

Université du Québec  
Institut National de la Recherche Scientifique  
Centre Énergie, Matériaux et Télécommunications

# **IMAGERIE DE GÉNÉRATION DE SECONDE ET TROISIÈME HARMONIQUES EN OPHTALMOLOGIE CORNÉENNE**

Par  
Louis JAY

Thèse présentée pour l'obtention du grade de  
Philosophiae doctor (Ph.D.)  
en sciences de l'énergie et des matériaux

## **Jury d'évaluation**

Président du jury et examineur interne	José Azaña INRS-ÉMT
Examineur externe	Guy Lamouche Institut des matériaux industriels, Conseil national de recherches Canada
Examineur externe	Paul Charette Département de génie électrique, Université de Sherbrooke
Directeur de recherche	Pr. Tsuneyuki OZAKI INRS-ÉMT
Codirectrice de recherche	Pr. Isabelle BRUNETTE Département d'ophtalmologie, Université de Montréal



## REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans cette thèse a été effectué entre les institutions INRS-ÉMT et le laboratoire de biophotonique de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont. Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement Tsuneyuki Ozaki de m'avoir accueilli facilement depuis la France et donner les moyens de travailler sur ce doctorat dont le sujet autant physique que médical fut passionnant. Merci pour ta sagesse, ta disponibilité et ton écoute. Merci aussi à ma co-directrice de doctorat Isabelle Brunette pour son aide scientifique en ophtalmologie, sa rigueur et sa bonne humeur.

Je remercie le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) et le Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS) pour leur soutien financier.

Je souhaite également remercier les membres du jury pour juger ce travail. Merci à José Azaña d'avoir accepté de présider ce jury et à Guy Lamouche et Paul Charrette pour avoir accepté d'être les examinateurs externes.

À l'INRS je remercie les professeurs François Vidal et François Légaré pour leurs discussions sur certains résultats. Sur les questions de mécanique, je remercie Claude Sirois qui a réalisé plusieurs pièces opto-mécaniques pour ce projet et Guy Lebrun pour ses conseils en électronique. À l'HMR, je remercie particulièrement Kanwarpal Singh avec qui j'ai travaillé sur l'automatisation du microscope. Je remercie également Arnaud Brocas pour les premières expériences et l'aide à la mise en place de notre laboratoire à l'HMR. Je remercie également les personnes suivantes avec qui j'ai travaillé : Luis Alvarez Ferré, Anca Marian, Predrag Corluka, Caroline Dion, Santiago Costantino. Merci également à tout le personnel du département d'ophtalmologie de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont. Je remercie aussi Stéphanie Proulx, dynamique et passionnée, du Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale (LOEX) avec qui j'ai eu plaisir à travailler sur le projet d'imagerie de cornée reconstruite par génie tissulaire.

Un gros merci aussi à l'administration de l'INRS et en particulier à Hélène Sabourin.

Enfin, merci à Google et Wikipedia sans lesquels, nous ne pourrions pas faire grand-chose !



## RÉSUMÉ

Le présent document rapporte le travail de recherche effectué à l'INRS-EMT et l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont concernant l'imagerie par génération de seconde et de troisième harmonique de la cornée.

L'imagerie par génération de seconde harmonique a déjà été appliquée pour l'observation de la cornée pour révéler le stroma. L'imagerie par génération de seconde harmonique est tout à fait adaptée à l'observation de cette couche cornéenne car elle bénéficie des avantages de la microscopie non linéaire et s'avère particulièrement utile pour révéler le réseau complexe de collagène stromal. Cependant, l'imagerie des autres couches cornéennes nécessite un autre signal que celui de la seconde harmonique.

L'objectif de cette thèse est de montrer la pertinence de l'utilisation de l'imagerie par génération de troisième harmonique pour l'observation de la cornée native, reconstruite (génie tissulaire) et opérée (coupe intrastromale lamellaire comme dans le cadre du LAser in-Situ Keratomileusis).

Ainsi cette thèse présente successivement : le tissu cornéen ; les imageries cornéennes actuellement utilisées cliniquement et leurs limites ; la théorie de la microscopie de génération de seconde et troisième harmonique ; le montage expérimental depuis la source laser femtoseconde jusqu'à l'informatique dédiée et enfin les résultats d'imagerie sur ces trois types d'échantillons cornéens.

Ce travail fait la démonstration que l'imagerie de génération de troisième harmonique est pertinente comme imagerie complémentaire de l'imagerie de génération de seconde harmonique : comme cette dernière elle est non invasive, c'est une microscopie non linéaire utilisant des lasers femtoseconde communs à la chirurgie réfractive, elle complète adéquatement l'observation que permet l'imagerie de génération de seconde harmonique du stroma et enfin elle apporte une information que ni les imageries cliniques ni la microscopie de fluorescence deux photons peuvent apporter. Cette combinaison des deux imageries de génération d'harmoniques est donc pertinente pour l'imagerie ophtalmique de la cornée.



# TABLE DES MATIÈRES

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>CORNÉE ET IMAGERIE CLINIQUE ASSOCIÉE.....</b>	<b>5</b>
2.1	CORNÉE.....	5
2.1.1	<i>Biométrie de la cornée.....</i>	5
2.1.2	<i>Anatomie et propriétés optiques de la cornée.....</i>	8
2.1.3	<i>Pathologies et généralités en chirurgies de la cornée.....</i>	16
2.1.4	<i>Besoins en imagerie cornéenne.....</i>	25
2.2	IMAGERIE CORNÉENNE EN OPTIQUE LINÉAIRE.....	27
2.2.1	<i>Les méthodes de microscopie à préparation.....</i>	28
2.2.2	<i>Les méthodes d'imagerie clinique de la cornée.....</i>	34
2.2.3	<i>Conclusion imageries de la cornée.....</i>	47
<b>3</b>	<b>THÉORIE ET ÉTAT DE L'ART EN MICROSCOPIE GSH.....</b>	<b>49</b>
3.1	PHÉNOMÈNES D'OPTIQUE NON LINÉAIRE DU SECOND ORDRE.....	49
3.2	DIFFUSION HYPER-RAYLEIGH ET OPPOSITION AVEC LA GSH.....	56
3.3	ÉQUATIONS DE PROPAGATION DE LA SH ET ACCORD DE PHASE.....	60
3.3.1	<i>Expression du champ électrique de SH par les équations de Maxwell.....</i>	60
3.3.2	<i>Résolutions spatiales pour la SH.....</i>	66
3.3.3	<i>Cas particuliers d'ondes de SH en ondes planes et fortement focalisées.....</i>	68
3.4	GÉNÉRATION DE SECONDE HARMONIQUE DANS LES TISSUS BIOLOGIQUES.....	75
3.4.1	<i>Non centrosymétrie et désaccord de phase.....</i>	75
3.4.2	<i>GSH biologique endogène.....</i>	79
3.4.3	<i>Le collagène.....</i>	80
3.4.4	<i>Microscopie GSH du collagène.....</i>	83
3.4.5	<i>Microscopie GSH en ophtalmologie cornéenne.....</i>	86
3.5	CONCLUSION.....	90
<b>4</b>	<b>THÉORIE ET ÉTAT DE L'ART EN MICROSCOPIE GTH.....</b>	<b>91</b>
4.1	PHÉNOMÈNES D'OPTIQUE NON LINÉAIRE DU TROISIÈME ORDRE.....	91
4.2	GÉNÉRATION DE TROISIÈME HARMONIQUE SUR UNE INTERFACE.....	96
4.3	APPLICATION DE LA MICROSCOPIE DE GTH À LA BIOMÉDECINE.....	102
4.3.1	<i>Une microscopie particulièrement adaptée aux tissus frais.....</i>	102
4.3.2	<i>Microscopie GTH en ophtalmologie.....</i>	105
4.4	CONCLUSION.....	106

<b>5</b>	<b>OBJECTIFS ET MÉTHODOLOGIES .....</b>	<b>107</b>
5.1	MÉTHODOLOGIE, OBJECTIFS ET DÉMARCHE.....	107
5.2	DESCRIPTION DU MICROSCOPE ET DE SON INSTRUMENTATION ASSOCIÉE.....	108
5.2.1	<i>Source laser.....</i>	<i>112</i>
5.2.2	<i>Microscope.....</i>	<i>117</i>
5.3	CONCLUSION .....	147
<b>6</b>	<b>L'IGSH/IGTH COMME OUTIL D'OBSERVATION ANATOMIQUE DE LA CORNÉE.....</b>	<b>149</b>
6.1	IMAGERIE DE FLUORESCENCE 2P DANS LA CORNÉE.....	150
6.2	OBJECTIFS .....	154
6.3	MÉTHODES .....	156
6.4	RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	156
6.4.1	<i>Étendue de la détection des signaux de SH et TH sur la cornée porcine .....</i>	<i>156</i>
6.4.2	<i>IGSH/IGTH de la cornée porcine à l'échelle macroscopique .....</i>	<i>160</i>
6.4.3	<i>Observations des couches postérieures de la cornée.....</i>	<i>162</i>
6.4.4	<i>Observation de l'épithélium cornéen .....</i>	<i>171</i>
6.5	CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	172
<b>7</b>	<b>APPLICATION DE L'IGSH/IGTH POUR L'OBSERVATION DES CORNÉES RECONSTRUITES PAR GÉNIE TISSULAIRE .....</b>	<b>175</b>
7.1	INTÉRÊT DE L'APPLICATION DE L'IGSH/IGTH POUR LES CORNÉES RECONSTRUITES.....	175
7.2	OBJECTIFS .....	176
7.3	MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	176
7.3.1	<i>Le tissu cornéen reconstruit .....</i>	<i>176</i>
7.3.2	<i>Modifications apportées au microscope pour l'imagerie du tissu reconstruit .....</i>	<i>176</i>
7.4	RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	178
7.4.1	<i>Observation transversale de la cornée reconstruite .....</i>	<i>178</i>
7.4.2	<i>Observations en face dans le stroma de la cornée reconstruite .....</i>	<i>180</i>
7.4.3	<i>Observation en face dans l'endothélium .....</i>	<i>181</i>
7.5	CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	186
<b>8</b>	<b>L'IGSH/IGTH COMME OUTIL ACCOMPAGNANT LA CHIRURGIE CORNÉENNE.....</b>	<b>187</b>
8.1	PARTICULARITÉ POUR L'IMAGERIE CORNÉENNE DE LA COUPE INTRASTROMALE MÉCANIQUE PAR RAPPORT À LA COUPE AU LASER FEMTOSECONDE .....	187
8.2	OBJECTIFS .....	190
8.3	MÉTHODES.....	190
8.4	RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	191
8.4.1	<i>IGSH/IGTH en épi-détection de la cornée coupée sur œil entier .....</i>	<i>191</i>



