelés à une température d'environ $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Les genoux malades étaient sélectionnés parmi ceux qui possèdent des régions de 10 à 20 mm où le cartilage était dégradé pour laisser l'os sous-chondral exposé (voir figure 4.5). Les genoux normaux ont été sélectionnés parmi ceux qui ne présentaient pas de signes visibles de fissures ou de fibrillation. Avant les expériences, les genoux sont décongelés avec une solution saline de 0.15M à la température ambiante de $19\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le cartilage était enlevé du condyle fémorale avec un scalpel et la surface était placée dans le fond d'une boîte de Petri dont la base est constituée d'une lame de microscope pour permettre la microscopie GSH. Une lame de microscope ainsi qu'un poids de 50 g était placé au dessus de l'échantillon pour empêcher celui-ci de bouger. La boîte de Petri est rempli d'une solution saline de 0.15M pour maintenir l'hydratation. Dans les genoux normaux, des échantillons d'environ 10x10 mm étaient utilisés alors que dans les genoux malades, des échantillons plus grands (environ 10x15 mm) étaient utilisés pour imager la transition entre le bord d'une lésion et une région qui ne semble pas atteinte à vue d'oeil. Des images de 200x200 et 500x500 μm furent prises à différentes distances du bord de la lésion

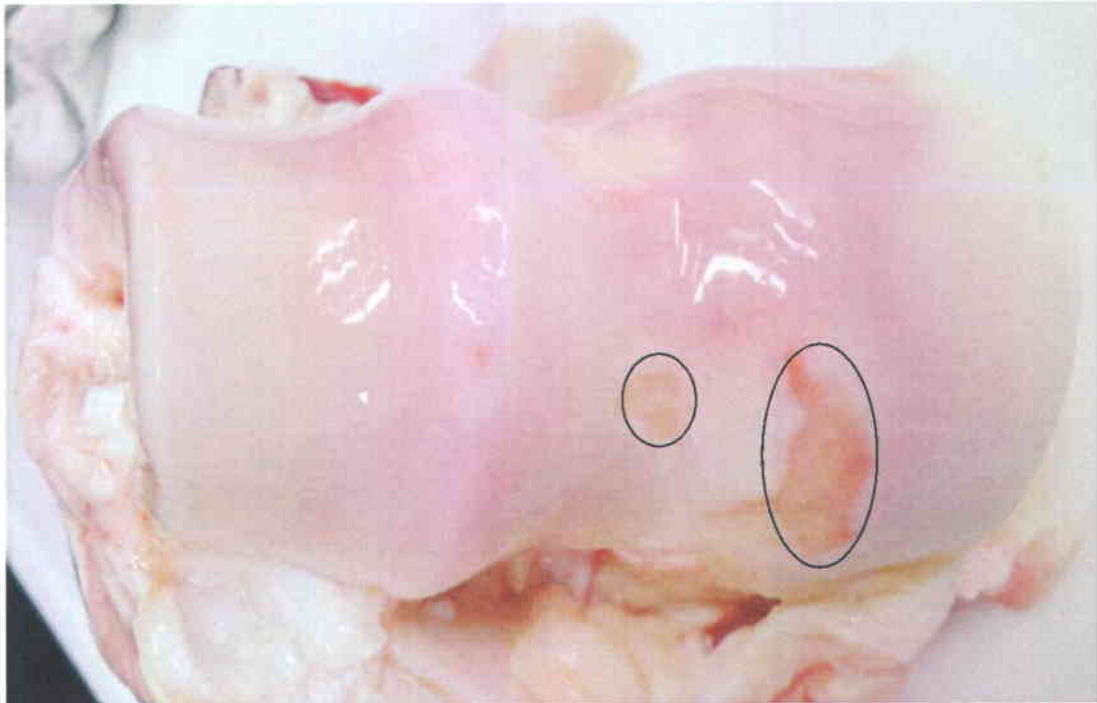


FIGURE 4.5 – Image de genoux de bovin atteint d'ostéo-arthrite. Les cercles représentent une région sévèrement atteinte d'ostéo-arthrite où l'os est visible, le cartilage ayant été complètement dégradé à ces régions. Les échantillons ont été collectés autour de ces régions.

dans les genoux malades et de manière aléatoire dans les genoux en santé. Étant donné l'épaisseur de l'échantillon, le signal qui est produit dans la direction forward est rétro-diffusé dans la direction backward et donc seulement la détection backward est utilisée pour ces échantillons.

4.4.2 Échantillons minces

Les échantillons minces ont été collectés à partir de genoux humains et ont été préparés par des collaborateurs à l'Université d'Oxford au centre Nuffield Department of Orthopaedics, Rheumatology and Musculoskeletal Sciences. Huit genoux malades et huit genoux normaux ont été utilisés pour l'étude. Les genoux normaux ont été obtenues à partir de patients subissant une amputation au dessus du genoux tandis que les genoux malades ont été obtenus par des patients subissant un remplacement partiel du genoux (Unicompartmental Knee Replacement : UKR) dans un centre or-

thopédique spécialisé. Après les opérations, les échantillons sont emmenés frais dans le laboratoire de pathologie pour la fixation des échantillons minces. Pour les genoux malades, chaque plateau tibiale est sectionné obliquement le long d'une ligne passant à travers un lésion où il y a perte complète du cartilage et à travers le point le plus postérieur de la transition visible à l'oeil nu entre du cartilage endommagé et du cartilage normal. Des coupes similaires ont été effectuées pour les genoux normaux. Les sections transversales ont été fixées en les trempant dans une solution de formaldéhyde à 10 % pendant 12 h, ont ensuite été décalcifiées durant 24 h dans de l'acide nitrique pour finalement être fixées avec de la cire. Les sections de 10 μm sont coupées avec un microtome Leica RM2135 (Leica Microsystems, Allemagne) et ont été placées sur une lame de microscope et recouvertes d'une lamelle de protection ("coverslip") numéro 1. Puisque les échantillons sont très minces, il devrait y avoir très peu de rétrodiffusion du signal de seconde harmonique générée dans la direction forward dans les mesures signal dans la direction backward. Toutefois, il se produit une réflexion de Fresnel sur la lame de microscope se trouvant au dessus de l'échantillon. Lors de l'acquisition d'images, pour limiter cet effet, nous plaçons une goutte d'eau sur la lame de microscope, ce qui crée une courbure et un éloignement de la surface de réflexion, limitant les effets de la réflexion de Fresnel [21].

Chapitre 5

Microscopie GSH de la surface de cartilage

La surface du cartilage est l'endroit où les contraintes sont les plus élevées et donc, logiquement, est le premier endroit où les modifications de l'arrangement ultrastructural des fibrilles de collagène devraient apparaître. Ceci en fait un endroit où il est relativement facile de repérer des signes de la maladie sous la forme de la modification du maillage de collagène. En imageant la surface de cartilage provenant de genoux de bovins à l'aide de la microscopie GSH, il nous a été possible d'observer plusieurs régions où le maillage de collagène s'est fortement réorganisé. Pour ce faire, nous avons préparé des échantillons de la surface du cartilage provenant de genoux de bovin atteints d'ostéo-arthrite (en périphérie des zones où le cartilage est dégradé jusqu'à l'os sous-chondral) ainsi que d'autres échantillons de cartilage prélevés sur des genoux de bovins dont le cartilage n'est pas endommagé. Étant donné l'épaisseur des échantillons imagés (environ $200\ \mu\text{m}$ à $1\ \text{mm}$), le signal forward ne peut être collecté, comme décrit dans la section 4.2, puisque la grande majorité du signal est diffusée par l'échantillon. Toutefois, une partie de ce signal, par rétrodiffusion à l'intérieur de l'échantillon, peut être collectée dans la direction backward. Les images acquises avec ces échantillons sont donc une combinaison du signal généré dans la direction forward et backward. Dans ce chapitre, la structure du maillage de collagène normal et endommagé à la surface du cartilage sera imagée à l'aide de la microscopie GSH

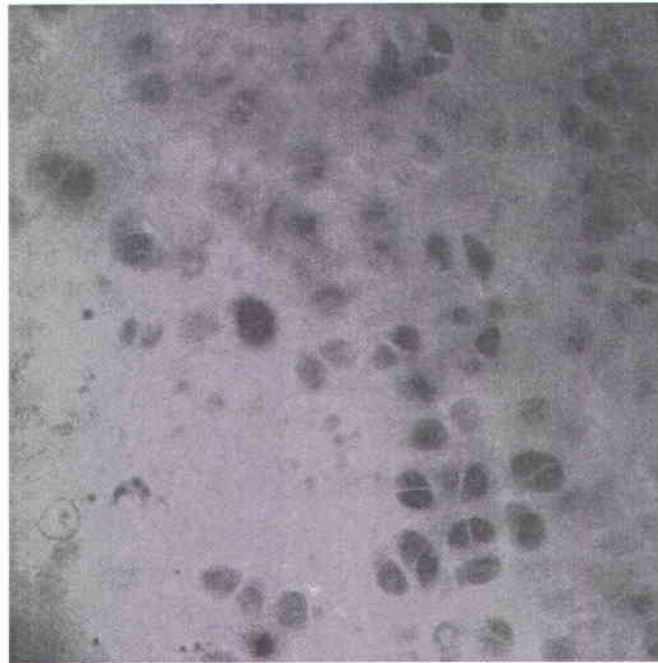


FIGURE 5.1 – Image de microscopie de seconde harmonique (GSH) de la surface de cartilage provenant d'un genou en santé. Taille de l'image : 500x500 μm

et analysée.

5.1 Arrangement ultrastructural normal

La figure 5.1 montre un maillage de collagène provenant d'un genou n'étant pas atteint d'ostéo-arthrite. Ce maillage de collagène provenant de cartilage sain montre, par la faible variation du signal GSH sur toute l'image, un alignement faible mais consistant en direction du stress principal [16]. De plus, aucune texture visible n'est observée dans la structure de collagène, indiquant que le maillage de collagène provient bel et bien d'un genou en santé. Un signal relativement uniforme est visible, laissant supposer que la structure du cartilage est comparativement lisse. Ceci est possible puisque dans la structure de cartilage, les fibrilles de collagène sont entremêlées entre elles comme présentées à la figure 1.1(c).

5.2 Fibrillation avancée du cartilage

La figure 5.2 montre le tissu dans un état de fibrillation avancée. Les trois images ont été acquises dans la même région à différentes profondeurs, à la frontière de la partie visible à l'oeil nu de la fibrillation (voir figure 4.5). Le tissu montre une texture consistante de fibrilles de collagène clairsemées et "démêlées" sur toute la profondeur. On remarque des regroupements de fibrilles d'environ $10\ \mu\text{m}$ de diamètre où le signal GSH est plus élevé que pour le reste de l'image. Ceci est causé par l'amélioration de l'accord de phase du signal GSH parce que dans ces domaines, les fibrilles sont alignées de manière plus ordonnée et la majorité d'entre elles contribuent à l'augmentation de l'intensité du signal. Ces regroupements compacts de fibrilles se retrouvent entourés d'un maillage de fibrilles "ondulées" qui ont un alignement général dans la même direction. On retrouve ainsi un alignement à la fois à l'échelle submicrométrique (par les petits regroupements de fibrilles apparaissant comme des filaments minces sur toute la surface de l'image) et à l'échelle du micron (par des regroupements de plusieurs fibrilles formant des structures de quelques microns de diamètre indiquées par les flèches et dont l'orientation diffère souvent du reste du maillage de collagène). Ces structures sont cohérentes avec celles observées autour des cellules à un stage précoce de la dégradation à l'aide de la microscopie de contraste par interférence différentielle [76]. Ils résultent d'une perte de cohésion dans le maillage de collagène et d'une perte de viabilité mécanique. Toutefois, il n'est pas certain que la région de cartilage imagée provienne de la zone superficielle ou si cette dernière a déjà été érodée pour exposer les couches sous-jacentes.

5.3 Initiation et progression de la formation de regroupement de fibrilles

La figure 5.3 acquise à la frontière de la partie visible à l'oeil nu de la fibrillation, montre un large regroupement de fibrilles ("bundle") se formant à la surface du cartilage articulaire. Autour de ce large regroupement de fibrilles, on retrouve de plus

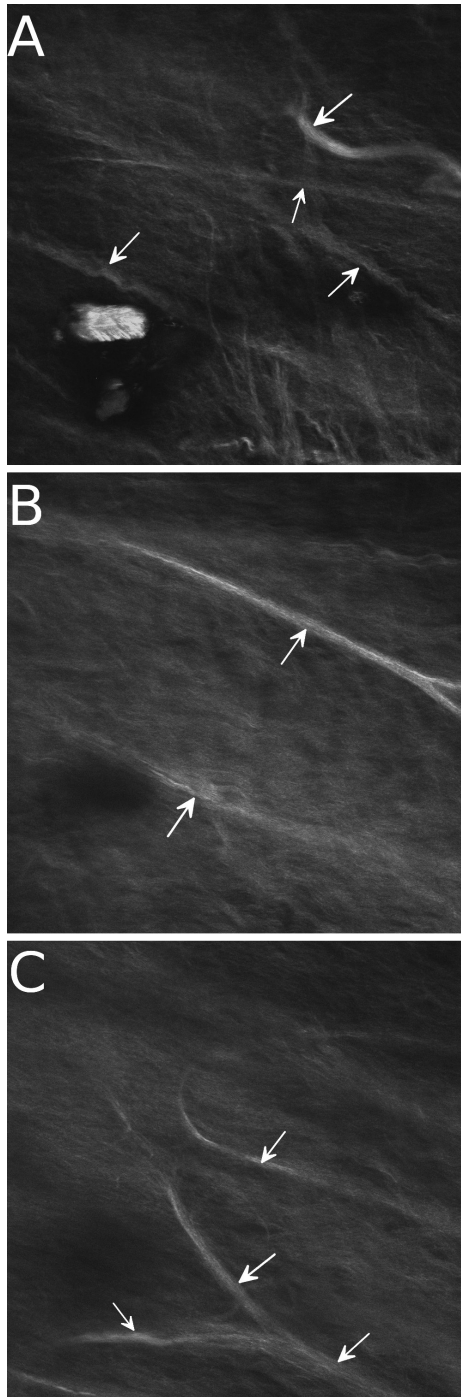


FIGURE 5.2 – Tissu hautement fibrillé provenant d’une région de dégradation visible. L’image (A) est acquise à la surface de l’échantillon tandis que les images (B) et (C) sont acquises à une profondeur de 10 et 20 μm de la surface de l’échantillon, dans la même région. Les flèches désignent des regroupements de fibrilles qui se sont formés. Taille des images : 200x200 μm