8.4.2	<i>TCO de la cornée coupée sur œil entier.....</i>	199
8.4.3	<i>Nature des sources de signal sur la coupe intrastromale.....</i>	204
8.4.4	<i>Comparatif IGSH/IGTH de la coupe intrastromale en transmission et en épi-détection.....</i>	206
8.5	CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	210
<b>9</b>	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>213</b>



# LISTE DES FIGURES

FIGURE 2.1	OEIL HUMAIN OU PORCIN .....	6
FIGURE 2.2	SEGMENT ANTÉRIEUR ET CORNÉE.....	7
FIGURE 2.3	STROMA EN OBSERVATION TRANSVERSALE PAR MET ET OEDÉMISATION .....	12
FIGURE 2.4	TRANSMISSION ŒIL ET CORNÉE (HUMAIN) .....	14
FIGURE 2.5	MEMBRANE DE DESCHEM ET ENDOTHÉLIUM CHEZ LE PORC EN OBSERVATION TRANSVERSALE PAR MET .....	15
FIGURE 2.6	OPÉRATION CHIRURGICALE LASIK.....	21
FIGURE 2.7	LE MICROKÉRATOME AUTOMATIQUE.....	23
FIGURE 2.8	IONISATION PAR ABSORPTION MULTIPHOTON.....	24
FIGURE 2.9	COUPE HISTOLOGIQUE DE LA CORNÉE PORCINE.....	30
FIGURE 2.10	MICROSCOPE À LAMPE À FENTE ET MICROSCOPE SPÉCULAIRE .....	36
FIGURE 2.11	MICROSCOPE CONFOCAL EN TRANSMISSION ET ÉPI-DÉTECTION.....	39
FIGURE 2.12	SCHÉMA DU TOMOGRAPHE DE COHÉRENCE OPTIQUE (TCO) EN CONFIGURATION LINNIK.....	42
FIGURE 2.13	OBSERVATION D'UN SEGMENT ANTÉRIEUR HUMAIN EN TCO.....	43
FIGURE 2.14	RÉSOLUTION AXIALE EN TCO .....	44
FIGURE 2.15	TCO DANS LE DOMAINE DE FOURIER .....	45
FIGURE 3.1	MONTAGE DE LA PREMIÈRE EXPÉRIENCE DE GÉNÉRATION DE SECONDE HARMONIQUE .....	49
FIGURE 3.2	PANORAMA DES PHÉNOMÈNES D'OPTIQUE NON LINÉAIRE DU SECOND ORDRE.....	53
FIGURE 3.3	CENTROSYMÉTRIE MOLÉCULAIRE .....	56
FIGURE 3.4	ASYMÉTRIE MOLÉCULAIRE ET POSSIBILITÉ DE DOUBLEMENT DE FRÉQUENCE .....	57
FIGURE 3.5	IMPLICATION DE L'ORGANISATION MOLÉCULAIRE SUR LA GSH .....	58
FIGURE 3.6	NOTATIONS POUR LA DESCRIPTION DE $E_{2\omega}$ .....	63
FIGURE 3.7	RÉSOLUTION AXIALE EN FONCTION DE LA LONGUEUR CONFOCALE OU DE LA LONGUEUR DE COHÉRENCE EN MICROSCOPIE DE GÉNÉRATION D'HARMONIQUES .....	71
FIGURE 3.8	RAPPORT DE SIGNAL AVANT/ARRIÈRE EN FONCTION DE L'ANGLE D'UNE FIBRILLE DE COLLAGÈNE AVEC L'INCIDENCE DE LA FONDAMENTALE .....	77
FIGURE 3.9	COLLAGÈNE FIBRILLAIRE DE TYPE I : DE LA MOLÉCULE À LA LAMELLE STROMALE.....	82
FIGURE 4.1	PHÉNOMÈNES D'OPTIQUE NON LINÉAIRE DU TROISIÈME ORDRE EXPLOITÉS EN MICROSCOPIE .....	95
FIGURE 4.2	GÉOMÉTRIE DE L'ÉCHANTILLON À L'INTERFACE POUR LA MODÉLISATION DE LA GTH .....	98
FIGURE 5.1	SOURCE LASER ET ALIGNEMENT (VUE D'AU-DESSUS).....	109
FIGURE 5.2	MICROSCOPE (VU DE PROFIL) .....	110
FIGURE 5.3	DÉTECTION ET ACQUISITION.....	111
FIGURE 5.4	DIAGRAMME DE JABLONSKY DU DOPANT YTTÉRIUM.....	114
FIGURE 5.5	OSCILLATEUR T-PULSE .....	115
FIGURE 5.6	SEGMENT ANTÉRIEUR .....	128

FIGURE 5.7	PRÉPARATIONS EXPÉRIMENTALES POUR OBSERVER EN TRANSMISSION LES CORNÉES AVEC LEUR COURBURE.....	130
FIGURE 5.8	MESURE DE LA RÉOLUTION AXIALE EN TH SUR LAMELLE COUVRE-OBJET .....	133
FIGURE 5.9	MESURE DE LA RÉOLUTION AXIALE EN TH SUR LA CORNÉE .....	136
FIGURE 5.10	VUE D'ENSEMBLE DE L'INTERFACE LABVIEW POUR LE BALAYAGE ÉCHANTILLON.....	142
FIGURE 5.11	DÉTAIL DE L'INTERFACE LABVIEW POUR L'ACQUISITION DE PROFIL 1D.....	143
FIGURE 5.12	VUE D'ENSEMBLE DE L'INTERFACE LABVIEW POUR LE BALAYAGE OPTIQUE .....	145
FIGURE 5.13	DÉTAIL DE L'INTERFACE LABVIEW POUR L'ACQUISITION DE PROFIL 2D.....	146
FIGURE 6.1	SPECTROMÉTRIE DES FLUOROPHORES ENDOGÈNES MÉTABOLIQUES .....	152
FIGURE 6.2	PROFIL 1D SH/TH SUR UNE CORNÉE PORCINE FRAICHE AVEC UN CONDENSEUR SEC .....	158
FIGURE 6.3	PROFIL 1D SH/TH SUR TOUTE L'ÉPAISSEUR D'UNE CORNÉE PORCINE FRAICHE AVEC UN CONDENSEUR À IMMERSION À GEL OPHTALMIQUE AVEC TH EN TRANSMISSION ET SH EN ÉPI-DÉTECTION.....	159
FIGURE 6.4	PROFIL 1D SH/TH SUR TOUTE L'ÉPAISSEUR D'UNE CORNÉE PORCINE FRAICHE AVEC UN CONDENSEUR À IMMERSION À GEL OPHTALMIQUE AVEC SH EN TRANSMISSION ET TH EN ÉPI-DÉTECTION .....	161
FIGURE 6.5	OBSERVATIONS TRANSVERSALES PAR TCO COMMERCIALE D'UNE CORNÉE PORCINE FRAICHE.....	163
FIGURE 6.6	OBSERVATION TRANSVERSALE SH/TH D'UNE CORNÉE PORCINE TYPE TCO .....	164
FIGURE 6.7	OBSERVATION TRANSVERSALE SH/TH SUR LES COUCHES POSTÉRIEURES DE LA CORNÉE PORCINE ...	166
FIGURE 6.8	OBSERVATION TRANSVERSALE SH/TH SUR UN KÉRATOCYTE DANS LA CORNÉE PORCINE .....	169
FIGURE 6.9	OBSERVATION <i>EN FACE</i> EN IGSH/TH DE L'ENDOTHÉLIUM D'UNE CORNÉE PORCINE .....	170
FIGURE 6.10	OBSERVATION TRANSVERSALE SH/TH SUR L'ÉPITHÉLIUM PORCIN .....	172
FIGURE 7.1	PHOTOGRAPHIES D'UN RÉSULTAT DE GÉNIE TISSULAIRE CORNÉEN .....	177
FIGURE 7.2	RÉSUMÉ DES ÉTAPES DE LA RECONSTRUCTION DU TISSU STROMA/ENDOTHÉLIUM .....	177
FIGURE 7.3	COUPE TRANSVERSALE DE LA CORNÉE RECONSTRuite.....	179
FIGURE 7.4	OBSERVATION <i>EN FACE</i> DANS LE STROMA RECONSTRUIT .....	183
FIGURE 7.5	OBSERVATION <i>EN FACE</i> DANS LE STROMA RECONSTRUIT AVEC LES MÉTHODES CLASSIQUES D'HISTOLOGIE .....	184
FIGURE 7.6	OBSERVATION <i>EN FACE</i> DANS LA COUCHE D'ENDOTHÉLIUM.....	185
FIGURE 8.1	COUPE MÉCANIQUE ET COUPE AU LASER FEMTOSECONDE.....	189
FIGURE 8.2	OBSERVATION TRANSVERSALE DE LA CORNÉE PORCINE COUPÉE PAR UNE LAME CHIRURGICALE .....	192
FIGURE 8.3	OBSERVATION MACROSCOPIQUE TRANSVERSALE EN IGTH DE LA CORNÉE PORCINE COUPÉE PAR UNE LAME CHIRURGICALE .....	194
FIGURE 8.4	OBSERVATION TRANSVERSALE MAGNIFIÉE AU DÉPART DE LA COUPE .....	196
FIGURE 8.5	OBSERVATION TRANSVERSALE MAGNIFIÉE DE LA COUPE INTRASTROMALE .....	198
FIGURE 8.6	OBSERVATIONS TRANSVERSALES PAR TCO COMMERCIALE D'UNE CORNÉE PORCINE COUPÉE : VUE D'ENSEMBLE ET COUPE INTRASTROMALE.....	200
FIGURE 8.7	OBSERVATIONS TRANSVERSALES PAR TCO COMMERCIALE D'UNE CORNÉE PORCINE COUPÉE : GROSSISSEMENT SUR LA DÉCHIRURE .....	201

FIGURE 8.8	PHÉNOMENES D'OMBRE EN TCO POUR DES TISSUS OPAQUES PAR DIFFUSION, RÉFLEXION ET ABSORPTION .....	203
FIGURE 8.9	DIFFÉRENCES SUR LES OBSERVATIONS TRANSVERSALES DE LA CORNÉE PORCINE COUPÉE PAR UNE LAME CHIRURGICALE ENTRE LA DÉTECTION EN TRANSMISSION ET ÉPI-DÉTECTION .....	207
FIGURE 8.10	OBSERVATION TRANSVERSALE MAGNIFIÉE DE LA COUPE INTRASTROMALE DANS LA CONFIGURATION TH EN TRANSMISSION .....	208



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

1D, 2D, 3D :	1, 2, 3 dimensions
ADN :	acide désoxyribonucléique
CCD :	charge coupled device
fs :	femtoseconde
F2P :	fluorescence deux photons
FEP :	fonction d'étalement de point
GSH :	génération de seconde harmonique
GTH :	génération de troisième harmonique
IGSH :	imagerie de génération de seconde harmonique
IGTH :	imagerie de génération de troisième harmonique
IR :	infrarouge
MET :	microscopie électronique par transmission
ON :	ouverture numérique
PM :	photomultiplicateur
TCO :	tomographie par cohérence optique
UA :	unités arbitraires
US :	ultrasons
UV :	ultraviolet
VIS :	visible

Laboratoires et institutions impliqués :

HMR :	Hôpital Maisonneuve-Rosemont
INRS-EMT :	Institut National de Recherche Scientifique. Énergie Matériaux Télécommunication
LOEX :	Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale





# 1 INTRODUCTION

La cornée est un tissu biologique qui a un statut particulier, puisqu'il est transparent à plus de 70 % dans le visible et le proche infrarouge (Freegard, 1997, Van den Berg *et al.*, 1997). Cette caractéristique a son avantage et son défaut. L'avantage est que le tissu peut être sondé par une imagerie optique sur toute son épaisseur, par exemple jusqu'à 1 mm sur la cornée porcine. Cet avantage est très appréciable en microscopie optique. En effet, la microscopie optique qui est une imagerie sous forte focalisation permettant d'obtenir une résolution spatiale micrométrique, par opposition aux méthodes telle que la tomographie optique diffuse de résolution autour de la centaine de microns, est généralement limitée à 500  $\mu\text{m}$  de pénétration dans le tissu (Ntziachristos, 2010) sous éclairage infrarouge. La contrepartie de cette transparence est que la cornée offre très peu de contraste : pratiquement aucun contraste d'absorption et pour le contraste de phase, des variations d'indice de réfraction très fines, entre, et à l'intérieur des différentes couches anatomiques qui la constituent.

Par exemple, avant la microscopie de génération de seconde harmonique (GSH), la seule référence en matière d'observation du réseau de collagène cornéen procédait par les méthodes *post mortem* d'histologie et de microscopie électronique à transmission (MET). Les multiples imageries cliniques de la cornée (microscopie confocale, tomographie par cohérence optique...) ont l'avantage d'être non invasives et ne requièrent pas d'agents de contraste contrairement à l'imagerie moléculaire. Cependant leur contraste est assez faible : par exemple elles donnent des difficultés sur la révélation des kératocytes dans le stroma et la différenciation des couches cornéennes. Par ailleurs, étant des méthodes relevant de l'optique linéaire, elles ont également des limitations quant à leur résolution spatiale. Ainsi ces méthodes sont typiquement utilisées dans un but précis d'observation de la cornée : par exemple le microscope spéculaire est un instrument d'imagerie ophtalmique utilisé pour diagnostiquer, sur la base de changements morphologiques cellulaires dans l'endothélium, certaines pathologies pouvant mener à la cécité totale (dystrophie de Fuch's) mais il n'est justement utilisé que pour l'observation de ces cellules endothéliales.

Ainsi dans notre travail nous avons exploité la microscopie GSH qui avait déjà fait ses preuves en tant que microscopie non linéaire permettant de révéler le stroma. L'originalité du travail a consisté à utiliser la microscopie de génération de troisième harmonique (GTH) comme moyen

de substitution de la microscopie de fluorescence à deux photons (F2P) pour imager le reste de la cornée que ne peut pas couvrir l'imagerie de génération de seconde harmonique (IGSH). En effet, la microscopie GTH a justement fait la preuve, dès les premières recherches, de son avantage à contraster des objets transparents et ayant en plus le même indice de réfraction. Elle s'est peu à peu imposée dans le domaine de l'imagerie cellulaire et est maintenant aussi intégrée dans la famille des méthodes de microscopie non linéaire, au même titre que la microscopie F2P ou la microscopie GSH. Par ailleurs, l'imagerie de génération de troisième harmonique (IGTH) est, comme l'IGSH, une microscopie cohérente et cette caractéristique lui assure également une grande richesse d'informations : relation émission/(mise en forme du faisceau), relation émission/(géométrie de l'échantillon), polarimétrie... La spécificité élastique de ces méthodes permet également de limiter la phototoxicité qu'impliquent les phénomènes optiques à absorption (fluorescence). L'idée était donc de voir si le couple IGSH/IGTH pouvait former un outil suffisamment complet pour l'observation de la cornée quelque soit la profondeur dans la cornée stratifiée et être aussi « lisible » sur des projections transversales qu'*en face*.

Enfin, l'IGTH est, comme l'IGSH, optimale avec l'utilisation de lasers femtoseconde (fs), ces mêmes lasers qui sont particulièrement utilisés à présent dans le cadre de la chirurgie réfractive pour leurs qualités de découpe sans dommage collatéral dans le tissu environnant. Ceci a d'ailleurs amené à la création de la plateforme BioFemtoVision à l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont pilotée par la professeure Isabelle Brunette pour fédérer ces différentes technologies qui utilisent les sources femtoseconde. A ce projet est également associé le laboratoire LOEX (Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale) de l'Université Laval sous la direction de la professeure Lucie Germain. Le LOEX étudie les cornées reconstruites par génie tissulaire pour les études cliniques de greffe de cornée, i.e. l'étape qui suit l'ablation du tissu cornéen malade.

Mon projet de doctorat, dirigé par le professeur Tsuneyuki Ozaki de l'INRS-EMT, s'est focalisé sur le volet imagerie non linéaire de la cornée. Dans cette thèse nous développerons donc suivant le plan :

Chapitre 2 : ce chapitre sera l'occasion d'introduire le tissu cornéen, son anatomie et ses propriétés optiques, permettant ainsi d'avoir toute la terminologie associée à cette biologie. Nous fournirons, lorsque cela a été possible, les données relatives au porc qui a été le modèle animal sur lequel ont été conduites les expériences. Par ailleurs ce chapitre permettra aussi de voir

quelles imageries sont déjà utilisées cliniquement pour observer la cornée et mieux comprendre la spécificité de l'imagerie de ce tissu. Nous comprendrons alors pourquoi les méthodes de microscopie non linéaire sont pertinentes pour combler les manques de ces technologies.

Chapitre 3 et Chapitre 4 : ces deux chapitres donnent le cadre théorique pour comprendre les microscopies de GSH et GTH. Dans un modèle relativement simple de faisceau gaussien d'harmoniques nous introduirons les concepts d'accord de phase qui conditionnent, à hauteur égale avec les conditions de focalisation, l'émission des harmoniques et donc la résolution spatiale du microscope.