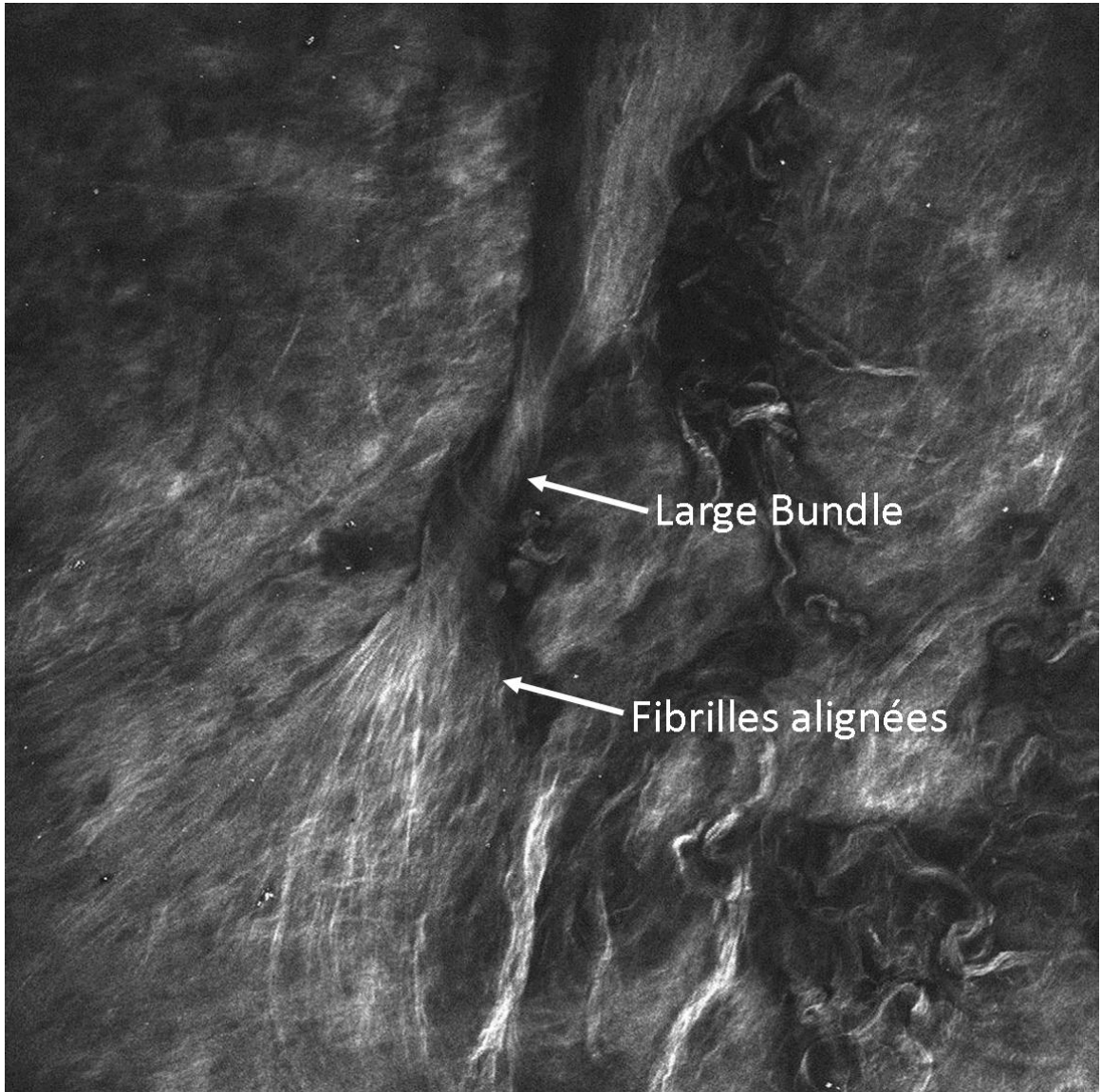


FIGURE 5.3 – Origine de fibrillation visible montrant la transition à partir d'un niveau microscopique de la perturbation vers un niveau macroscopique. Taille de l'image : 500x500 μm

petits regroupements de fibrilles qui semblent connectés au regroupement principal, le tout entouré d'un maillage de collagène. Au bas de l'image, les fibrilles à la racine du large regroupement de fibrilles montrent la transition graduelle de la formation du regroupement de fibrilles à l'échelle submicrométrique vers l'échelle de la dizaine de microns. La contrainte de traction appliquée sur le large regroupement de fibrilles agit dans la direction de l'alignement des fibrilles et est transférée au reste de la matrice extracellulaire par la région à la racine du regroupement de fibrilles. La configuration en éventail du maillage de collagène dans la partie inférieure gauche de l'image peut être interprétée comme étant un alignement en direction de la contrainte de telle sorte que les fibrilles sont tirées à l'extérieur de leur configuration normale. Ainsi, les contraintes appliquées au large regroupement de fibrilles sont transférées au reste du maillage de collagène et mènent à la formation de plus petits regroupements de fibrilles disposés en forme d'éventail.

Lorsque l'environnement mécanique de la surface articulaire est considéré, il peut être facile d'interpréter les mécanismes de progression de regroupements larges de fibrilles. Une grande contrainte de tension et de cisaillement appliquée à la surface de collagène par l'intermédiaire des regroupements de fibrilles va entraîner plus de fibrilles hors de leur alignement dû au grand stress appliqué localement. Cet effet peut être amplifié s'il est combiné à l'activité des protéinases associée à la dégradation. Il est toutefois plus difficile de déduire les mécanismes derrière l'initiation de la formation de ce type de regroupements de fibrilles. Il est possible, à partir de régions adjacentes aux tissus hautement endommagés (figures 5.2 et 5.3) d'avoir un aperçu des mécanismes menant à la modification de la matrice extracellulaire. Dans un tissu d'apparence normal, des régions d'alignement similaires peuvent être observées. À l'intérieur d'une région de $200 \times 200 \mu\text{m}$ présentée à la figure 5.4, de nombreuses régions orientées dans différentes directions peuvent être observées. En effet, sur ces figures, les deux images ont été acquises à la même région, mais avec une polarisation du faisceau laser perpendiculaire l'une par rapport à l'autre (représenté par les flèches). La distribution de ces régions hautement alignées a de grandes implications, car la distribution des contraintes sur la couche superficielle devient non uniforme et

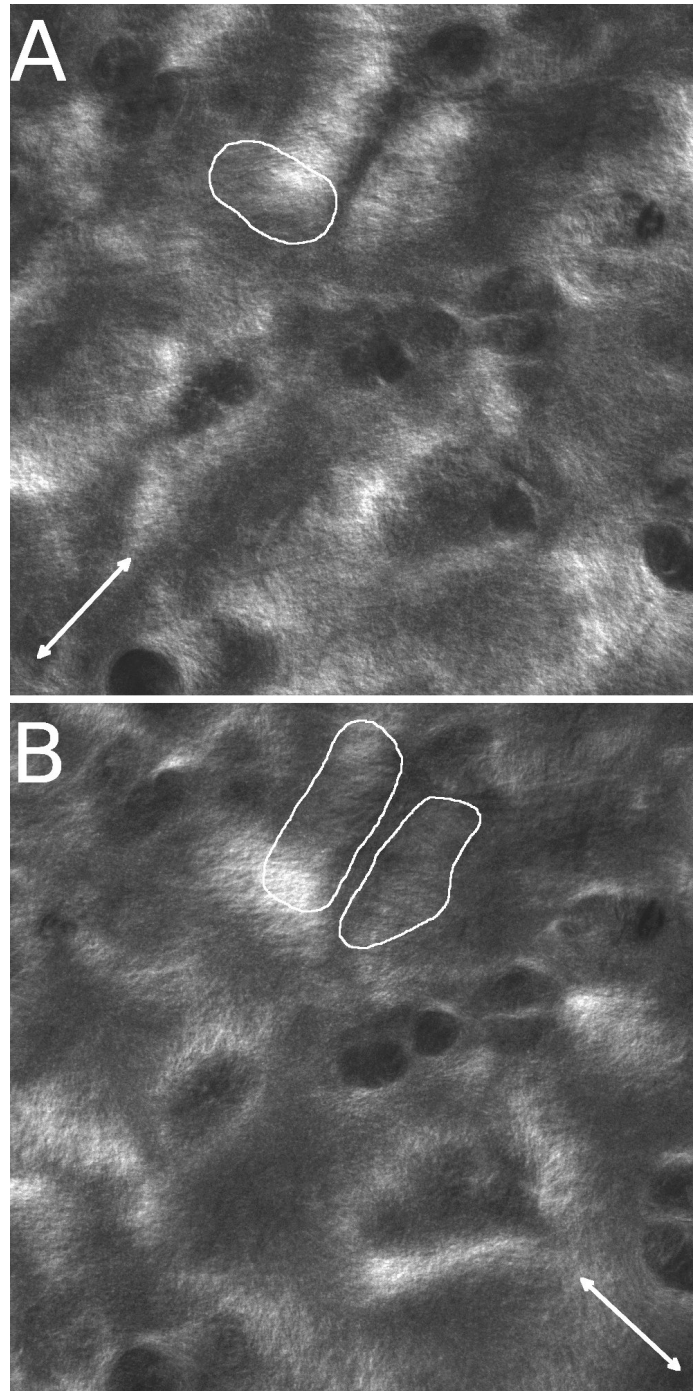


FIGURE 5.4 – Tissu d'apparence normal dans une zone de transition. En variant l'orientation de la polarisation du faisceau laser (indiqué par les flèches en bas des images), des régions de collagène hautement alignées dans des directions différentes peuvent être observées. Taille des images : 200x200 μm

des concentrations de contraintes sont générées à la frontière des régions hautement alignées. La progression logique de ces régions est similaire à celle de la croissance des microfissures où les grandes forces de contraintes autour des extrémités de ces microfissures contribuent à leur progression (élongation). Dans le cas qui a été observé, les grandes contraintes autour des régions où les fibrilles sont hautement alignées tirent probablement les fibrilles de collagène à l'extérieur du maillage cohésif, créant les larges regroupements de fibrilles observés à la figure 5.3. Nous émettons l'hypothèse que la formation de ces regroupements de fibrilles est une étape irréversible dans le processus de dégradation du cartilage.

5.4 Modification de l'arrangement ultrastructural de collagène selon la profondeur

La figure 5.5 montre une région où l'alignement des fibrilles change en fonction de la profondeur. Avec la progression de la dégradation (dégradation chimique et déformation due aux contraintes mécaniques), les fibrilles s'alignent au point où ils se regroupent en nombre suffisant pour que leur texture puisse être imagée. À cette étape, les régions isolées se sont jointes pour former des regroupements de fibrilles plus longs et plus larges. La direction de l'alignement change avec la profondeur pour former une architecture hautement anisotropique en lamelle. Il est possible que le mouvement relatif entre les différentes "feuilles" mène à la fibrillation visible et des lésions en surface en plus de causer des discontinuités qui peuvent conduire à la délamination des surfaces.

En plus de l'étude de la progression des différentes étapes du processus de fibrillation, il est également possible d'imager la progression de la maladie en fonction de la profondeur du maillage de cartilage. La figure 5.6 montre l'avancement de la dégradation selon la profondeur avec des images distancées d'une profondeur de $2 \mu\text{m}$ chacune en partant de la surface pour progresser vers l'intérieur du cartilage. Nous voyons sur cette figure que plus nous progressons vers les régions profondes du car-

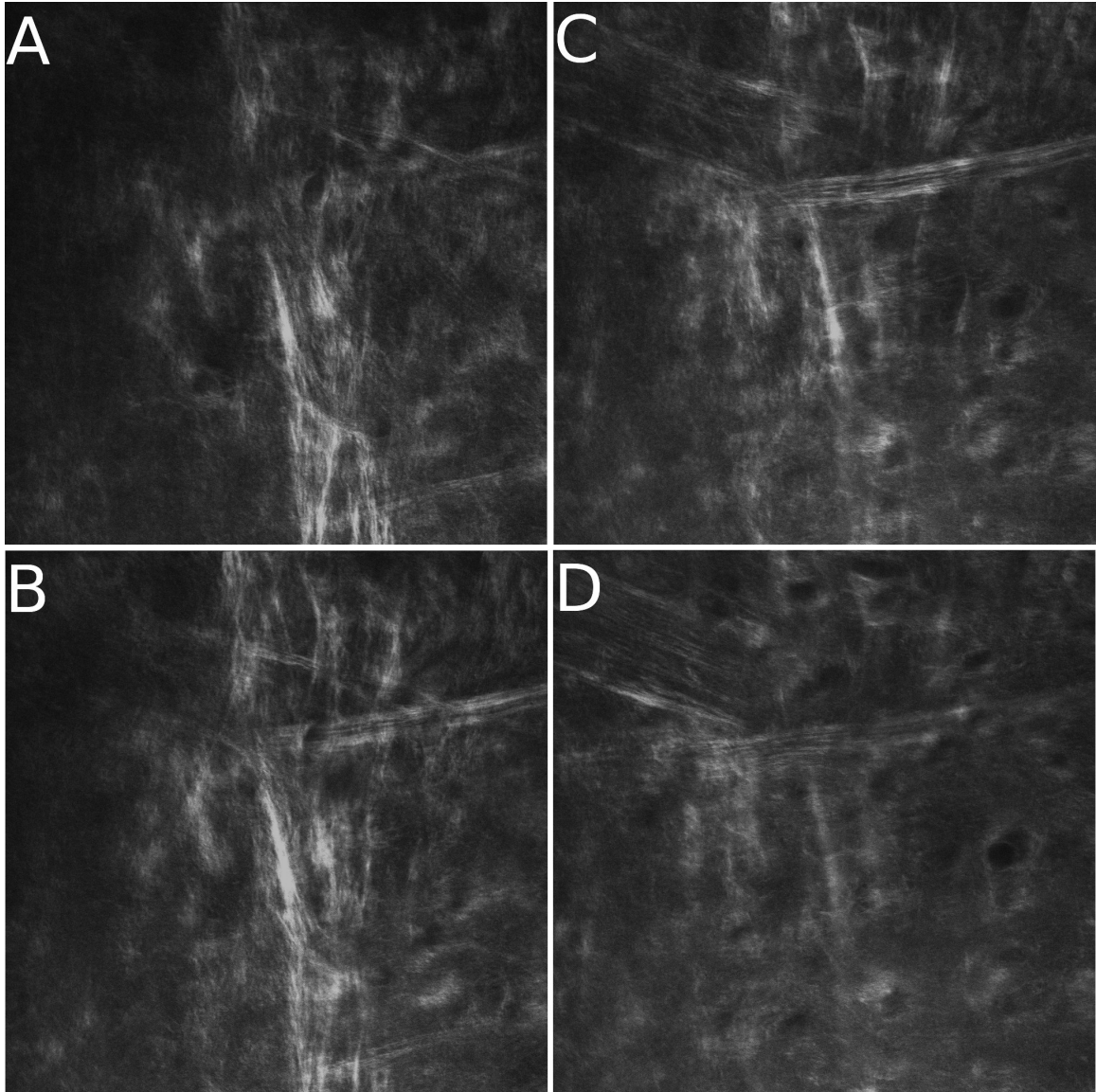


FIGURE 5.5 – Tissu macroscopiquement normal dans la zone de transition ($200 \times 200 \mu\text{m}$) montrant une dégradation plus avancée que celle de la figure 5.4. L'image (A) a été acquise à la surface du tissu tandis que les images (B), (C) et (D) ont été acquises à une profondeur de 2, 4 et 6 μm de la surface respectivement. Taille des images : $200 \times 200 \mu\text{m}$

tilage, moins la fibrillation est importante. La figure 5.6(I) montre la progression du front de fibrillation pour les différentes profondeurs imagées. On peut ainsi supposer que la dégradation du collagène débute à la surface du cartilage pour se propager graduellement en profondeur. Ceci est probablement causé par le fait que les contraintes que subissent les articulations sont plus élevées à la surface, rendant cette dernière plus sujette à une modification de sa structure. Ces résultats sont en accord avec plusieurs autres recherches indiquant que l'ostéo-arthrite est prédominante à la surface du cartilage et se répand progressivement en profondeur [51, 77].

Pour conclure, dans ce chapitre, nous avons imagé la structure de collagène provenant d'échantillons épais de genoux de bovins. En utilisant comme référence un maillage normale de collagène, nous avons observé différentes étapes de la modification du maillage de collagène. Nous avons ainsi imagé la formation d'agrégats de fibrilles (figure 5.3) causée par des contraintes locales menant à un alignement des fibrilles (figure 5.4). Une fibrillation avancée du tissu (figure 5.2) ainsi qu'une modification de l'état du cartilage en fonction de la profondeur dans l'échantillon (figure 5.6) ont été observées.

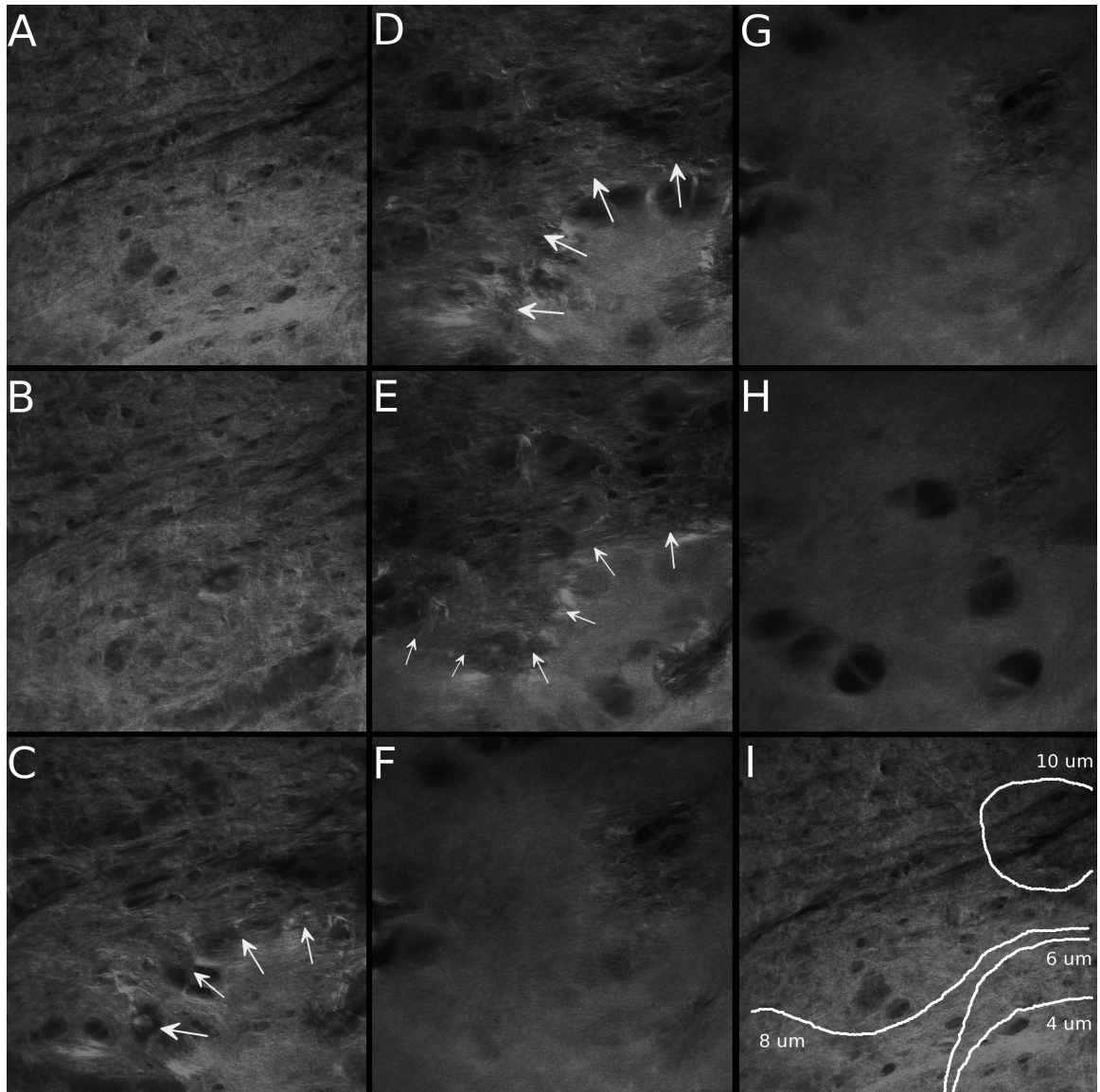


FIGURE 5.6 – La progression de la dégradation du collagène en fonction de la profondeur (intervalle de $2 \mu\text{m}$ de A à H). Le tissu normal paraît lisse tandis que le tissu endommagé paraît texturé. Les flèches indiquent le front de la dégradation. L'image (I) montre les frontières de la dégradation avec l'augmentation de la profondeur superposées avec la surface dégradée de l'image (A). Le tissu apparaît normal après $12 \mu\text{m}$. Taille des images : $200 \times 200 \mu\text{m}$

Chapitre 6

Microscopie GSH dans des échantillons minces de cartilage

L'utilisation d'échantillons épais provenant d'échantillons frais permet de bien distinguer les différents signes de la dégradation à la surface du cartilage, mais seulement la couche superficielle du cartilage peut être imagée, excluant les couches plus profondes. Pour ce faire, des échantillons minces ($\sim 10 \mu\text{m}$ d'épaisseur) de sections transversales de cartilage fixées ont été utilisées. La structure du maillage de collagène est organisée en une structure d'arche de telle sorte que dans la zone radiale (voir figure 2.1), les feuilles de collagène sont perpendiculaires à la surface de cartilage et courbent dans la zone transitionnelle pour devenir parallèles à la surface dans la zone superficielle (voir figure 2.2). Ainsi, étant donné l'orientation différente du maillage de collagène dans la zone radiale, les contraintes que subit ce dernier l'affectent différemment comparativement au maillage se trouvant dans la zone superficielle.

Les images obtenues à l'aide des échantillons minces sont différentes de celles obtenues à l'aide d'échantillons épais. Tout d'abord, étant donné la faible épaisseur des échantillons, il est possible de faire l'acquisition du signal dans deux directions. La première étant la même que la direction de propagation du faisceau laser (direction forward) et la seconde dans la direction opposée (direction backward). Toutefois, étant donné que l'échantillon est fixée entre deux lames de microscopes, l'interface air-

verre peut renvoyer une contribution significative du signal forward dans la direction backward. Pour palier à cette situation, une goutte d'eau est appliquée et permet d'éloigner l'interface sur laquelle se fait la réflexion. Puisque le signal GSH diverge fortement, le signal forward qui est rétro-diffusé ne sera pas détecté dans la direction backward [21]. Le collagène possède une structure pour laquelle l'intensité du signal GSH produit dépend l'angle entre la polarisation laser et l'axe des fibrilles [23, 26]. Le signal est minimum lorsque la polarisation du laser est perpendiculaire à l'alignement des fibrilles. Il est donc possible d'utiliser cet effet pour détecter des changements dans la structure et l'alignement générale des fibrilles du maillage de collagène des genoux malades. Pour faire l'analyse, des images dans la direction forward et backward d'échantillons minces de cartilage articulaire provenant de genoux en santé et malades ont été acquises.

6.1 Genoux sains - cartilage normal

Des images GSH provenant d'échantillons de genoux sains ont été acquises dans le but de connaître l'apparence de structure de collagène ne présentant aucune trace de la maladie et, par le fait même, aucune modification du maillage de collagène. Ceci permet également d'analyser le comportement du signal de seconde harmonique dans un maillage de collagène normal pour qu'il soit ensuite comparé avec celui provenant de régions malades de cartilage. La figure 6.1 montre des images typiques d'un maillage de collagène de type II provenant de cartilage articulaire. Également, plusieurs images ont été acquises en changeant l'angle de la polarisation du faisceau laser à l'entrée du microscope. En effet, l'intensité du signal GSH produit par les fibrilles de collagène dépend de l'angle relatif entre l'orientation de la polarisation du faisceau laser et l'orientation de la fibrille. Ainsi, faire une analyse du signal généré en fonction de la polarisation du faisceau laser permet de connaître l'alignement général des fibrilles et leur degré d'organisation. La figure 6.2 montre un graphique de l'intensité normalisée du signal GSH en fonction de l'angle de la polarisation linéaire du faisceau laser. Ce dernier montre tout d'abord que la direction préférentielle des

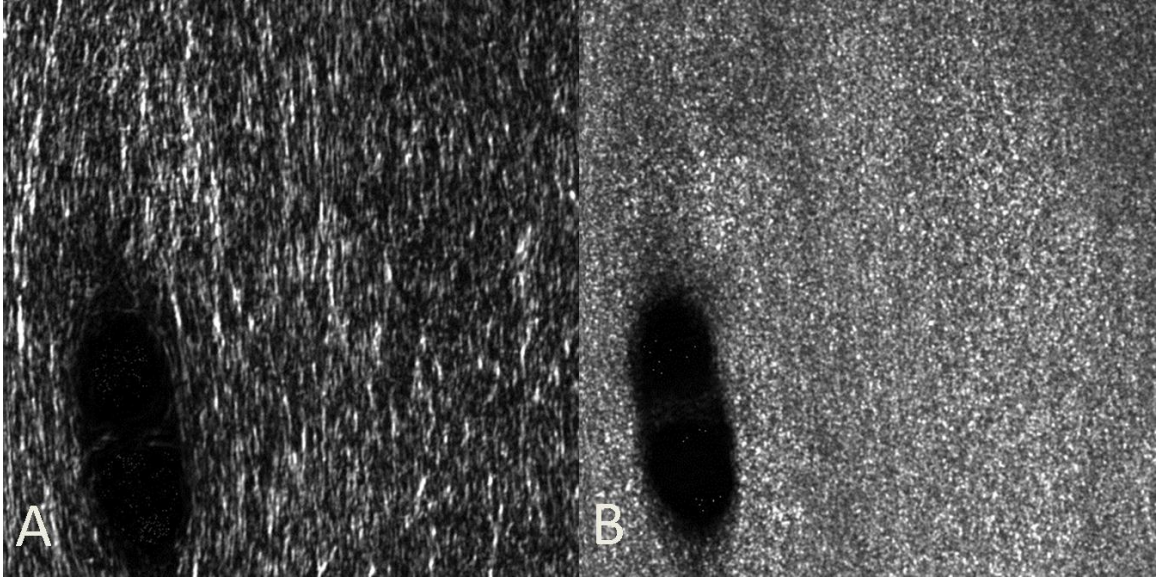


FIGURE 6.1 – Image GSH de cartilage articulaire. (A) Image acquise dans la direction forward. (B) Image acquise dans la direction backward. Les images ont une dimension de $100 \times 100 \mu\text{m}$.

fibrilles est dans la direction transversale à la surface du cartilage puisque, dans cette direction, le signal est maximum. De plus, la forme de la courbe montre un niveau d'organisation tout de même faible indiquant que les fibrilles sont toujours organisées selon un entrelacement pseudo-aléatoire semblable à la structure présentée à la figure 1.2b. Également, en effectuant une analyse semblable sur d'autres régions de collagène provenant de genoux en santé, on remarque que le comportement du signal GSH en fonction de la polarisation laser est semblable dans chaque région analysée. De plus, la figure 6.2 montre que le comportement du signal dans la direction forward et backward en fonction de la polarisation est identique, que ce soit par l'angle de polarisation à laquelle le signal GSH est maximum, ou le ratio entre le signal maximum et minimum.

6.2 Genoux atteints d'ostéo-arthrite

Comme présenté à la section 6.1, le maillage de collagène contenu dans le cartilage articulaire produit un signal GSH qui permet de déterminer la direction générale des fibrilles ainsi que leur degré d'alignement. À l'aide d'échantillons de genoux hu-

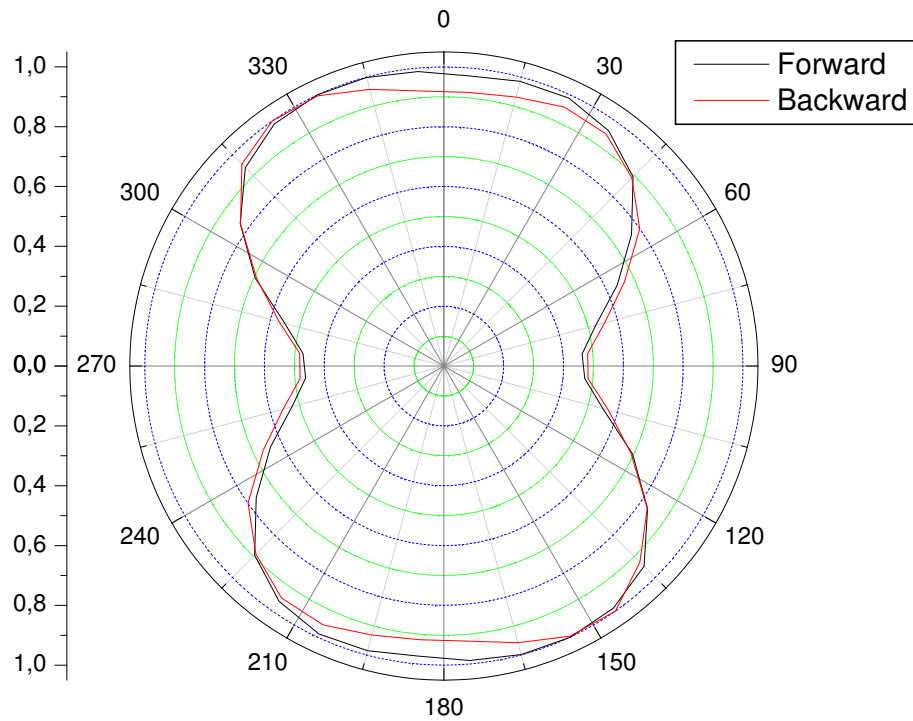


FIGURE 6.2 – Graphique de l'intensité normalisée du signal GSH en fonction de l'angle de la polarisation linéaire du faisceau laser dans un échantillon en santé. L'acquisition a été effectuée dans une région d'environ $30 \times 30 \mu\text{m}$ sur les images présentées à la figure 6.1. L'angle de zéro degré représente une polarisation verticale du faisceau laser sur l'image.