Chapitre 5 : ce chapitre développe la méthodologie, i.e. tout le montage expérimental depuis le laser jusqu'à l'interface informatique de pilotage et d'acquisition et les choix qui ont orienté cette conception.

Chapitres 6, 7 et 8 : ce sont les chapitres de résultats d'application de l'IGSH/IGTH. L'idée de ces travaux a été de suivre cette logique contextuelle de l'IGSH/IGTH dans l'ophtalmologie clinique (anatomie, chirurgie et greffe). Nous y verrons donc successivement l'imagerie de la cornée saine et l'intérêt tout particulier à utiliser la GTH pour différencier les couches cornéennes. Surtout nous démontreront que cette distinction structurale est possible sur les couches les plus profondes dont la fonction physiologique est cruciale, i.e. le couple membrane de Descemet/endothélium. Nous y aborderons également la question de l'épi-détection des signaux, question importante dès lors que la visée clinique est envisagée. Une autre application s'est portée sur la cornée reconstruite et a fait la démonstration que notre imagerie permettait autant l'accès aux informations structurales que les méthodes histologiques utilisées traditionnellement. Enfin une application a porté sur l'observation de cornées incisées par une lame métallique, comme cela peut avoir lieu à l'occasion de certains actes chirurgicaux. En effet les coupes à l'aide de lames métalliques dans la cornée, induisent des jeux de contraste très différents et justement plus difficiles à discerner, qu'à l'occasion des coupes au laser femtoseconde. Nous verrons donc l'intérêt de l'IGTH pour l'observation des coupes intrastromales et la comparaison avec la tomographie par cohérence optique (TCO) permettra de répondre à certaines interrogations sur la visualisation de cette coupe.



## 2 CORNÉE ET IMAGERIE CLINIQUE ASSOCIÉE

Dans ce chapitre nous allons décrire, dans une première partie, la biologie de la cornée puisque ce tissu est le seul sur lequel nous avons concentré notre recherche. Cette introduction permettra au lecteur d'avoir le vocabulaire biologique et clinique que nous utiliserons par la suite et de connaître par ailleurs les propriétés optiques particulières de la cornée. Dans une seconde partie nous discuterons des différents moyens existants pour observer la cornée. Nous verrons lesquels sont les moins invasifs et pour les méthodes cliniques, quelles carences demeurent encore pour justifier que d'autres méthodes soient explorées. Ainsi cette conclusion sur ce second chapitre introduira l'intérêt des méthodes microscopiques à génération d'harmoniques.

### 2.1 Cornée

Nous allons tout d'abord situer la cornée dans l'œil et donner quelques valeurs de dimensions (biométrie). Ensuite nous nous pencherons sur l'anatomie de ce tissu qui s'organise sous forme de couches. Ce sera aussi l'occasion de voir quelques caractéristiques optiques de la cornée saine. Enfin nous conclurons sur quelques pathologies et chirurgies associées aux expériences d'imagerie de génération d'harmoniques.

#### 2.1.1 Biométrie de la cornée

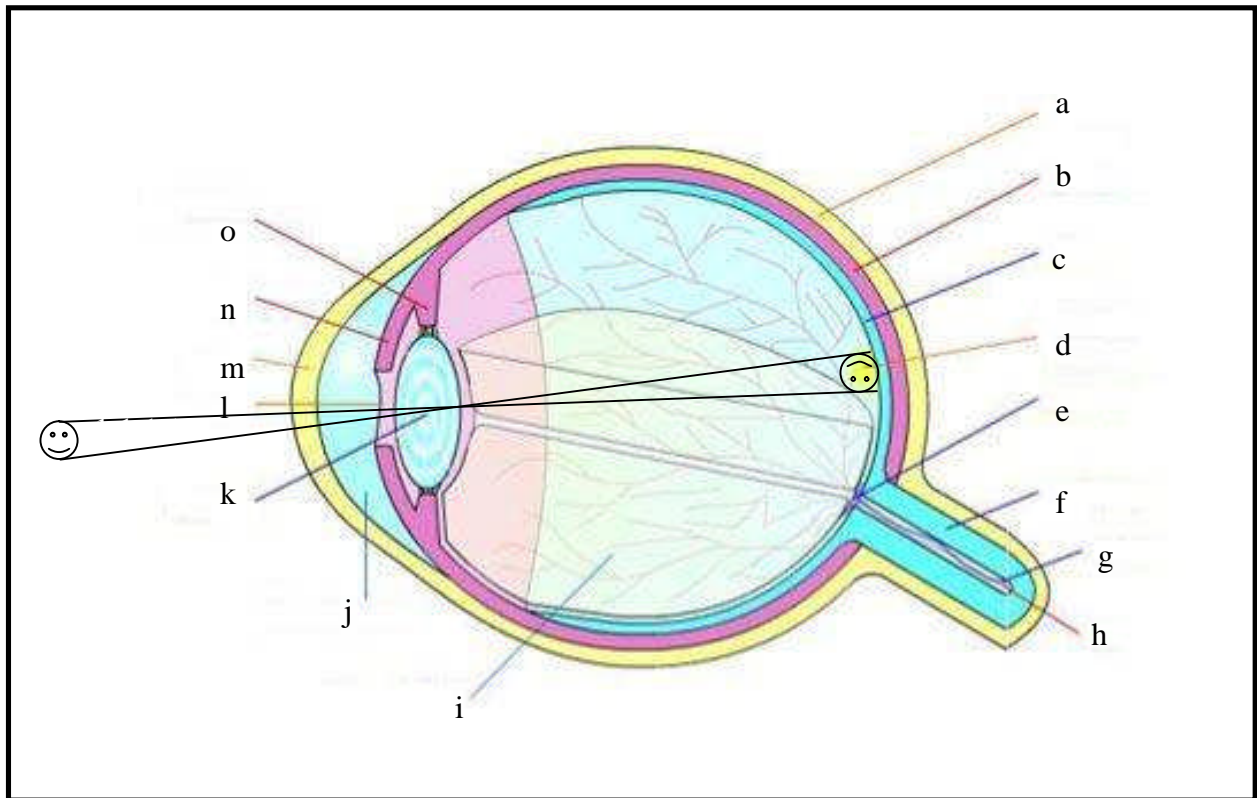
La figure 2.1 localise la cornée<sup>1</sup> dans l'ensemble de l'œil. Globalement, l'œil est divisé en deux grandes parties. D'une part, il y a le segment antérieur (fig. 2.2 (a)) qui rassemble les optiques (Artal *et al.*, 2010) de l'œil, i.e. principalement la cornée et le cristallin, et d'autre part, il y a le segment postérieur qui s'étend du cristallin à la rétine, où finalement l'image de ce qui est vu est formée. Ces termes antérieurs et postérieurs peuvent par ailleurs être utilisés pour la cornée pour désigner respectivement ce qui est superficiel ou plus profond dans ce tissu.

La cornée est transparente, non vascularisée et est exposée à l'environnement extérieur. En revanche le limbus qui constitue la zone de transition entre la cornée et la sclère (blanc d'œil) est quant à lui très vascularisé et possède des cellules souches. La surface antérieure de la cornée est

1 : Les valeurs indiquées sont celles de l'humain {porc entre accolades}. À part pour les dimensions, les cornées des deux espèces sont tout de même très proches sur le plan anatomique et biophysique (Sanchez *et al.*, 2011, Proulx *et al.*, 2010). Pour cette raison, le porc fait souvent l'objet d'études précliniques.

couverte d'un film lacrymal, tandis que la surface postérieure baigne dans l'humeur aqueuse (Nishida, 2005).