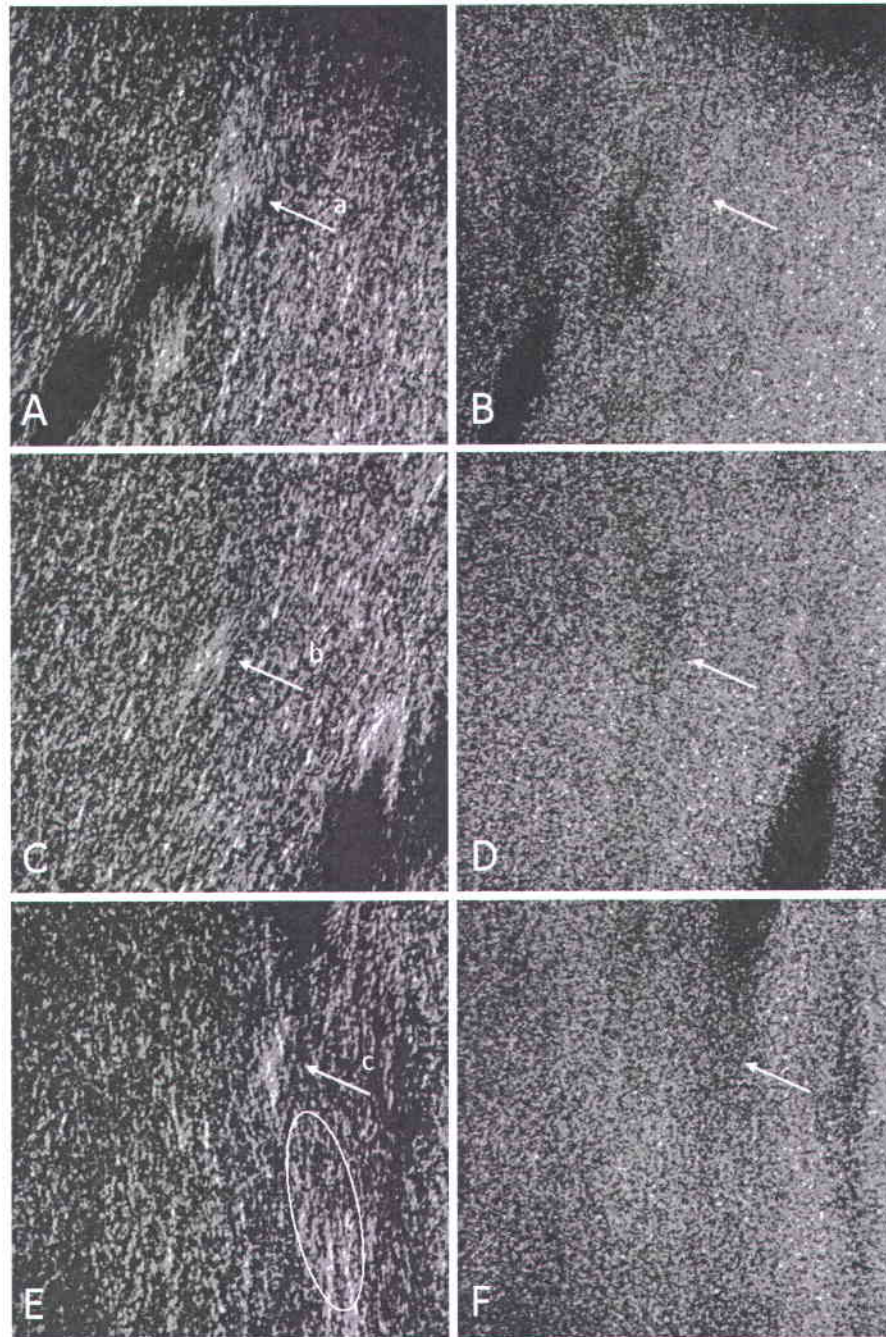


FIGURE 6.3 – Images de collagène contenu dans le cartilage articulaire provenant de genoux atteints d'ostéo-arthrite. (A), (C), (E) Images acquises dans la direction forward. (B), (D), (F) Images acquises dans la direction backward. Les images représentent des régions auxquelles il sera fait référence en tant que régions a (A), (B), b (C), (D) et c (E), (F). Le cercle présent à (E) indique une région qui présente une modification de la structure de collagène, mais qui n'est pas visible à cet angle de la polarisation du faisceau laser. Les images sont de dimension 100x100 μm .

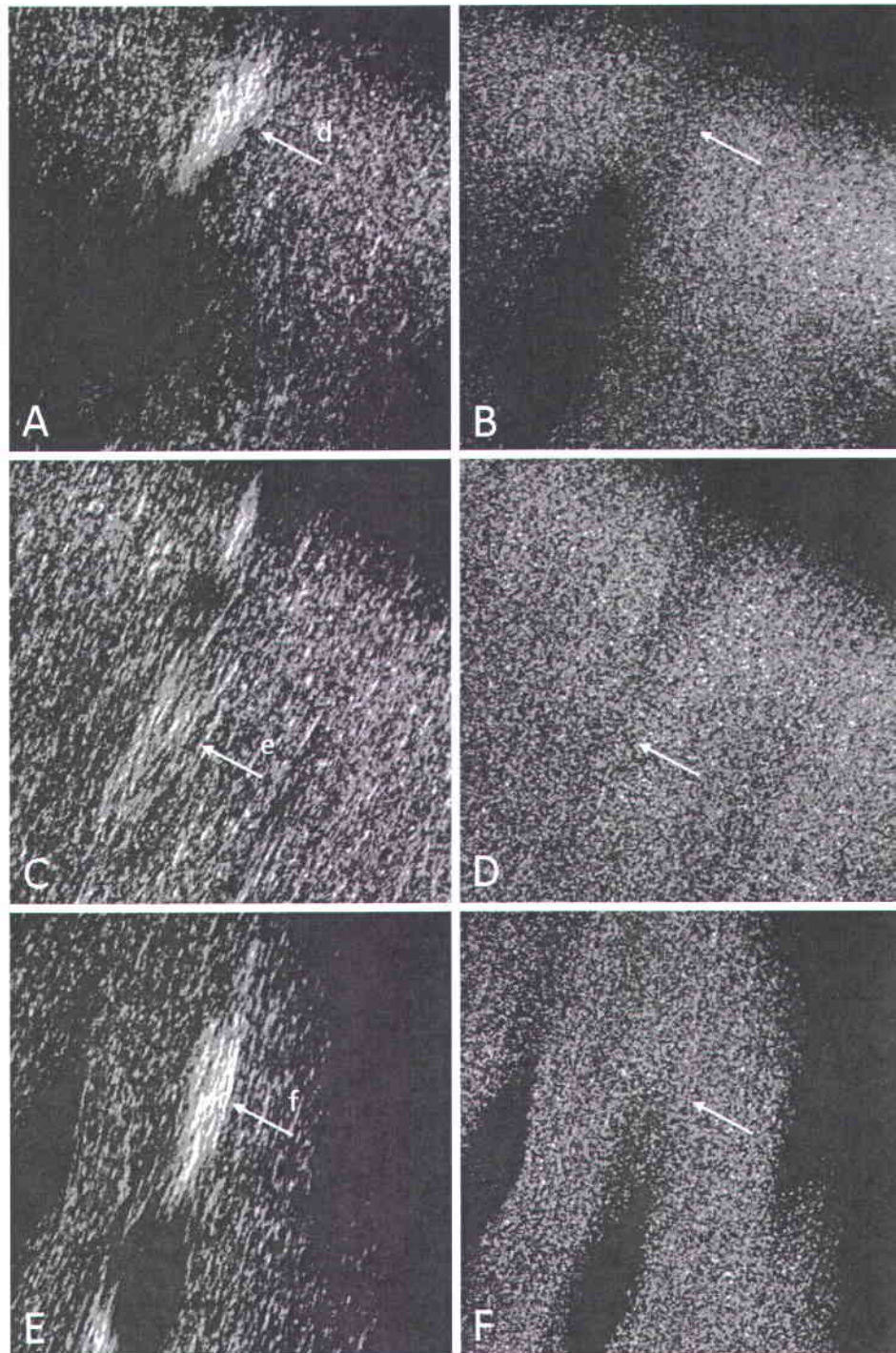


FIGURE 6.4 – Images de collagène contenu dans le cartilage articulaire provenant de genoux atteints d'ostéo-arthrite. (A), (C), (E) Images acquises dans la direction forward. (B), (D), (F) Images acquises dans la direction backward. Les images représentent des régions auxquelles il sera fait référence en tant que régions d (A), (B), e (C), (D) et f (E), (F). Les images sont de dimension 100x100 μm .

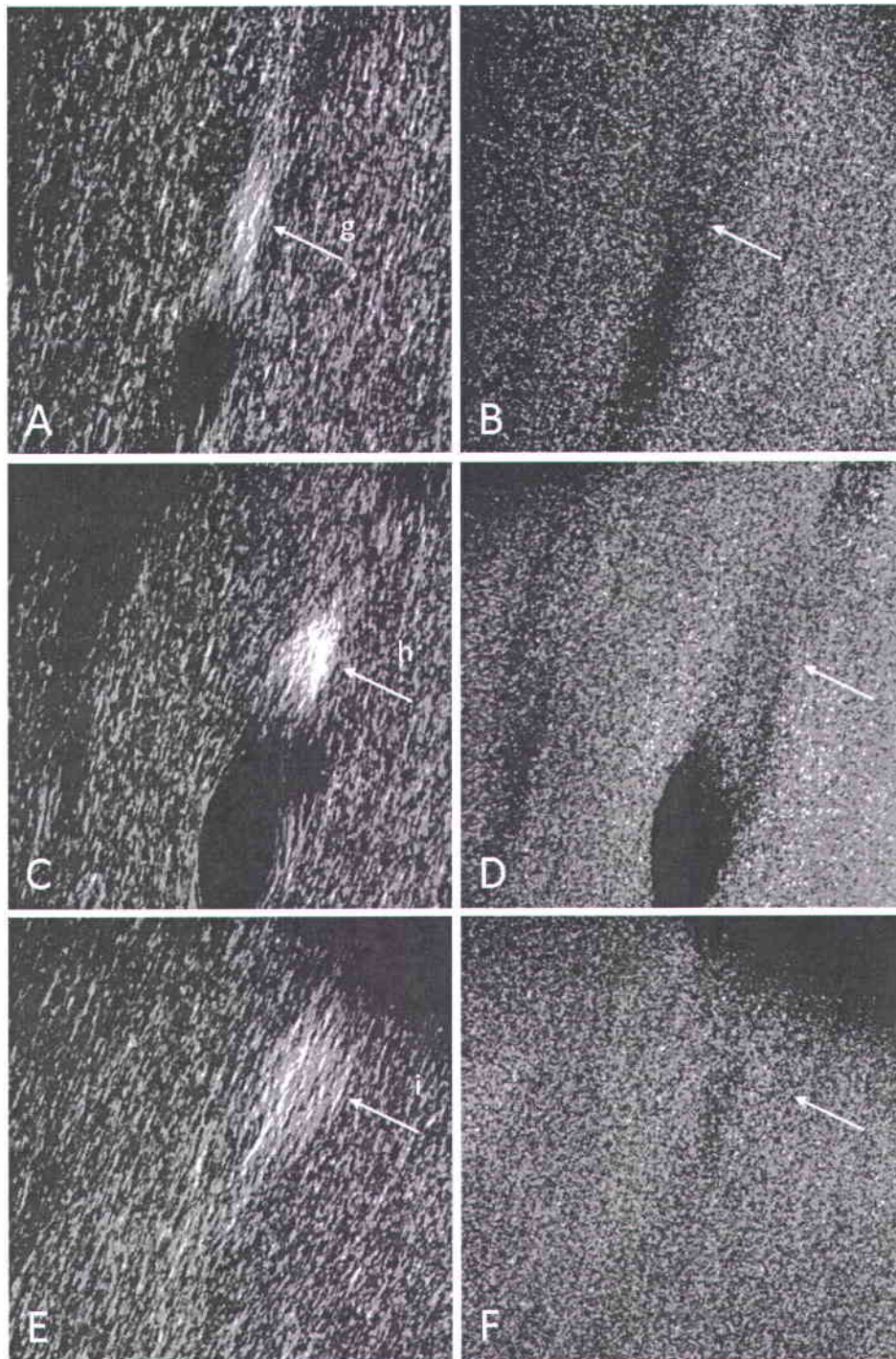


FIGURE 6.5 – Images de collagène contenu dans le cartilage articulaire provenant de genoux atteints d'ostéo-arthrite. (A), (C), (E) Images acquises dans la direction forward. (B), (D), (F) Images acquises dans la direction backward. Les images représentent des régions auxquelles il sera fait référence en tant que régions g (A), (B), h (C), (D) et i (E), (F). Les images sont de dimension 100x100 μm .

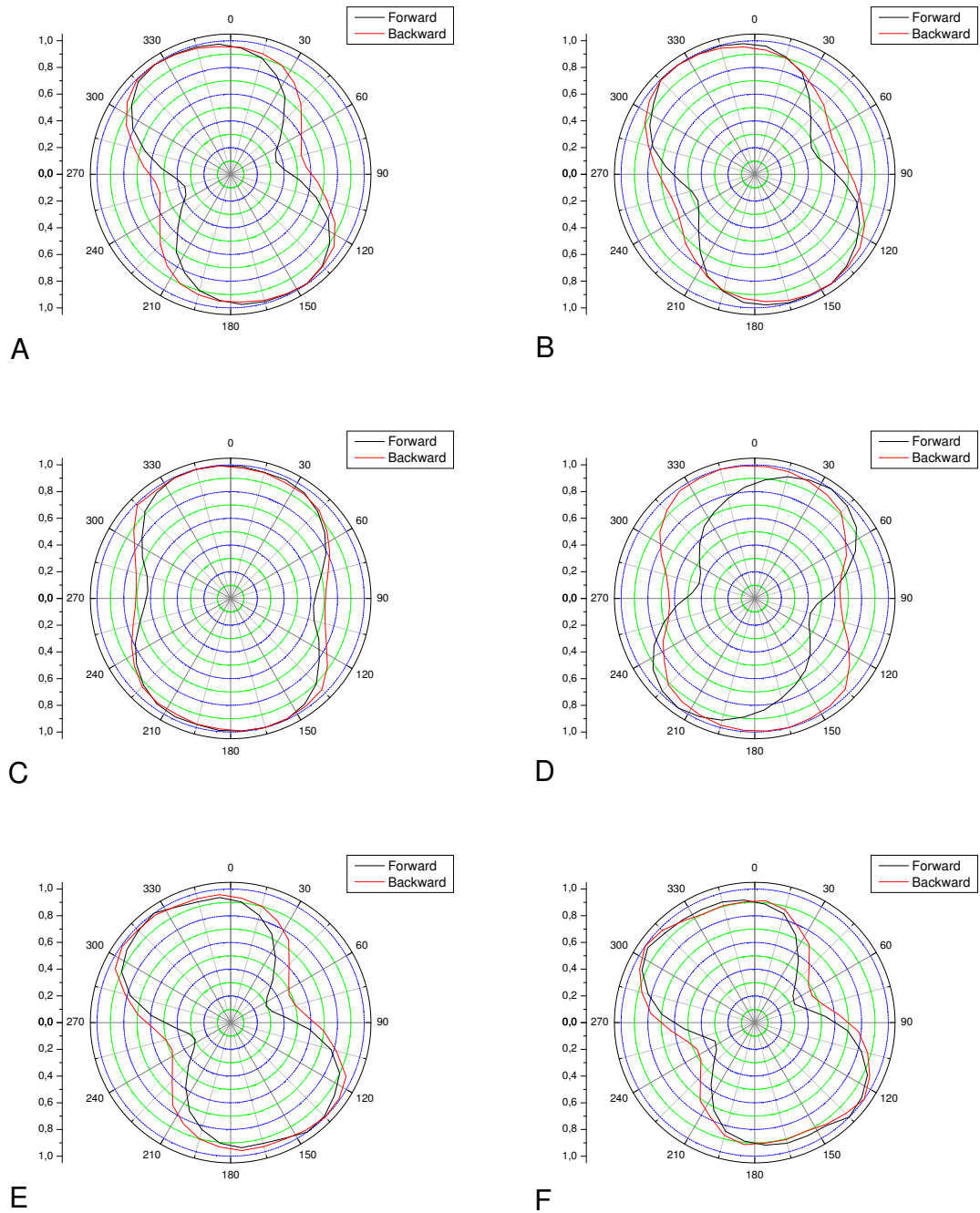


FIGURE 6.6 – Graphiques de l’intensité normalisée du signal GSH en fonction de l’angle de la polarisation du faisceau laser. Les graphiques représentent respectivement les régions a (A), d (B), c (C, D), f (E) et i (F) qui sont imagées aux figures 6.3, 6.4 et 6.5. Dans le cas de la région c, deux zones ont été utilisées pour faire l’acquisition des données. La première indiquée par la flèche à la figure 6.3 (C) et la seconde indiquée par un cercle sur cette même image dont le changement de l’intensité du signal généré par le maillage de collagène n’est pas visible à l’angle de la polarisation du faisceau laser utilisé pour acquérir l’image.

mains atteints d'ostéo-arthrite, des images de régions où le maillage de collagène a été modifié ont été acquises. Ceux-ci sont identifiables par le signal GSH plus élevé qu'ils produisent par rapport au reste du maillage de collagène. Les figures 6.3, 6.4 et 6.5 montrent certaines des régions où le maillage de collagène a été altéré. Ils ont des dimensions variant entre 100 et 500 μm^2 . Tout d'abord, ces régions ont la caractéristique de produire un signal GSH dans la direction forward plus élevé que le signal produit par le reste du maillage de collagène. Également, en observant les figures 6.3, 6.4 et 6.5 B, D et F, on remarque que le signal des régions endommagées dans la direction backward semble diminuer légèrement, contrairement au signal dans la direction forward qui augmente. De plus, une analyse de la polarisation a été effectuée en changeant l'angle de la polarisation linéaire du faisceau laser tout en gardant l'échantillon fixe. Les graphiques normalisés correspondants sont présentés à la figure 6.6. Ces graphiques démontrent, par l'angle pour lequel le signal est maximum, que l'alignement général des fibrilles dans les zones endommagées est généralement semblable à celle des zones non endommagées (voir la figure 6.2). Toutefois, parmi les régions analysées, une d'entre elles (figure 6.6 (D)) présentait une dépendance du signal différent de celui d'un maillage normal. En effet, dans la direction forward, on remarque que l'angle pour lequel le signal est maximum est différent de celui pour lequel le signal est maximum dans la direction backward. Également, on remarque dans tous les cas que le ratio entre le signal maximum et minimum est plus élevée dans la direction forward que dans la direction backward. Ceci suggère que la direction forward semble être sensible à un changement de l'organisation structurale des fibrilles de collagène dans le volume focal, qui peut être estimé à environ 1300 nm de diamètre et 1700 nm de profondeur.

6.3 Comparaison du signal GSH

Comme discuté à la section précédente, le signal GSH forward dans les zones endommagées de collagène est généralement plus élevé que dans les zones normales. Ainsi, il est important de quantifier cette augmentation du signal. Tout d'abord, il

est nécessaire de mesurer l'intensité du signal GSH dans la direction backward pour s'assurer qu'il n'y a aucune variation importante de l'intensité dans cette direction, puisqu'elle semble très peu affectée par les changements de la structure de collagène. Des mesures d'intensité ont été acquises dans la direction backward, tout d'abord dans les régions où une augmentation de l'intensité a été remarquée dans la direction forward de genoux atteints d'ostéo-arthrite, ensuite dans les régions adjacentes présentant un maillage de collagène d'apparence normal et finalement dans des échantillons de cartilage en santé. L'acquisition fut effectuée à l'angle de la polarisation où le signal GSH est maximum. Pour 10 régions analysées, les résultats sont présentés à la figure 6.7. Sur ce graphique, on remarque tout d'abord que la valeur de l'intensité dans les genoux en santé est généralement moins grande que dans les genoux malades. Ceci peut être expliqué par le fait que les échantillons utilisés étaient différents et un changement dans l'orientation de la coupe de l'échantillon ou de son état de conservation peut modifier l'intensité du signal produit. Ces changements d'intensité devraient également être présents dans la direction forward du signal (comme le prouve la figure 6.8). Ensuite, on remarque que la valeur du signal dans les parties endommagées des genoux malades est légèrement moins élevée que dans les parties normales des genoux malades. Toutefois, en général, on peut affirmer qu'il y a un écart raisonnablement bas entre les différentes valeurs du signal dans la direction backward pour les deux types de genoux. L'intensité du signal dans la direction forward a également été acquise dans les mêmes régions que celles qui ont été utilisées pour effectuer notre analyse dans la direction backward. Les résultats sont présentés à la figure 6.8. Tout d'abord, comme dans la direction backward, l'intensité du signal GSH dans les genoux sains est moins élevée que dans les genoux endommagés, confirmant que cette perte d'intensité est probablement due à l'état des échantillons et non au fait qu'il n'est pas affecté par l'ostéo-arthrite. Ensuite, on remarque que l'intensité du signal dans les régions endommagées des genoux malades est significativement plus élevée qu'ailleurs dans le tissu.

Toutefois, pour obtenir une mesure adéquate de l'augmentation du signal dans les régions endommagées, il est nécessaire de faire la mesure du ratio du signal dans la

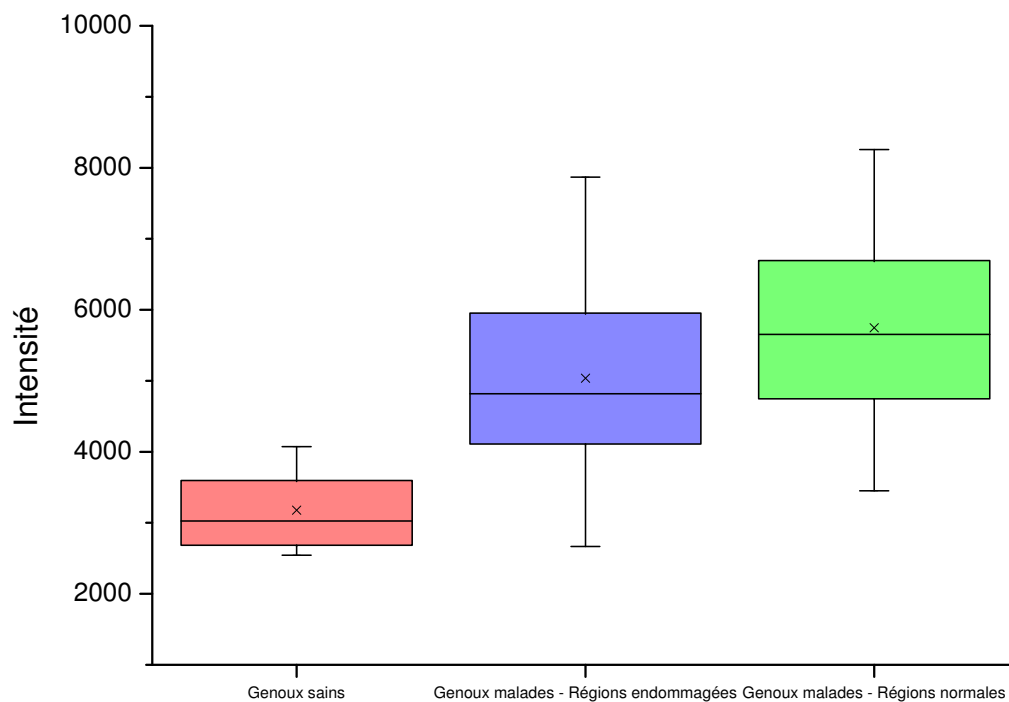


FIGURE 6.7 – Graphique du signal GSH acquis dans la direction backward dans des régions endommagées (bleu) et normales (vert) de genoux malades, et des régions normales de genoux en santé (rouge). Les données correspondent à la moyenne du signal dans les zones analysées. Dix régions ont été acquises par série.

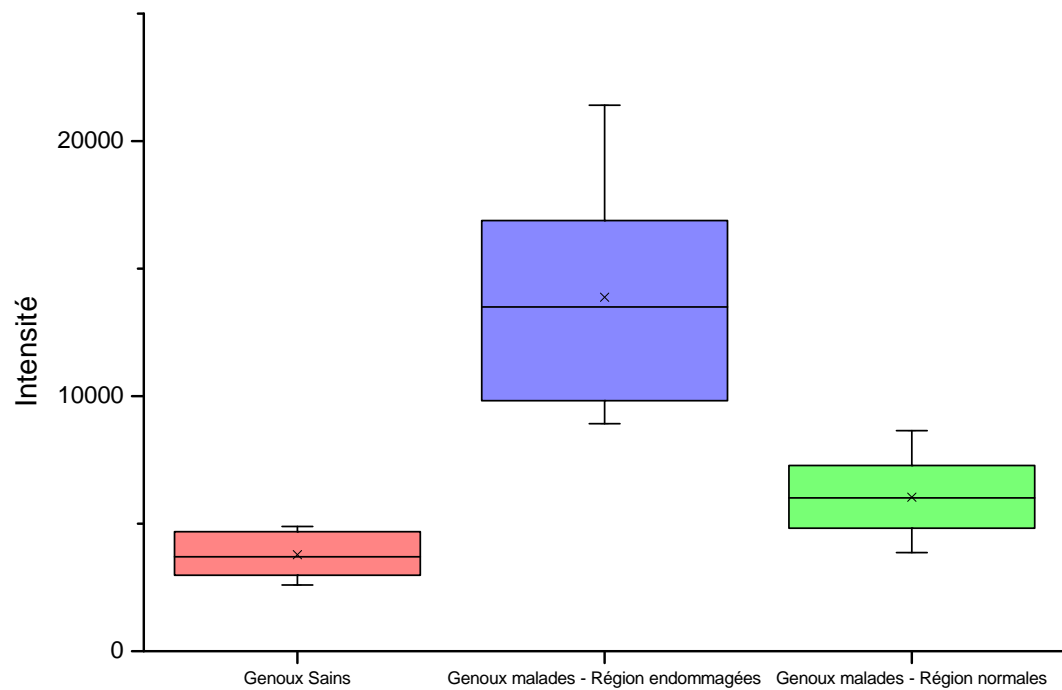


FIGURE 6.8 – Graphique du signal GSH acquis dans la direction forward dans des régions endommagées (bleu) et normales (vert) de genoux malades, et des régions normales de genoux en santé (rouge). Les données correspondent à la moyenne du signal dans les zones analysées. Dix régions ont été acquises par série.

direction forward sur celui dans la direction backward. Étant donné que les chemins optiques menant aux détecteurs servant à acquérir le signal GSH dans les directions forward et backward sont différents, la proportion des pertes qui en découle est également différente. Dans le but de pallier ce problème, une calibration a tout d'abord été effectuée. Nous avons utilisé un agent fluorescent (coumarin 440) qui émet du signal de manière isotrope. Ainsi, le signal GSH dans les directions forward et backward est calibré de manière à ce qu'il soit proportionnel à l'intensité du signal de fluorescence que chaque direction de détection reçoit. Le graphique présentant les ratios forward/backward pour les régions analysées est présenté à la figure 6.9. Tout d'abord, on remarque que le ratio forward/backward est semblable dans les régions normales des genoux malades et dans les genoux en santé. Également, on remarque que le ratio forward/backward des régions endommagées des genoux malades est beaucoup plus élevé que dans les régions normales des genoux malades et sains. Ceci confirme le fait que la modification du maillage de collagène cause une augmentation du signal dans la direction forward sans affecter (ou affectant très peu) le signal dans la direction backward.