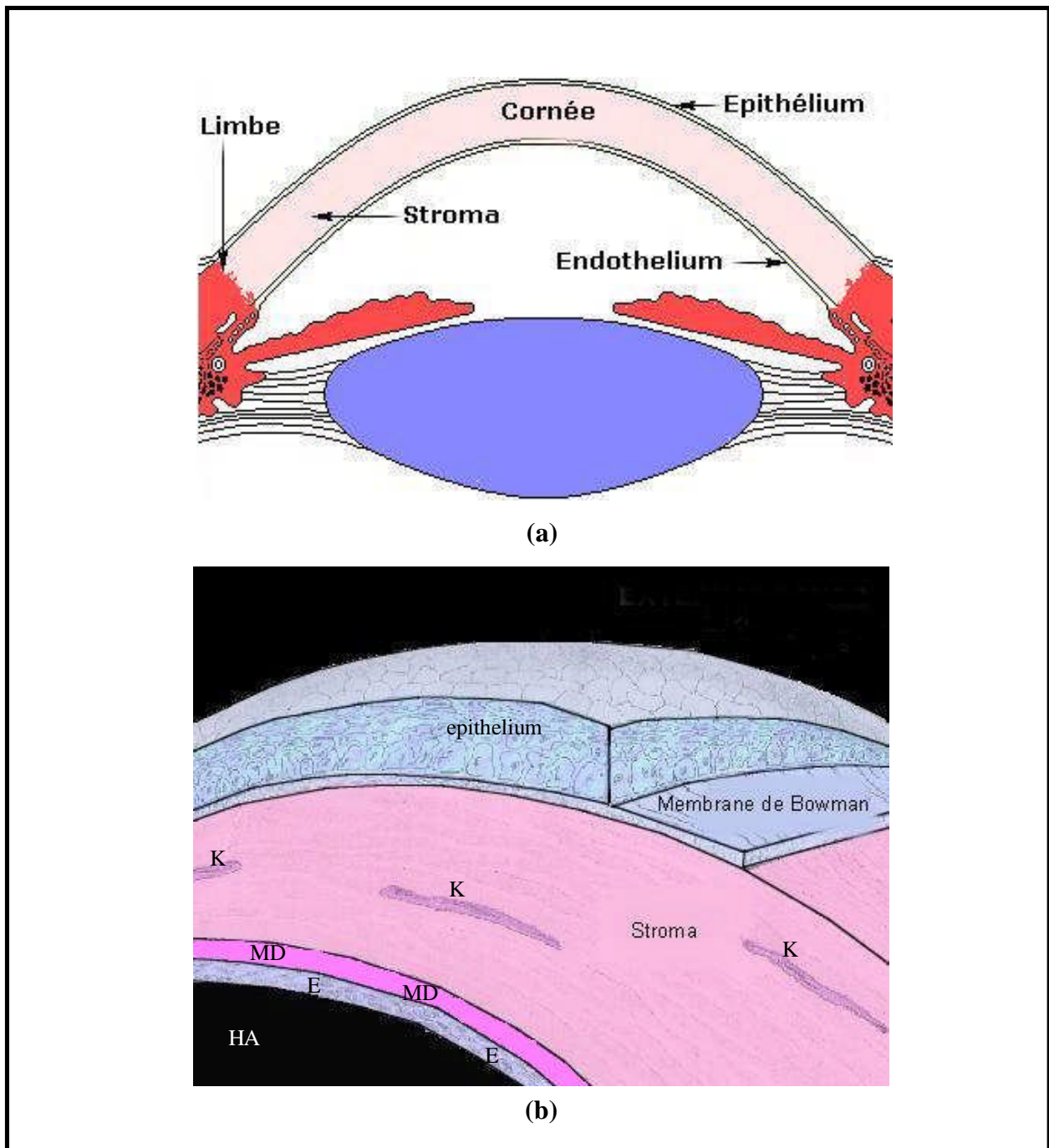
La cornée est d'une plus grande puissance optique que le cristallin dans la mesure où elle sépare des milieux d'indice de réfraction bien contrastés, celui de l'air et celui de la cornée, et assure ainsi les 2/3 de la fonction convergente sur la rétine. En effet, dans le modèle d'œil paraxial humain de LeGrand, la cornée a 43 {40} dioptries, contre 60 dioptries (I. Sanchez *et al.*, 2011) pour la puissance totale des optiques oculaires. Par ailleurs, la position du foyer image sur la rétine est à environ 24 {24} cm du sommet (apex) de la cornée (Le Grand, 1964), distance appelée : longueur d'œil axiale.



**Figure 2.1** Oeil humain ou porcine

a : sclérotique ; b : choroïde ; c : rétine ; d : tache jaune (fovea) ; e : tache aveugle ; f : nerf optique ; g : artère ; h : veine ; i : humeur vitrée ; j : humeur aqueuse de la chambre antérieure ; k : cristallin ; l : pupille ; m : cornée ; n : iris ; o : corps ciliaire. Le visage souriant vers lequel est dirigé le regard, est un objet à l'infini (6m ou plus pour l'humain), imagé en inversé par les optiques oculaires sur la fovea.

Figure modifiée depuis la source : (Furelaud *et al.*, 2004).



**Figure 2.2 Segment antérieur et cornée**

(a) segment antérieur. (b) cornée (voir aussi fig. 2.3).

K : kératocytes ; MD : membrane de Descemet ; E : endothélium ; HA : humeur aqueuse.

(a) et (b) sont modifiées depuis les sources : (Perret opticiens, 2010, Unite for Sight inc, 2012).

La cornée (fig. 2.1 et 2.2 (b)), d'un diamètre moyen de 11 {14-17} mm (Bartholomew *et al.*, 1997) est en première approximation un ménisque formé de deux calottes sphériques d'un rayon de courbure moyen de 7.8 mm en antérieur et de 6.5 mm en postérieur {8.7 mm en moyenne (Asejczyk-Widlicka *et al.*, 2011)}. En réalité la forme de l'organe est bien plus complexe (Calossi, 2007, Laliberte *et al.*, 2007) mais on peut préciser qu'elle s'aplatit et a un rayon antérieur augmentant, en allant vers le limbe (limite entre la cornée et la sclère). Son épaisseur, qui elle aussi varie avec la distance à l'apex, est d'environ, en condition *in vivo*, 0.60 mm (Bechmann *et al.*, 2001, I. Sanchez *et al.*, 2011, Wong *et al.*, 2002) {0.70 mm (Faber *et al.*, 2008)}. Cette caractéristique cornéenne, dont la mesure s'appelle la pachymétrie (McLaren *et al.*, 2004), est fonction de l'âge et de l'oedématisation. L'oedématisation est un problème central en pathologie cornéenne, sur lequel nous reviendrons avec le stroma cornéen, induisant un changement d'épaisseur (en l'occurrence une augmentation). Ainsi cette seule mesure de l'épaisseur de la cornée renseigne déjà beaucoup sur la santé de la cornée.

### **2.1.2 Anatomie et propriétés optiques de la cornée**

Maintenant que nous avons vu quelques points situant la cornée dans l'œil, intéressons nous à son anatomie propre. La cornée est organisée en cinq couches structurales (fig. 2.2 (b)) : épithélium, membrane de Bowman, stroma, membrane de Descemet et endothélium.

Avant de définir ces différentes couches, mentionnons qu'il est délicat de présenter des données unifiées entre les différentes études car non seulement, il y a le problème individuel comme nous l'avons mentionné plus haut (position dans la cornée, âge...) mais il y a également le problème des méthodes utilisées : comme justement avant l'arrivée de la microscopie non linéaire il était difficile d'avoir une résolution spatiale axiale suffisante sur les tissus frais, soit les mesures étaient données sur la cornée entière (avec la tomographie par cohérence optique (Asejczyk-Widlicka *et al.*, 2011)), soit les fines couches étaient observées par les méthodes classiques nécessitant obligatoirement des procédés physico-chimiques pouvant modifier ces dimensions (ex. coupes histologiques, MET). Nous reviendrons sur ces points ultérieurement (voir le chap. 2.2.1 et celui de résultat chap. 7).

Depuis l'environnement extérieur et en s'enfonçant progressivement dans le tissu cornéen, ces couches apparaissent successivement :



## 1) épithélium

Cette couche de surface composée essentiellement de cellules a une épaisseur d'un peu moins d'1/10 de l'épaisseur totale de la cornée. Cette couche a principalement un rôle protecteur (avec le film lacrymal au-dessus lorsque l'œil est *in vivo*) vis-à-vis des corps étrangers (microorganismes, poussières, liquides incluant le film lacrymal...) pouvant venir au contact de l'œil. L'épithélium est composé de trois sous-couches de cellules morphologiquement différentes :

- sous-couche des cellules superficielles (particulièrement aplaties),
- sous-couche des cellules « en aile » (davantage rondes),
- et enfin, la sous-couche de cellules basales qui sont plus allongées le long de la perpendiculaire à la surface cornéenne.

En particulier, les cellules superficielles permettent le maintien du film lacrymal. Elles assurent aussi le rôle de barrière contre l'environnement grâce à des "tight-junction" ceinturants qui renforcent la cohésion de ces cellules. Enfin, les cellules épithéliales se régénèrent vite après un traumatisme ou une chirurgie.

## 2) membrane de Bowman

La membrane de Bowman est bien individualisée chez les primates et l'homme en particulier et est absente chez le porc (Merindano *et al.*, 2002). Elle assure une transition entre l'épithélium au-dessus et le stroma au-dessous mais sa fonction exacte reste encore l'objet de discussions (S. E. Wilson *et al.*, 2000). Comme le stroma, la membrane de Bowman est une couche de collagène mais celui-ci n'est pas structuré de la même façon aux deux endroits (plus anarchique dans le cas de la membrane de Bowman (Hayashi *et al.*, 2002)). Cette fine couche est par ailleurs très peu cellularisée : il y a présence de cellules de Schwan (Wikipedia, 2011a) entourant des axones des cellules nerveuses qui d'une manière générale se situent dans cette partie antérieure de la cornée (He *et al.*, 2010). Elle ne se régénère pas après un traumatisme et des patients l'ayant perdu peuvent quand même maintenir une cornée fonctionnelle (Nishida, 2005).

## 3) le stroma

Cette couche est surtout un tissu conjonctif : sur un volume qui représente près de 90 % de la cornée, le stroma est principalement composé en matière sèche, de collagène : il y a peu de

cellules et en état sain, le stroma est composé d'environ 80 % d'eau {72 % pour le porc (I. Sanchez *et al.*, 2011)}. La teneur en eau de la cornée est un indicatif majeur de sa santé et l'endothélium, dont nous parlerons plus loin, a pour fonction de maintenir ce pourcentage : s'il y a trop d'eau dans la cornée il y a oedémisation (fig. 2.3 (d)). Nous reviendrons sur la molécule de collagène à l'occasion du chapitre sur la théorie de la microscopie de la GSH (voir le chap. 3.4.3), mais nous pouvons déjà dire que dans le stroma, le collagène prend la forme de fibrilles, observables en MET, qui s'alignent pour former une lamelle (Bron, 2001) (fig. 2.3 (a) chez l'humain et (b) chez le porc). Les lamelles qui s'alignent parallèlement à la surface de la cornée, tendues d'un limbe à l'autre, sont empilées les unes sur les autres avec entre chacune une rotation de 90° (fig. 2.3 (a) et (b)). L'organisation est cependant plus régulière dans les 2/3 postérieurs du stroma que vers son côté antérieur (Nishida, 2005, Svaldenienė *et al.*, 2003). Il y a environ 300 lamelles dans le stroma humain. Les cellules présentes dans le stroma sont les kératocytes, fibroblastes allongés spécialisés de la cornée. Les kératocytes constituent un réseau important dans le stroma par le biais de longues extensions qui communiquent par des jonctions communicantes. Ce réseau cellulaire est aussi responsable, en plus du collagène, de la cohérence mécanique de la cornée. Ces cellules quiescentes s'activent à l'occasion d'une agression de la cornée (pathologie, trauma, chirurgie) en produisant le collagène et en fournissant également une réponse immunitaire.