Les résultats présentés aux sections 6.2 et 6.3 peuvent être expliqués par la formation de regroupements de fibrilles tel que présenté à la figure 5.3. Il est connu que les fibrilles se regroupent pour former des agrégats lorsque l'articulation est atteinte d'ostéo-arthrite [1]. De plus, il est connu que la phase du $\chi^{(2)}$ varie d'une fibrille à l'autre dans le tissu (variation de 180 degrés) [23]. Étant donné que dans la direction forward, le terme de l'accord de phase est très près de zéro ($\Delta k = 2k_1 - k_2 \approx 0$), la longueur de cohérence ($L_{coh} = 2/\Delta k$) est très élevée et une augmentation de la longueur (L) où il y a génération de signal GSH dans le volume focale (donc une augmentation de la taille des regroupements de fibrilles) cause une augmentation du signal dans la direction forward puisque $L < L_{coh}$. Pour expliquer l'augmentation du signal dans la direction forward dans les régions endommagées, nous émettons l'hypothèse que les fibrilles ayant un même $\chi^{(2)}$ s'assemblent. Ceci aurait pour effet d'augmenter la longueur L où il y a génération de signal de manière cohérente et, par le fait même, l'intensité du signal dans la direction forward. Si les fibrilles

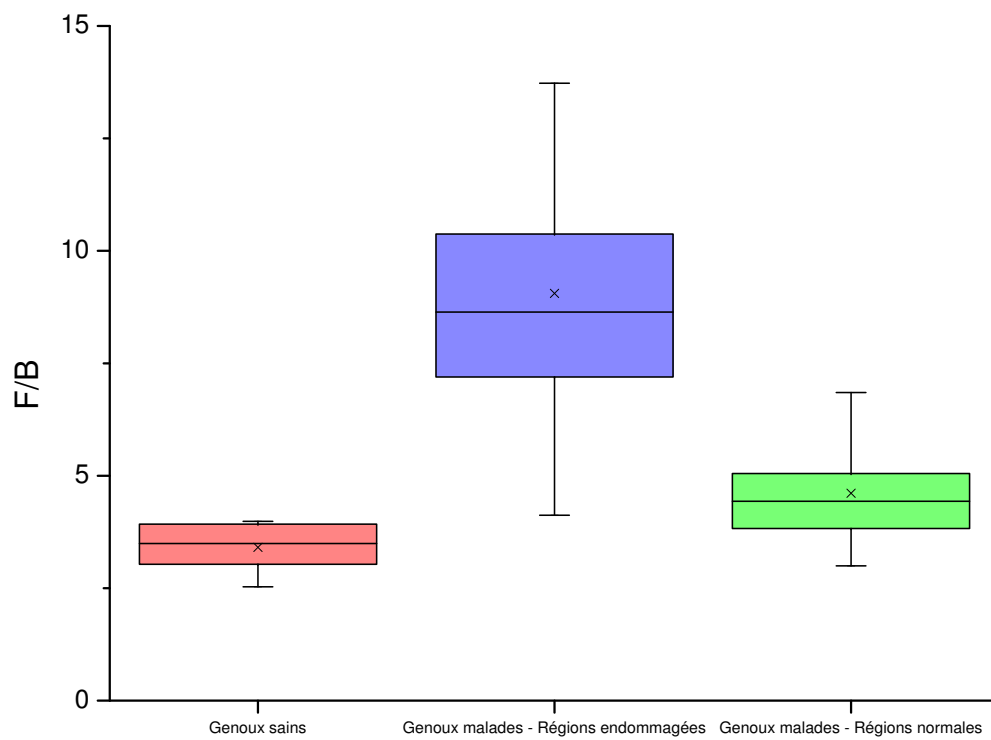


FIGURE 6.9 – Ratio normalisé du signal dans la direction forward et backward dans des régions endommagées (bleu) et normales (vert) de genoux malades et des régions normales de genoux en santé (rouge). Les données correspondent à la moyenne du signal dans les zones analysées. Dix régions ont été acquises par série.

n'ont pas le même $\chi^{(2)}$, on ne retrouverait pas d'addition cohérente du signal dans la direction forward et aucune augmentation du signal GSH ne serait observée. Toutefois, dans la direction backward, le vecteur d'onde k_2 se propage dans la direction inverse au faisceau pompe et le terme de l'accord de phase n'est pas proche de zéro ($\Delta k = 2k_1 + k_2 \neq 0$). Ceci fait en sorte que la longueur de cohérence L_{coh} est très faible (plus faible que le diamètre d'une fibrille) et une augmentation de la génération du signal de seconde harmonique ne fait qu'augmenter l'interférence destructive déjà présente. Ces regroupements de fibrilles sont donc invisibles dans la direction backward et il y a donc moins de fibrilles contribuant à la production du signal, réduisant l'intensité de signal de seconde harmonique produit dans cette direction. Si ces regroupements de fibrilles ont une orientation différente par rapport au reste du maillage de collagène, la dépendance en polarisation dans la direction forward devrait être différent du reste du maillage (puisque qu'une grande partie du signal provient des regroupements de fibrilles) et le signal dans la direction backward devrait rester inchangé, tel qu'observé à la figure 6.6(D).

6.4 Simulations numériques

Des simulations numériques furent exécutées par l'équipe du professeur Lora Ramunno dans le but d'expliquer les changements dans l'intensité du signal pour les régions endommagées des genoux malades, et ce, afin de valider notre hypothèse discutée à la section précédente. Ces simulations ont été réalisées en utilisant la méthode basée sur les fonctions de Green [78]. Premièrement, la figure 6.11 montre le graphique du ratio des intensités dans la direction forward et backward en fonction du ratio de remplissage (proportion du volume occupé par les fibrilles de collagène) dans une région saine du tissu (configuration des fibrilles présentée à la figure 6.10a). On voit ainsi que la modification du ratio de remplissage ne change pas la valeur du ratio forward/backward. Toutefois, on voit que le diamètre des fibrilles change la valeur de ce ratio. Ainsi, plus le diamètre des fibrilles est grand, plus la valeur du ratio forward/backward augmente. Deuxièmement, la figure 6.12 montre le graphique du

ratio forward/backward dans un tissu endommagé en fonction du nombre de fibrilles regroupées ensemble et qui ont le même $\chi^{(2)}$ (configuration des fibrilles présentée à la figure 6.10b). On voit ainsi que l'augmentation du nombre de fibrilles par regroupement augmente considérablement le ratio forward/backward. Cet effet est d'autant plus prononcé lorsque le diamètre des fibrilles est élevé. En analysant l'intensité du signal individuellement dans chaque direction, il est possible de mieux comprendre ces résultats. Ainsi, les figures 6.13 et 6.14 montrent le signal GSH dans la direction forward et backward respectivement en fonction du ratio de remplissage dans un maillage normal de collagène. Les différentes courbes représentent les résultats pour plusieurs valeurs du diamètre des fibrilles. On voit ainsi que l'augmentation du signal se fait de manière constante dans les deux directions en fonction du ratio de remplissage, rendant ainsi le ratio forward/backward invariable en fonction du ratio de remplissage mais dépendant que du diamètre des fibrilles. La figure 6.15 montre le signal GSH dans la direction forward en fonction du nombre de fibrilles par regroupement pour un ratio de remplissage de 0,35. Les différentes courbes montrent les résultats pour différentes valeurs du diamètre des fibrilles (le diamètre d'une fibrille de collagène est typiquement entre 10 et 100 nm [47]). Ces courbes montrent une augmentation du signal GSH lorsque des agrégats de fibrilles sont formés (N_b augmente), ce qui concorde avec les simulations présentés à la figure 6.12.

Également, nos résultats expérimentaux présentés sous forme du graphique du signal GSH backward pour différents types de tissus présent à la figure 6.7 montrent une légère diminution du signal GSH dans la direction backward dans les régions endommagées comparativement aux régions saines adjacentes. Les simulations numériques présentées à la figure 6.16 montre le graphique du signal GSH dans la direction backward en fonction du nombre de fibrilles par regroupement dans le volume focal pour différentes valeurs du diamètre des fibrilles à un ratio de remplissage de 0,35. En les observant, on remarque que le signal diminue à mesure que le nombre de fibrilles augmente, ce qui concorde avec nos résultats expérimentaux. Ainsi, le ratio du signal dans la direction forward sur celui dans la direction backward augmente considérablement avec l'augmentation du nombre de fibrilles dans un regroupement, de par

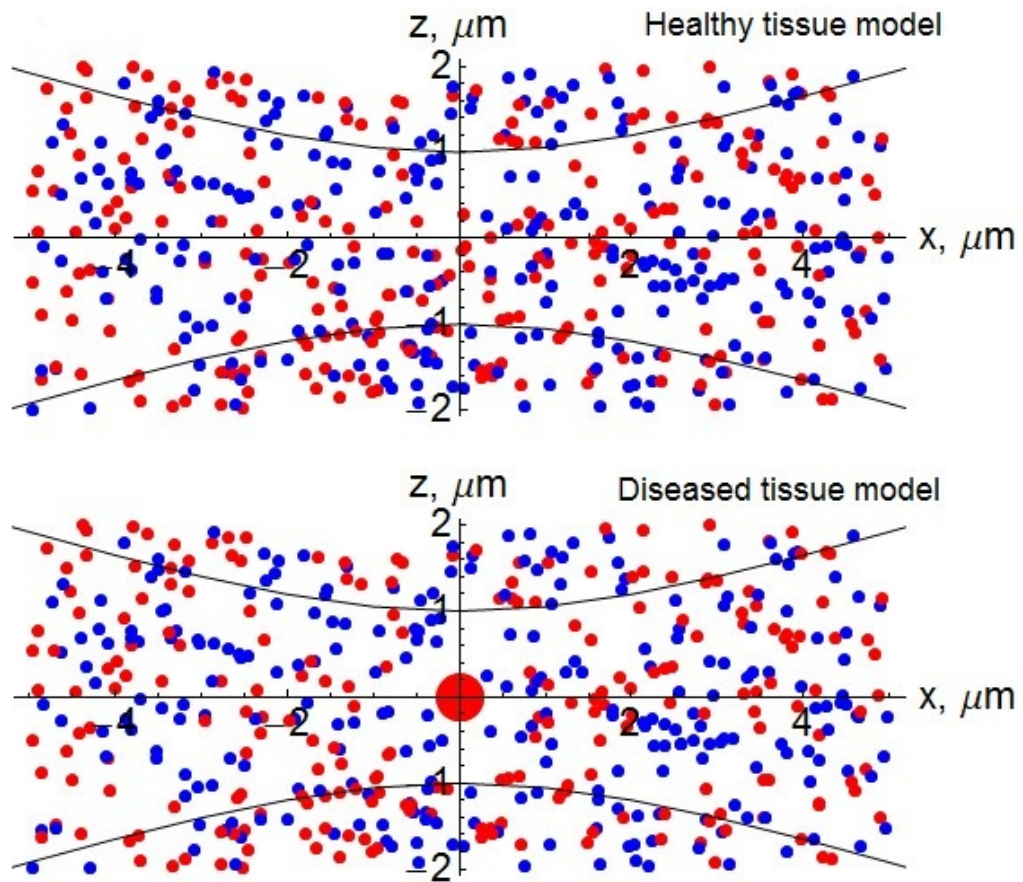


FIGURE 6.10 – Représentation du volume occupé par les fibrilles dans le volume focal dans un tissu (haut de l'image) sain et (bas de l'image) atteint d'ostéo-arthrite (caractérisé par la formation de regroupements de fibrilles tel que celui schématisé au centre de l'image). Les fibrilles en rouge sont celles ayant le même $\chi^{(2)}$ et les fibrilles en bleu sont celles ayant un $\chi^{(2)}$ de signe opposé.

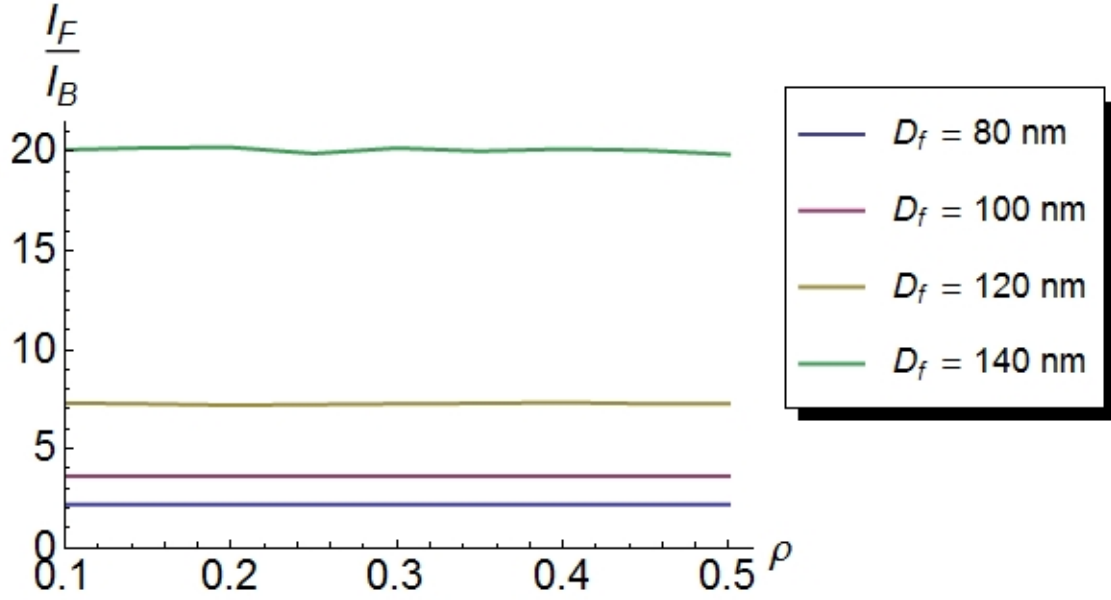


FIGURE 6.11 – Graphique des résultats des simulations numériques utilisant les fonctions de Green du ratio de l'intensité dans la direction forward sur celle dans la direction backward dans un maillage normale de collagène en fonction du ratio de remplissage ρ . Les différentes courbes montrent les résultats pour différentes valeurs du diamètre des fibrilles D_f .

l'augmentation du signal dans la direction forward et la légère diminution du signal dans la direction backward. Ceci confirme l'hypothèse discutée à la section 6.3.

Pour conclure, dans ce chapitre, nous avons fait l'analyse d'échantillons minces de collagène provenant de cartilage articulaire de genoux atteints d'ostéo-arthrite et en santé. En nous appuyant sur des simulations numériques, nous avons découvert que les fibrilles du maillage de collagène atteint d'ostéo-arthrite forment des regroupements de fibrilles dans des régions localisées du maillage de collagène. Ceci se remarque tout d'abord par une augmentation du signal GSH dans la direction forward grâce à l'amélioration des conditions d'accord de phase pour la génération du signal GSH via la formation de regroupements de fibrilles partageant le même $\chi^{(2)}$ de l'accord de phase du signal des fibrilles formant le regroupement. Ensuite, une légère diminution du signal GSH dans la direction backward est observée à cause de la diminution de la condition d'accord de phase dans cette direction, provoquée par la formation d'agrégats de fibrilles.

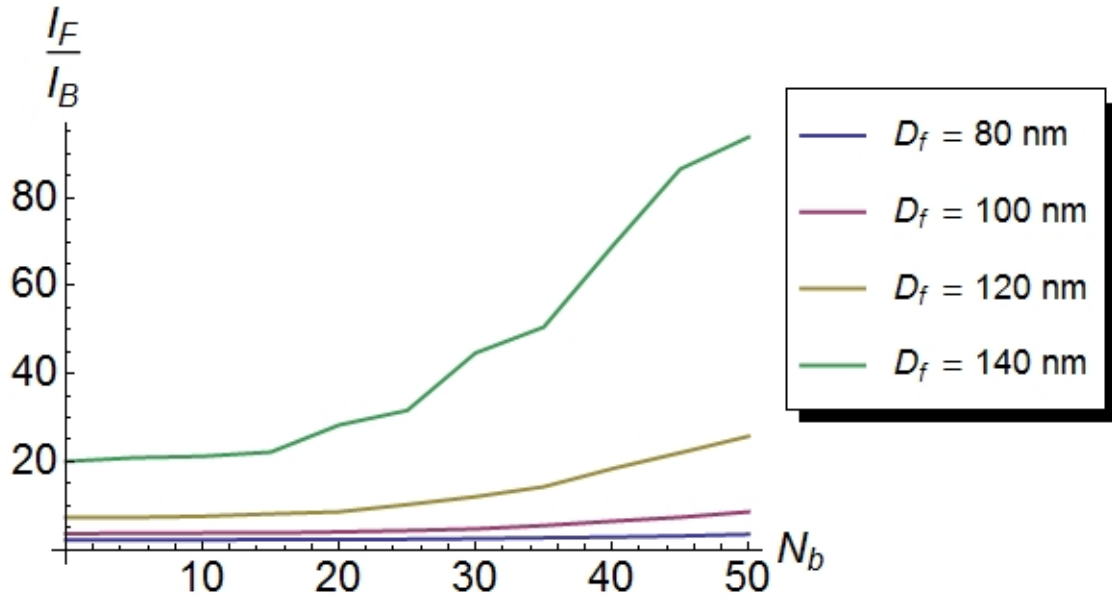


FIGURE 6.12 – Graphique des résultats des simulations numériques utilisant les fonctions de Green du ratio de l'intensité dans la direction forward sur celle dans la direction backward dans un maillage endommagé de collagène en fonction du nombre de fibrilles pour un ratio de remplissage $\rho=0,35$. Les différentes courbes montrent les résultats pour différentes valeurs du diamètre des fibrilles D_f .

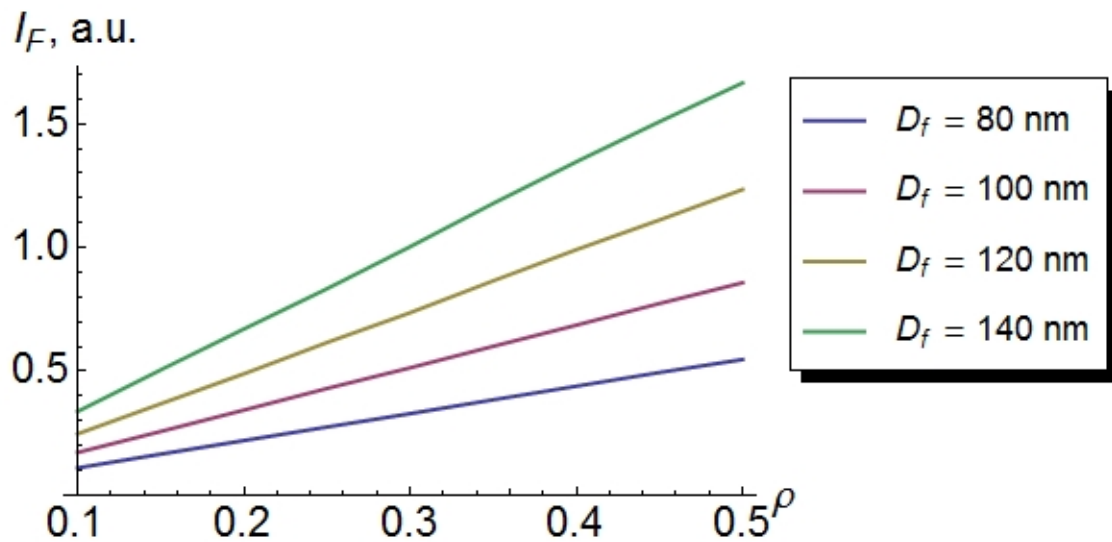


FIGURE 6.13 – Graphique des résultats des simulations numériques utilisant les fonctions de Green de l'intensité du signal GSH dans la direction forward en fonction du ratio de remplissage pour un tissu normal. Les différentes courbes montrent les résultats pour différentes valeurs du diamètre des fibrilles D_f .

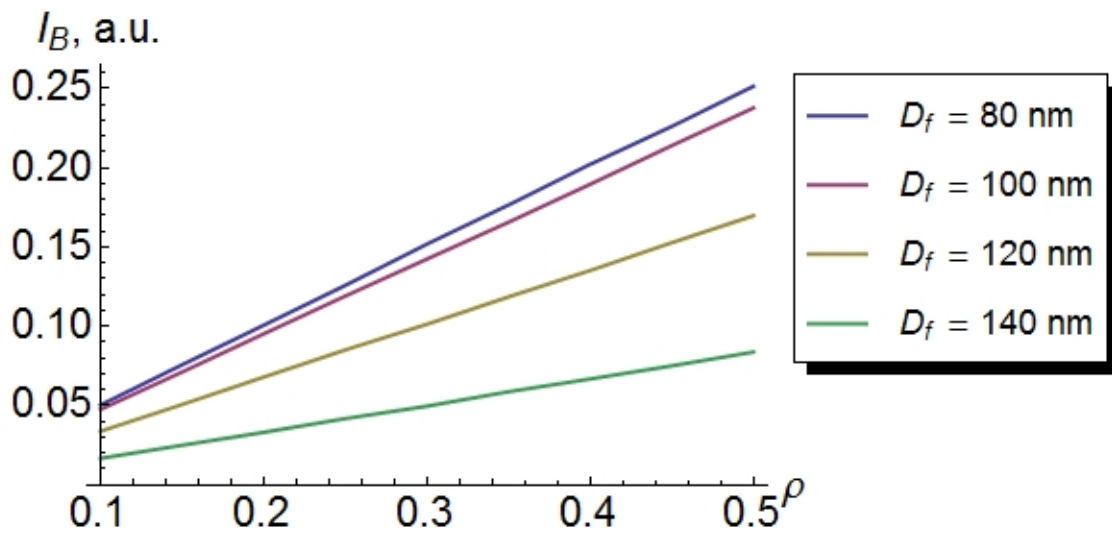


FIGURE 6.14 – Graphique des résultats des simulations numériques utilisant les fonctions de Green de l'intensité du signal GSH dans la direction backward en fonction du ratio de remplissage pour un tissu normal. Les différentes courbes montrent les résultats pour différentes valeurs du diamètre des fibrilles D_f .

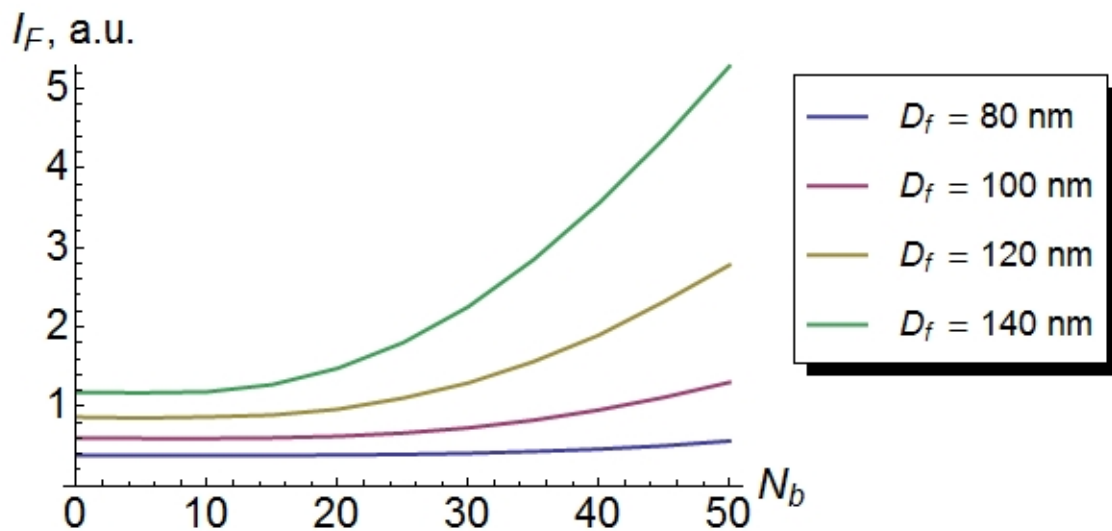


FIGURE 6.15 – Graphique des résultats des simulations numériques utilisant les fonctions de Green de l'intensité du signal GSH dans la direction forward en fonction du nombre de fibrilles par regroupement N_b dans un tissu endommagé à un ratio de remplissage de $\rho=0,35$. Les différentes courbes montrent les résultats pour différentes valeurs du diamètre des fibrilles D_f .

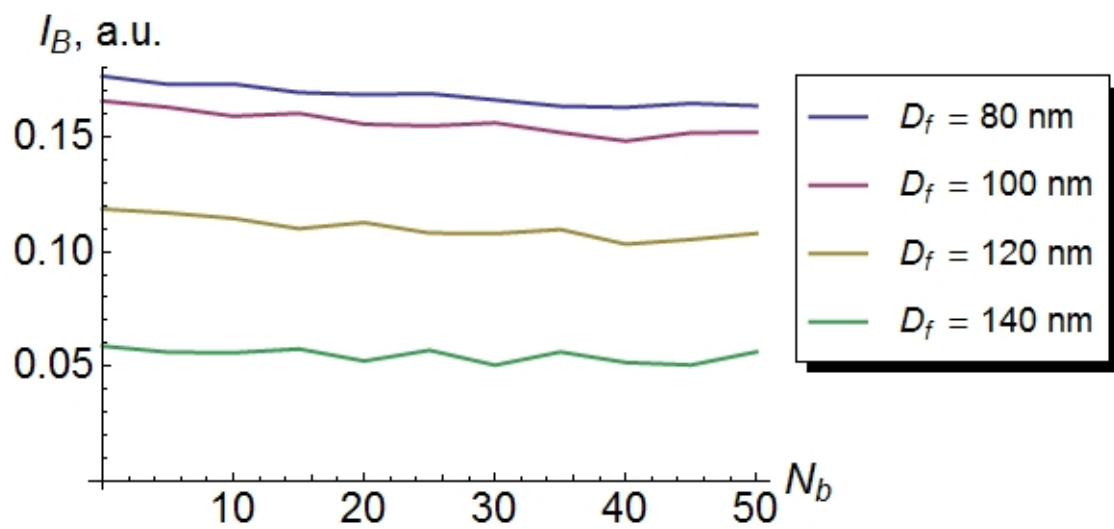


FIGURE 6.16 – Graphique des résultats des simulations numériques utilisant les fonctions de Green de l'intensité du signal GSH dans la direction backward en fonction du nombre de fibrilles par regroupement N_b dans un tissu endommagé à un ratio de remplissage de $\rho=0,35$. Les différentes courbes montrent les résultats pour différentes valeurs du diamètre des fibrilles D_f .

Chapitre 7

Conclusion

Ce mémoire de maîtrise présente les résultats obtenus dans le cadre des recherches sur l'imagerie du cartilage articulaire à l'aide de la microscopie GSH. La microscopie GSH permet d'imager les fibrilles de collagène, le principal élément de la matrice extracellulaire du cartilage, grâce à sa structure non centrosymétrique. Ces recherches ont pour but principal d'étudier les mécanismes menant à la dégradation du maillage de collagène lorsqu'une articulation est atteinte d'ostéo-arthrite et de mieux comprendre le processus de génération de signal de seconde harmoniques dans le collagène.

Tout d'abord, nous avons étudié la surface du cartilage articulaire à l'aide d'échantillons épais provenant de genoux de bovins. Nous avons ainsi constaté que la modification du maillage de collagène, qui est caractéristique d'une progression de l'ostéo-arthrite, débute à la surface du cartilage pour se propager vers les régions plus profondes. Également, nous avons observé que des concentrations de contraintes sur la surface du cartilage créent un alignement des fibrilles de collagène sur leur structure et mènent à la formation de regroupements de plusieurs fibrilles de manière irréversible [12].

Par la suite, nous avons étudié le signal de seconde harmonique produit par des échantillons minces de régions profondes de cartilage articulaire provenant de genoux humains. Nous avons ainsi fait l'acquisition d'images montrant des régions où le maillage de collagène est endommagé, montrant un signal plus élevé dans la di-

rection forward (direction de propagation du laser) et légèrement moins élevé dans la direction backward. À l'aide de simulations numériques, nous avons découvert que la formation de regroupements de fibrilles dans le maillage de collagène améliore les conditions d'accord de phase dans la direction forward via la formation de regroupements de fibrilles partageant le même $\chi^{(2)}$, ce qui augmente l'intensité du signal GSH. Dans la direction backward, les fibrilles qui forment le regroupement produisent peu de signal puisque l'augmentation de la longueur d'interaction entre le laser et le collagène crée de l'interférence destructive dans le signal généré et moins de fibrilles contribuent à la formation de signal GSH dans le volume focale.

Ces recherches ont permis de prouver que la microscopie GSH est une technique efficace pour imager le cartilage articulaire et plus spécifiquement la structure de collagène qui le constitue. Étant donné que la modification de ce dernier est un élément clé dans la progression de l'ostéo-arthrite, la possibilité d'utiliser la microscopie GSH en tant qu'outil d'observation et de diagnostic *in-vivo* pourrait être étudiée.

Bibliographie

- [1] N. Broom, M.-H. Chen, and A. Hardy, "A degeneration-based hypothesis for interpreting fibrillar changes in the osteoarthritic cartilage matrix," *Journal of Anatomy*, vol. 199, pp. 683–698, 2001.
- [2] G. Dodge and A. Poole, "Immunohistochemical detection and immunochemical analysis of type ii collagen degradation in human normal, rheumatoid, and osteoarthritic articular cartilages and in explants of bovine articular cartilage cultured with interleukin 1.," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 83, no. 2, p. 647, 1989.
- [3] L. Setton, D. Elliott, and V. Mow, "Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis : human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration," *Osteoarthritis and cartilage*, vol. 7, no. 1, pp. 2–14, 1999.
- [4] C. P. Brown, *Developpement and synthesis of innovative approaches to the surgical assessment of articular cartilage degeneration*. PhD thesis, Queensland University of Technology, 2008.
- [5] W. Shingleton, T. Cawston, D. Hodges, and P. Brick, "Collagenase : a key enzyme in collagen turnover," *Biochemistry and cell biology*, vol. 74, no. 6, pp. 759–775, 1996.
- [6] K. Brandt, M. Doherty, and L. Lohmander, *Osteoarthritis*. Oxford University Press, 2003.
- [7] E. Hunziker, "Articular cartilage repair : basic science and clinical progress. a review of the current status and prospects," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 10, no. 6, pp. 432–463, 2002.
- [8] R. Appleyard, M. Swain, S. Khanna, and G. Murrell, "The accuracy and reliability of a novel handheld dynamic indentation probe for analysing articular cartilage," *Physics in medicine and biology*, vol. 46, p. 541, 2001.
- [9] N. Broom, "An enzymatically induced structural transformation in articular cartilage. its significance with respect to matrix breakdown," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 31, no. 2, pp. 210–218, 1988.