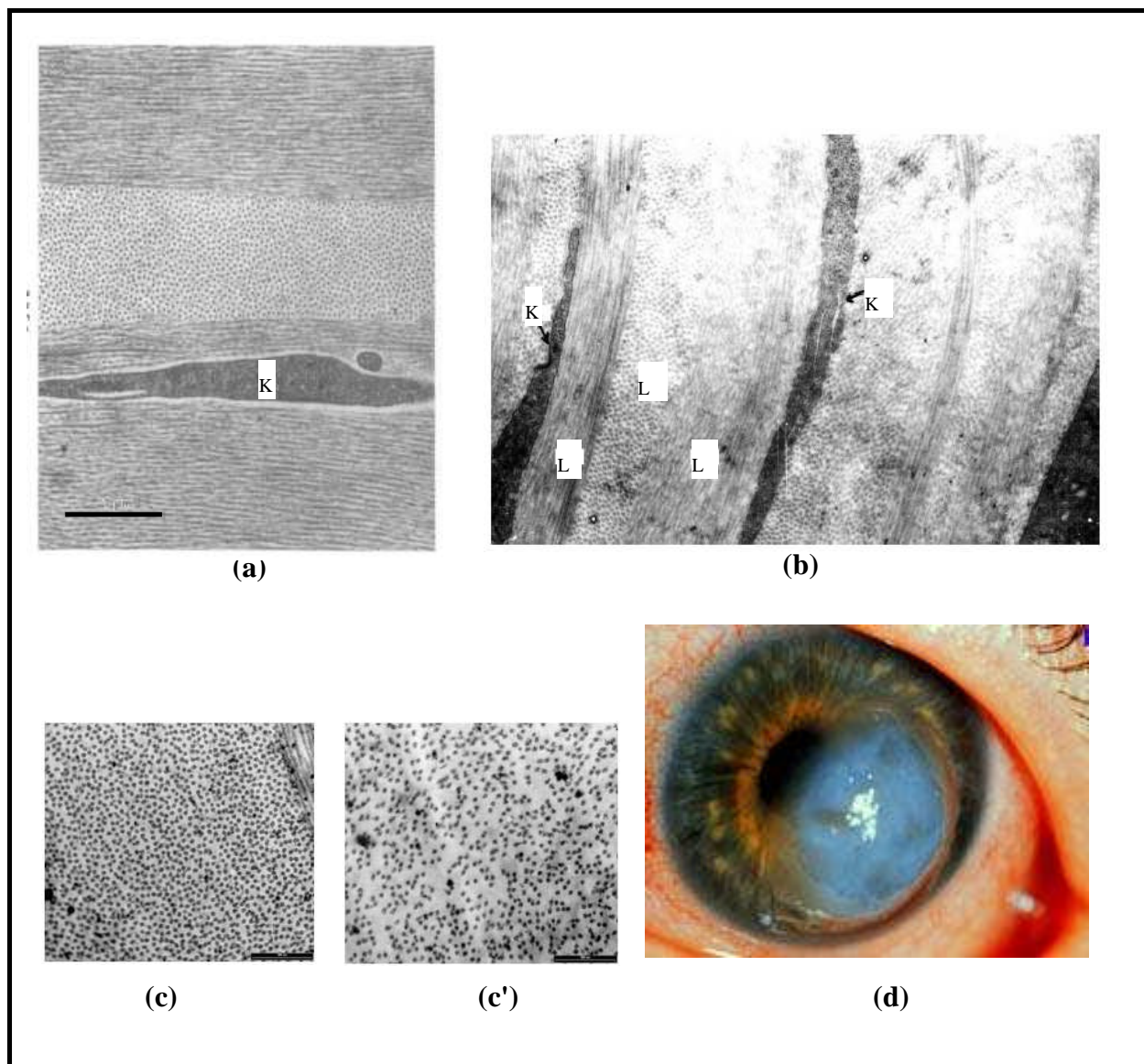
Cette organisation du collagène aux différentes échelles dans le stroma a deux conséquences :

- une mécanique, que nous ne détaillerons pas ici mais qui assure à la cornée sa courbure et sa résistance par rapport à la pression intraoculaire exercée par l'humeur aqueuse sous la cornée (Asejczyk-Widlicka *et al.*, 2011) ;
- une optique, qui est associée à la transparence de ce tissu.

La raison pour laquelle la cornée est transparente, alors que par exemple la sclère qui est pratiquement de même composition est opaque, n'est pas encore complètement comprise : les fibres de collagènes ont en effet un indice de réfraction plus élevé que ce qui les entoure (Freegard, 1997). Il serait donc normal de s'attendre à ce que l'ensemble diffuse. Il apparaît que cette transparence serait en fait due à la structure particulière du stroma : les fibrilles ont un diamètre uniforme et elles s'empilent espacées d'une distance régulière (Ameen *et al.*, 1998, Komai *et al.*, 1991, Meek *et al.*, 2001a). Ces deux dimensions homogènes, diamètre des fibrilles

et distance les séparant, sont typiquement deux fois moindres que les longueurs d'onde visible. Cette convergence de caractéristiques permettrait un jeu d'interférence détruisant ce qui devrait normalement diffuser (D. E. Freund *et al.*, 1986a) contrairement à la sclère alors même que cette dernière est, elle aussi, composé du même type de collagène que celui de la cornée. Lorsqu'il y a oedémisation, l'eau en surplus désorganise ce réseau de collagène portant ainsi atteinte à ces caractéristiques mécaniques et surtout optiques. Ce phénomène d' oedémisation peut mener à l'opacification, par diffusion, totale de la cornée (Meek *et al.*, 2003a). Les figures 2.3 (c) et (c') illustrent, par la microscopie électronique à transmission (MET), cette désorganisation où le collagène a été observé dans la même région avant (c) ou après oedémisation (c'). L'oedémisation a induit, entre autres, un plus grand espacement entre les fibrilles. La conséquence d'une oedémisation avancée est illustrée en figure 2.3 (d) sur un patient où la cornée n'est plus « brumeuse » mais est devenue complètement opaque sur une partie. Enfin, précisons que même si l'oedémisation affecte principalement le stroma, elle désolidarise aussi les cellules épithéliales, celles-ci étant normalement très peu diffusantes, avec cette même conséquence d'opacification de la cornée (Klyce, 2005).

L'indice de réfraction global de la cornée saine, généralement admis est d'un indice de réfraction de 1.377 (Schwiegerling, 2004) {1.374 (Patel, 1987)} sachant qu'au-dessus de la cornée, il y a l'air (1.000 sur le visible et IR (Polyanskiy, 2012)) et dessous l'humeur aqueuse (1.337). Lorsqu'il y a oedémisation, l'indice de réfraction de la cornée a naturellement tendance à décroître. Les indices de réfraction, en fonction de la profondeur dans la cornée, ont également été évalués. Ainsi chez l'homme, dans la partie centrale (l'indice variant aussi suivant la position latérale) de la cornée les valeurs suivantes sont données : 1.401 (*in vivo*) dans l'épithélium, 1.380 (cornée fraîche) dans le stroma antérieur, 1.373 (cornée fraîche) dans la partie postérieure (Patel *et al.*, 1995). Cependant ces valeurs sont à prendre avec précautions, car il peut y avoir, au sein même d'une couche cornéenne, d'importantes inhomogénéités : par exemple dans le film lacrymal (non présent dans le cas *ex vivo*) pourtant très mince, il y a une phase lipidique et aqueuse. Par ailleurs, les principales régions d'une cellule à modifier la phase d'un front d'onde sont la membrane plasmique et le noyau. L'indice moyen de la membrane plasmique est de 1.48 et celui du cytoplasme de 1.38 (Beuthan *et al.*, 1996). Les organites comme les mitochondries ont également un indice de réfraction assez éloigné de l'eau avec 1.38-1.41 (Gourley, 2003, Loiko *et al.*, 2007).



**Figure 2.3 Stroma en observation transversale<sup>2</sup> par MET et oedémisation**

(a) stroma humain avec un kératocyte entouré de 3 lamelles de collagène. (b) stroma porcin. Pour (a) et (b) on remarque l'alternance orthogonale entre chaque lamelle. (c) et (c') sont un grossissement sur une lamelle en condition saine (c) et d'une cornée oedémisée (c'). (d) aspect d'une cornée oedémisée sur une moitié suite à une rupture de la membrane de Descemet laissant entrer l'humeur aqueuse.

K : kératocyte ; L : lamelle de collagène.