- [10] A. Hollander, I. Pidoux, A. Reiner, C. Rorabeck, R. Bourne, and A. Poole, "Damage to type ii collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration.," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 96, no. 6, p. 2859, 1995.
- [11] J. Price, S. Till, D. Bickerstaff, M. Bayliss, and A. Hollander, "Degradation of cartilage type ii collagen precedes the onset of osteoarthritis following anterior cruciate ligament rupture," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 42, no. 11, pp. 2390–2398, 1999.
- [12] C. Brown, M. Houle, M. Chen, A. Price, F. Légaré, and H. Gill, "Damage initiation and progression in the cartilage surface probed by nonlinear optical microscopy," *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 2011.
- [13] K. Brandt, M. Doherty, and L. Lohmander, *Osteoarthritis*, ch. 11. Oxford University Press, 2003.
- [14] A. Jeffery, G. Blunn, C. Archer, and G. Bentley, "Three-dimensional collagen architecture in bovine articular cartilage," *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume*, vol. 73, no. 5, p. 795, 1991.
- [15] A. Jeffrey, G. Blunn, C. Archer, and G. Bentley, "Three-dimensional collagen architecture in bovine articular cartilage," *The Journal of Bone and Joint Surgery*, vol. 473, pp. 795–801, 1991.
- [16] J. C. Mansfield, C. P. Winlove, J. Moger, and S. J. Matcher, "Collagen fiber arrangement in normal and diseased cartilage studied by polarization sensitive nonlinear microscopy," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 13, p. 044020, July/August 2008.
- [17] W. Mohler, A. Millard, and P. Campagnola, "Second harmonic generation imaging of endogenous structural proteins," *Methods*, vol. 29, no. 1, pp. 97–109, 2003.
- [18] P. Campagnola, L. Loew, *et al.*, "Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms," *Nature biotechnology*, vol. 21, no. 11, pp. 1356–1360, 2003.
- [19] F. Helmchen and W. Denk, "Deep tissue two-photon microscopy," *Nature methods*, vol. 2, no. 12, pp. 932–940, 2005.
- [20] D. Dombek, K. Kasischke, H. Vishwasrao, M. Ingelsson, B. Hyman, and W. Webb, "Uniform polarity microtubule assemblies imaged in native brain tissue by second-harmonic generation microscopy," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 12, p. 7081, 2003.
- [21] F. Légaré, C. Pfeffer, and B. Olsen, "The role of backscattering in shg tissue imaging," *Biophysical journal*, vol. 93, no. 4, pp. 1312–1320, 2007.

- [22] C. Pfeffer, B. Olsen, F. Ganikhanov, and F. Légaré, “Multimodal nonlinear optical imaging of collagen arrays,” *Journal of structural biology*, vol. 164, no. 1, pp. 140–145, 2008.
- [23] M. Rivard, M. Laliberté, A. Bertrand-Grenier, C. Harnagea, C. Pfeffer, M. Vallières, Y. St-Pierre, A. Pignolet, M. El Khakani, and F. Légaré, “The structural origin of second harmonic generation in fascia,” *Biomedical optics express*, vol. 2, no. 1, pp. 26–36, 2011.
- [24] S. Chu, S. Tai, C. Sun, and C. Lin, “Selective imaging in second-harmonic-generation microscopy by polarization manipulation,” *Applied Physics Letters*, vol. 91, p. 103903, 2007.
- [25] C. Odin, Y. Le Grand, A. Renault, L. Gailhouste, and G. Baffet, “Orientation fields of nonlinear biological fibrils by second harmonic generation microscopy,” *Journal of Microscopy*, vol. 229, no. 1, pp. 32–38, 2008.
- [26] R. M. Williams and W. R. Z. ans Watt W. Webb, “Interpreting second-harmonic generation images of collagen i fibrils,” *Biophysical Journal*, vol. 88, pp. 1377–1386, February 2005.
- [27] P. Stoller, K. Reiser, P. Celliers, and A. Rubenchik, “Polarization-modulated second harmonic generation in collagen,” *Biophysical journal*, vol. 82, no. 6, pp. 3330–3342, 2002.
- [28] T. Yasui, Y. Tohno, and T. Araki, “Determination of collagen fiber orientation in human tissue by use of polarization measurement of molecular second-harmonic-generation light,” *Applied Optics*, vol. 43, pp. 2861–2867, May 2004.
- [29] G. Cox, P. Xu, C. Sheppard, J. Ramshaw, and E. Unit, “Characterization of the second harmonic signal from collagen,” in *Proc. of SPIE Vol*, vol. 4963, p. 33, 2003.
- [30] W. Zipfel, R. Williams, W. Webb, *et al.*, “Nonlinear magic : multiphoton microscopy in the biosciences,” *Nature biotechnology*, vol. 21, no. 11, pp. 1369–1377, 2003.
- [31] G. Cox, E. Kable, A. Jones, I. Fraser, F. Manconi, and M. Gorrell, “3-dimensional imaging of collagen using second harmonic generation,” *Journal of structural biology*, vol. 141, no. 1, pp. 53–62, 2003.
- [32] W. Chen, T. Li, P. Su, C. Chou, P. Fwu, S. Lin, D. Kim, P. So, and C. Dong, “Second harmonic generation χ tensor microscopy for tissue imaging,” *Applied Physics Letters*, vol. 94, p. 183902, 2009.
- [33] I. Freund, M. Deutsch, and A. Sprecher, “Connective tissue polarity. optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon,” *Biophysical journal*, vol. 50, no. 4, pp. 693–712, 1986.

- [34] T. Yasui, K. Sasaki, Y. Tohno, and T. Araki, "Tomographic imaging of collagen fiber orientation in human tissue using depth-resolved polarimetry of second-harmonic-generation light," *Optical and quantum electronics*, vol. 37, no. 13, pp. 1397–1408, 2005.
- [35] R. Williams, W. Zipfel, and W. Webb, "Multiphoton microscopy in biological research," *Current opinion in chemical biology*, vol. 5, no. 5, pp. 603–608, 2001.
- [36] S. Zhuo, J. Chen, T. Luo, H. Chen, and J. Zhao, "High-contrast multimodel nonlinear optical imaging of collagen and elastin," in *Journal of Physics : Conference Series*, vol. 48, p. 1476, IOP Publishing, 2007.
- [37] P. Xu, E. Kable, C. Sheppard, and G. Cox, "A quasi-crystal model of collagen microstructure based on shg microscopy," *Chinese Optics Letters*, vol. 8, no. 2, pp. 213–216, 2010.
- [38] A. T. Yeh, M. J. Hammer-Wilson, D. C. V. Sickle, H. P. Benton, A. Zoumi, B. J. Tromberg, and G. M. Peavy, "Nonlinear optical microscopy of articular cartilage," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 13, pp. 345–352, 2005.
- [39] S. J. Matcher, "A review of some recent developments in polarization-sensitive optical imaging techniques for the study of articular cartilage," *Journal of Applied Physics*, vol. 105, p. 102041, 2009.
- [40] E. Werkmeister, N. De Isla, P. Netter, J. Stoltz, and D. Dumas, "Collagenous extracellular matrix of cartilage submitted to mechanical forces studied by second harmonic generation microscopy," *Photochemistry and photobiology*, vol. 86, no. 2, pp. 302–310, 2010.
- [41] K. Brockbank, W. MacLellan, J. Xie, S. Hamm-Alvarez, Z. Chen, and K. Schenke-Layland, "Quantitative second harmonic generation imaging of cartilage damage," *Cell and tissue banking*, vol. 9, no. 4, pp. 299–307, 2008.
- [42] C. R. Chu, N. J. Izzo, and J. J. Irrgang, "Clinical diagnosis of potentially treatable early articular cartilage degeneration using optical coherence tomography," *J. Biomed. Opt.*, vol. 12, p. 051703, Oct 2007.
- [43] L. Gartner and H. J.L., *Color Textbook of Histology*, pp. 73–78. Saunder, 2006.
- [44] A. Benninghoff, "Form und bau der gelenknorpel in ihren beziehungen zur funktion," *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, vol. 2, pp. 783–825, 1925.
- [45] T. Vinardell, V. Dejica, A. Poole, J. Mort, H. Richard, and S. Lavery, "Evidence to suggest that cathepsin k degrades articular cartilage in naturally occurring equine osteoarthritis," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 17, no. 3, pp. 375–383, 2009.
- [46] L. Gartner and H. J.L., *Color Textbook of Histology*, pp. 131–136. Saunder, 2006.

- [47] J. Lane and C. Weiss, "Review of articular cartilage collagen research," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 18, no. 6, pp. 553–562, 2005.
- [48] A. Fosang, "Proteinases and oa." <http://primer.oarsi.org>, 2011.
- [49] L. Gartner and H. J.L., *Color Textbook of Histology*, pp. 136–156. Saunder, 2006.
- [50] K. Brandt, M. Doherty, and L. Lohmander, *Osteoarthritis*, ch. 1. Oxford University Press, 2003.
- [51] D. M. Slater, J. A. Buckwalter, and L. J. Sandell, "Chapter 4 : Pathology of oa." <http://primer.oarsi.org>, 2011.
- [52] K. Brandt, M. Doherty, and L. Lohmander, *Osteoarthritis*, ch. 7. Oxford University Press, 2003.
- [53] P. Prasad, *Introduction to biophotonics*, pp. 143–147. John Wiley and Sons, 2003.
- [54] P. Franken, A. Hill, C. Peters, and G. Weinreich, "Generation of optical harmonics," *Physical Review Letters*, vol. 7, no. 4, pp. 118–119, 1961.
- [55] C. Sheppard and R. Kompfner, "Resonant scanning optical microscope," *Applied optics*, vol. 17, no. 18, pp. 2879–2882, 1978.
- [56] I. Freund and M. Deutsch, "Second-harmonic microscopy of biological tissue," *Optics letters*, vol. 11, no. 2, pp. 94–96, 1986.
- [57] P. Prasad, *Introduction to biophotonics*, ch. 7. John Wiley and Sons, 2003.
- [58] P. Prasad, *Introduction to biophotonics*, pp. 241–242. John Wiley and Sons, 2003.
- [59] P. Prasad, *Introduction to biophotonics*, p. 243. John Wiley and Sons, 2003.
- [60] D. Débarre, W. Supatto, A. Pena, A. Fabre, T. Tordjmann, L. Combettes, M. Schanne-Klein, and E. Beaurepaire, "Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy," *Nature Methods*, vol. 3, no. 1, pp. 47–53, 2005.
- [61] M. Muller, I. Squier, K. Wilson, and G. Brakenhoff, "3d microscopy of transparent objects using third-harmonic generation," *Journal of microscopy*, vol. 191, pp. 266–274, 1998.
- [62] D. Yelin, Y. Silberberg, *et al.*, "Laser scanning third-harmonic-generation microscopy in biology," *Opt. Express*, vol. 5, no. 8, pp. 169–175, 1999.
- [63] P. Prasad, *Introduction to biophotonics*, pp. 148–149. John Wiley and Sons, 2003.
- [64] P. Prasad, *Introduction to biophotonics*, pp. 243–244. John Wiley and Sons, 2003.

- [65] A. Zumbusch, G. Holtom, and X. Xie, "Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-stokes raman scattering," *Physical Review Letters*, vol. 82, no. 20, pp. 4142–4145, 1999.
- [66] M. Muller, J. Squier, C. De Lange, G. Brakenhoff, *et al.*, "Cars microscopy with folded boxcars phasematching," *Journal of microscopy*, vol. 197, p. 150, 2000.
- [67] M. Hashimoto, T. Araki, and S. Kawata, "Molecular vibration imaging in the fingerprint region by use of coherent anti-stokes raman scattering microscopy with a collinear configuration," *Optics letters*, vol. 25, no. 24, pp. 1768–1770, 2000.
- [68] J. Cheng, A. Volkmer, D. Lewis, and X. Xie, "An epi-detected coherent anti-stokes raman scattering (e-cars) microscope with high spectral resolution and high sensitivity," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 105, no. 7, pp. 1277–1280, 2001.
- [69] A. Volkmer, J. Cheng, and X. Sunney Xie, "Vibrational imaging with high sensitivity via epidetected coherent anti-stokes raman scattering microscopy," *Physical Review Letters*, vol. 87, no. 2, p. 23901, 2001.
- [70] E. Potma, C. Evans, and X. Xie, "Heterodyne coherent anti-stokes raman scattering (cars) imaging," *Optics letters*, vol. 31, no. 2, pp. 241–243, 2006.
- [71] H. Wang, Y. Fu, P. Zickmund, R. Shi, and J. Cheng, "Coherent anti-stokes raman scattering imaging of axonal myelin in live spinal tissues," *Biophysical Journal*, vol. 89, no. 1, pp. 581–591, 2005.
- [72] E. Bélanger, S. Bégin, S. Laffray, Y. De Koninck, R. Vallée, and D. Côté, "Quantitative myelin imaging with coherent anti-stokes raman scattering microscopy : alleviating the excitation polarization dependence with circularly polarized laser beams," *Optics Express*, vol. 17, no. 21, pp. 18419–18432, 2009.
- [73] D. Rhee, D. Greenfield, P. Chen, and J. Schiffman, "Reproducibility of retinal nerve fiber layer thickness measurements using scanning laser polarimetry in pseudophakic eyes," *Ophthalmic surgery and lasers*, vol. 33, no. 2, pp. 117–122, 2002.
- [74] R. Boyd, *Nonlinear optics*, ch. 1. Academic Pr, 2003.
- [75] R. Boyd, *Nonlinear optics*, ch. 2. Academic Pr, 2003.
- [76] N. Broom and R. Flachsman, "Physical indicators of cartilage health : the relevance of compliance, thickness, swelling and fibrillar texture," *Journal of anatomy*, vol. 202, no. 6, pp. 481–494, 2003.
- [77] V. Dejica, J. Mort, S. Laverty, J. Antoniou, D. Zukor, M. Tanzer, and A. Poole, "Increased type ii collagen cleavage by cathepsin k and collagenase activities with aging and osteoarthritis in human articular cartilage," *Arthritis Research & Therapy*, vol. 14, no. 3, p. R113, 2012.

- [78] J. Cheng and X. Xie, "Green's function formulation for third-harmonic generation microscopy," *JOSA B*, vol. 19, no. 7, pp. 1604–1610, 2002.