Les échelles sont : (a) 1  $\mu\text{m}$ , (b)  $6.9 \times 10 \mu\text{m}$ , (c) et (c') 0.500  $\mu\text{m}$ .

Les sources sont : modifiées de (a) (Komai *et al.*, 1991) et tirées de (b) (Svaldenienė *et al.*, 2003) (c) et (c') (Meek *et al.*, 2003b) (d) (Shiuey, 1998).

2 : le balayage est effectué par le faisceau laser suivant les directions orthogonales à l'axe optique (donc suivant x,y) pour réaliser les observations *en face* sinon les observations sont transversales et contiennent l'axe optique et l'un des deux autres axes. Cette terminologie vaudra pour tout le reste de la thèse en microscopie optique aussi.

Ces considérations sont importantes car elles sont à prendre en compte pour expliquer les contrastes en imagerie de GTH puisque l'amplitude de la TH est associée, à la susceptibilité non linéaire d'ordre trois et à l'indice de réfraction du matériau. Nous aurons l'occasion de revenir sur ce point dans la partie théorique de la TH et dans les résultats (voir les chap. 4.2 et 6 et 8).

La cornée transmet principalement le visible et le proche infrarouge (IR) et les figures 2.4 (a) et (b) montrent la transmission de la cornée qui est maximale à l'apex (Doutch *et al.*, 2008), ainsi que celle des autres optiques oculaires chez l'homme.

#### **4) la membrane de Descemet**

Cette couche ainsi que l'endothélium ont été des régions anatomiques sur lesquels nous avons particulièrement travaillé avec la microscopie de génération d'harmoniques.

Elle est la membrane basale transparente de l'endothélium qui est dessous. Elle est résistante aux agents chimiques et pathogènes mais est assez fragile mécaniquement. Sa rupture implique l'inondation du stroma par l'humeur aqueuse et mène à l'œdème (fig. 2.3 (d)). Contrairement à la membrane basale de l'épithélium qui fait environ 0.5  $\mu\text{m}$ , celle-ci est plus épaisse et fait en fonction de l'âge (3 naissance ; 10 adulte (Nishida, 2005))  $\mu\text{m}$  {3 ; 12 (Merindano *et al.*, 2002, Svaldenienė *et al.*, 2003)}. La membrane de Descemet est une couche de collagène très homogène (ni cellules ni espaces) même si la MET a permis d'y distinguer deux sous couches différentes (Johnson *et al.*, 1982). La transition de tissu avec ses deux couches adjacentes (stroma et endothélium) est abrupte comme en témoigne la MET (fig. 2.5 (a) et (b)) et en suit parfaitement les formes respectives.

#### **5) endothélium**

L'endothélium est la couche la plus profonde de la cornée et est au contact de l'humeur aqueuse. C'est une couche unicellulaire si bien que son épaisseur est d'environ 5  $\mu\text{m}$ . La fonction de ces cellules est de gérer l'approvisionnement énergétique et le taux d'hydratation de la cornée depuis l'humeur aqueuse, cette seconde fonction étant, comme nous l'avons vu précédemment, primordiale pour la transparence du tissu. Pour justement estimer la santé de l'endothélium, un critère retenu est la mesure de la densité des cellules endothéliales qui s'effectue habituellement en milieu clinique au microscope spéculaire (voir plus loin le chap. 2.2.2 1) b)).

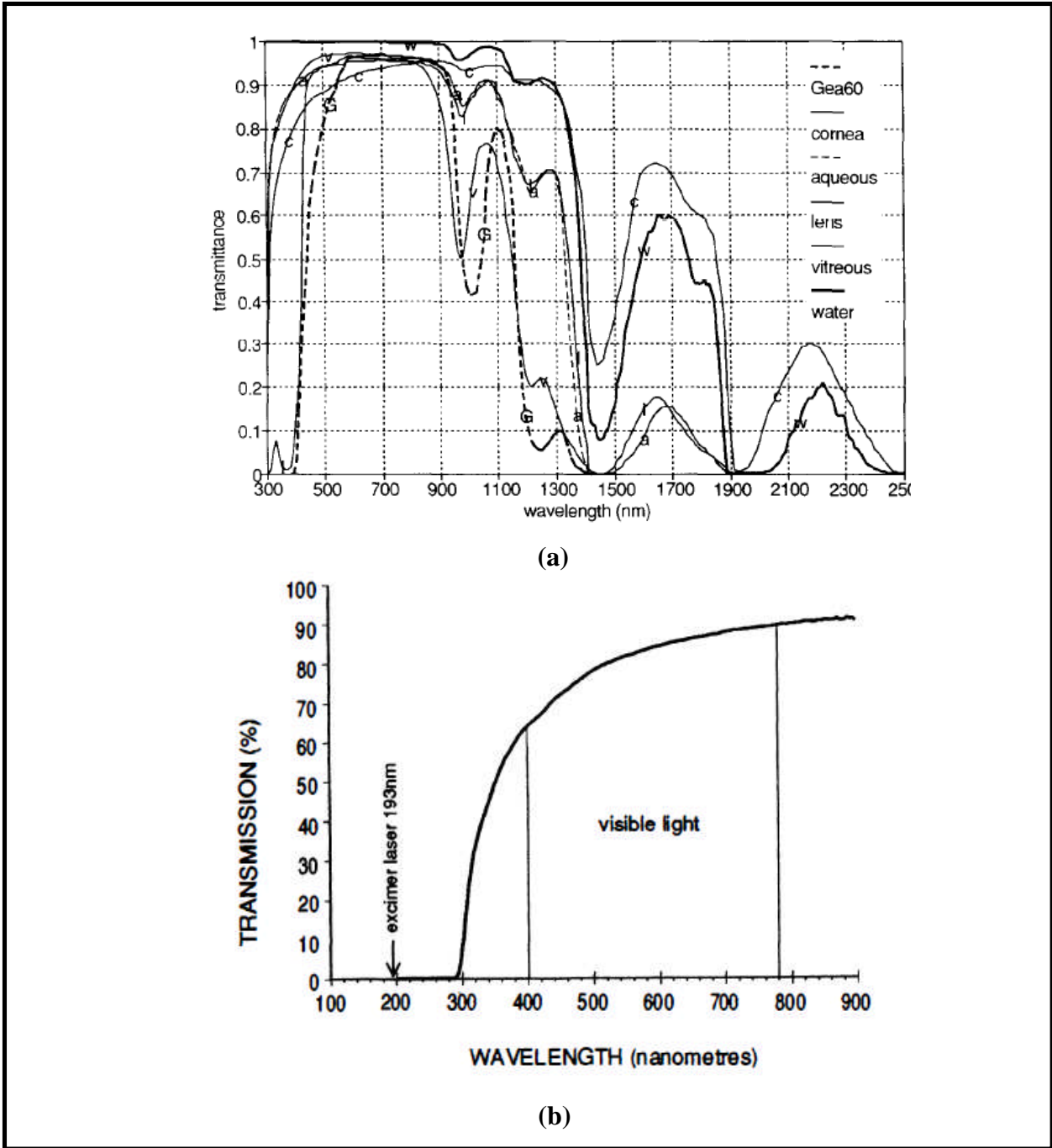
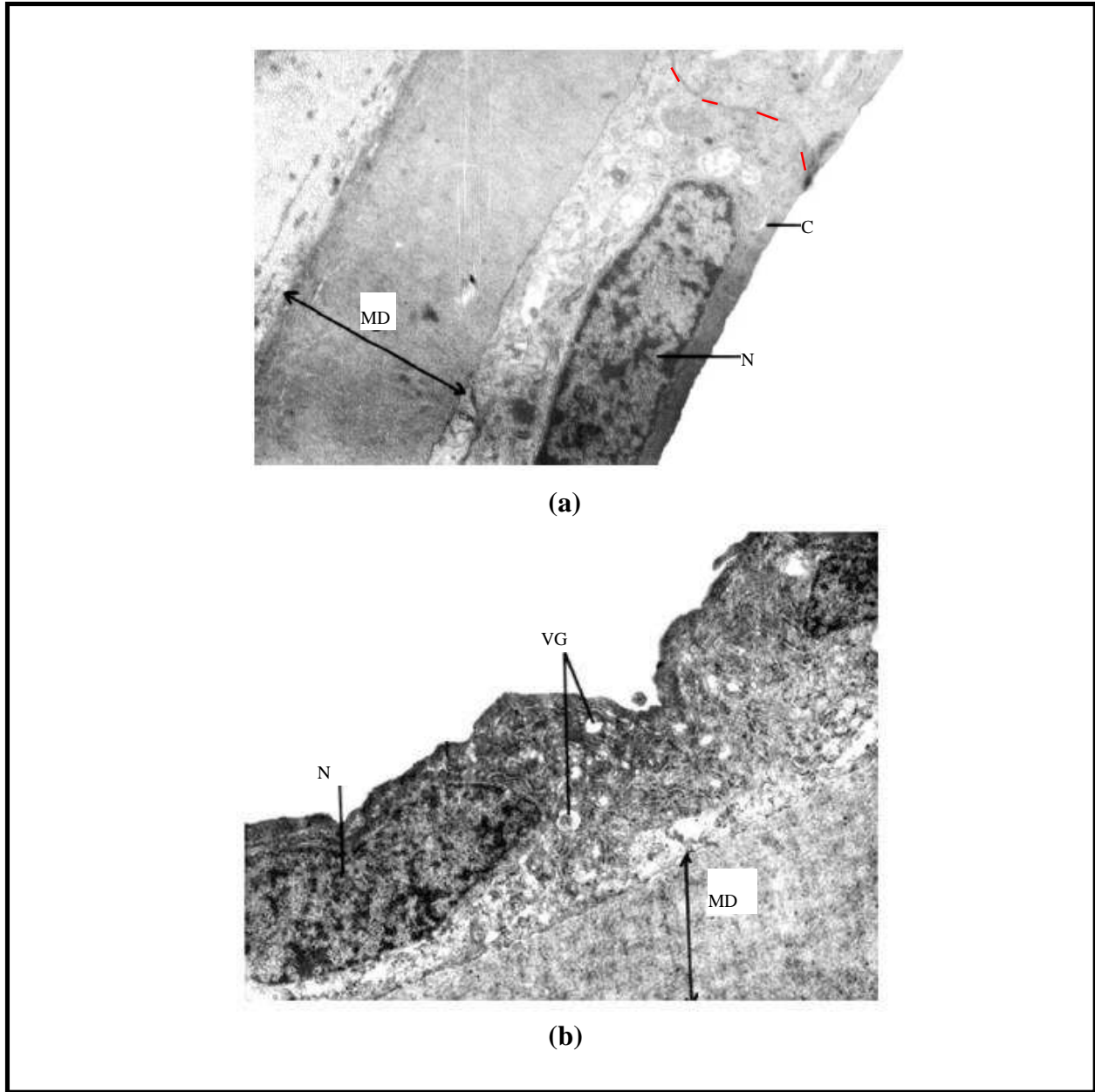


Figure 2.4 Transmission œil et cornée (humain)

(a) transmission de l'œil entier. (b) transmission de la seule cornée.

Les sources sont tirées de : (a) (Van den Berg *et al.*, 1997) ; (b) (Freegard, 1997).



**Figure 2.5 Membrane de Descemet et endothélium chez le porc en observation transversale par MET**

(a) couches postérieures chez le jeune porc (b) couches postérieures chez le porc adulte.

C : Cytoplasme ; N : Noyau ; MD : Membrane de Descemet ; VG : Vésicules de Golgi.

Les traits rouges sur (a) représentent la membrane plasmique.

Les échelles sont : (a)  $6.5 \times 10 \mu\text{m}$ , (b)  $7.3 \times 9.8 \mu\text{m}$ .

(a), (b) sont modifiées de la source : (Svaldenienė *et al.*, 2003).

Par ailleurs, cette tâche de gestion de l'eau monopolise l'activité métabolique de l'endothélium car elle est effectuée par le biais de pompes Na<sup>+</sup> (Bourne *et al.*, 2004, Fischbarg *et al.*, 1985). À cause de cette activité métabolique soutenue, le contenu de la cellule endothéliale est riche d'organites (proches du noyau) et on peut par ailleurs observer également de fins granules et des vacuoles. Le noyau occupe une grande partie de la cellule. Les contours des cellules endothéliales sont irréguliers du fait des interdigitations entre les cellules adjacentes (voir la fig. 2.5 (b)). Certaines cellules possèdent par ailleurs un cil mais sont davantage situées en périphérie. L'endothélium, contrairement à l'épithélium, ne se régénère pas mais si certaines cellules meurent, d'autres peuvent grossir pour continuer à assurer la fonction de la couche. Enfin, il faut faire remarquer que toutes les couches sont interdépendantes car si l'endothélium assure une grande part des fonctions vitales de la cornée, l'épithélium peut aussi affecter la santé de l'endothélium comme des études sur le port de lentilles cornéennes l'ont montré (Edelhauser, 2000).

### **2.1.3 Pathologies et généralités en chirurgies de la cornée**

Le domaine lié à ces problématiques est évidemment très vaste et nous ne discuterons dans ce chapitre que de celles associées à nos résultats, i.e. :

- 1) nos premiers résultats se sont concentrés sur les couches postérieures de la cornée : en effet les maladies impliquant la membrane de Descemet et l'endothélium sont les plus graves ;
- 2) nos derniers résultats se sont penchés sur les observations d'incision dans la cornée : ce travail est lié à tout ce qui a trait à la chirurgie mécanique, i.e. celle qui n'utilise pas de laser pour couper. En particulier la chirurgie réfractive avec l'opération LASIK (« Laser-Assisted in Situ Keratomileusis ») nécessite une incision intrastromale lamellaire pour créer le capot cornéen, opération qui encore aujourd'hui, se réalise bien souvent mécaniquement.



## 1) Dystrophie de Fuch's

### a) Description

Nous avons vu qu'un dysfonctionnement de l'endothélium ne permettait plus de gérer les flux d'eau à travers la cornée et ses différentes couches. La cause principale de ce phénomène est que les cellules endothéliales qui ont une forte activité métabolique, meurent et n'assurent plus cette fonction de régulation nécessaire à la transparence. Cette oedémisation qui peut d'ailleurs se rencontrer dans n'importe quel tissu (Wikipedia, 2012b), est une accumulation anormale de liquide aqueux et provoque ainsi dans le stroma une augmentation d'épaisseur se traduisant par une élévation de la pachymétrie mais aussi des modifications de l'épithélium, du stroma et de l'endothélium. Ces modifications peuvent être déjà observées grossièrement par un examen à la lampe fente (Grupcheva *et al.*, 2001) (voir le chap. 2.2.2 1) a)). Ensuite, cliniquement, les examens couramment effectués pour affiner le diagnostic et savoir quelle pathologie peut être à l'origine de cet œdème (Feiz, 2005), sont le microscope spéculaire (densité et morphologie des cellules endothéliales) et le microscope confocal (morphologie des cellules cornéennes en général (Grupcheva *et al.*, 2001)). Nous reviendrons sur ces méthodes dans le chapitre 2.2.

Les maladies de l'endothélium peuvent être dues à un agent pathogène comme des virus (ex. Herpes Simplex Virus) comme à des causes génétiques. Dans le second cas, une pathologie grave, car menant à la cécité et étant très répandue parmi les dysfonctionnements de la cornée, est la dystrophie de Fuch's (Bourne, 2003, Klintworth, 2009) qui donne justement un symptôme d'œdème progressif avec l'évolution de la maladie.

Cette maladie affecte généralement les deux yeux et est plus répandue chez les femmes entre 30 et 60 ans. Par ailleurs les premiers signes de la dystrophie de Fuch's se trouvent justement dans l'endothélium et tout autant dans la membrane de Descemet puisque cette dernière croît de façon désordonnée dans l'endothélium : ce sont les guttae (Polack, 1974) cornéennes qui sont des excroissances du collagène de la membrane de Descemet dans l'endothélium, déformant ses cellules et finissant par détruire plus ou moins le tapis cellulaire de cette couche. Ces guttae finissent par se voir avec l'augmentation de leur grosseur dans les cellules endothéliales et donnent des taches noires observables en microscopie spéculaire ou confocale. Les guttae constituent une couche postérieure anormale de collagène. Pour certains patients ces guttae restent circonscrites à la partie centrale de la cornée mais pour d'autres elles s'étendent à la

périphérie. Il est donc important d'examiner une grande portion de la cornée dans ces différentes régions (Phillips *et al.*, 2005). Mis à part cette formation de guttae, plusieurs équipes de recherche ont noté une variation d'épaisseur de la membrane de Descemet dans la dystrophie de Fuch's (Weisenthal *et al.*, 2005).

#### b) Chirurgies associées

La transplantation ou greffe (voir aussi le chap. 7) de cornée (kératoplastie) reste le meilleur traitement définitif pour bon nombre de maladies cornéennes et en particulier quand l'étiologie associée à la pathologie concerne l'endothélium. La greffe de cornée fournit alors une réserve saine de nouvelles cellules endothéliales.

Suivant le volume biologique qui est à remplacer dans la cornée, deux pratiques chirurgicales sont différenciées :

- kératoplastie transfixiante (ou perforante) : dans ce cas, la cornée est remplacée dans toute son épaisseur mais sur un diamètre limité, et offre en particulier un nouveau stroma quand celui du malade a atteint un trop fort taux d'oedémisation ;
- kératoplastie lamellaire : cette opération, bien que plus compliquée, est si possible préférée à la précédente permettant d'éviter les risques d'ouverture de la cicatrice (déhiscence), les infections, et les astigmatismes postopératoires. En effet, cette procédure remplace surtout les couches dysfonctionnelles, i.e une partie du stroma postérieur, la membrane de Descemet et l'endothélium. La kératoplastie lamellaire a évolué vers un remplacement de plus en plus en fin de tissu : DLEK (Deep lamellar endothelial keratoplasty, pour greffe endothéliale lamellaire profonde en français), DSEK (Descemet's Stripping Endothelial Keratoplasty, pour greffe endothéliale par pelage de la membrane de Descemet en français) et DMEK (Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty, pour greffe endothéliale avec membrane de Descemet en français) cette dernière opération ne greffant même plus de stroma (Alvarez Ferré, 2009, Dapena *et al.*, 2009) (Terry, 2003) (Dapena *et al.*, 2011).

Ainsi le couple membrane de Descemet et endothélium représente une portion de la cornée où il est très important de pouvoir avoir une observation fine et contrastée. Il faut par ailleurs remarquer que de nombreux symptômes se révèlent sur la seule membrane de Descemet qui peut changer d'épaisseur ou même de structure (Weisenthal *et al.*, 2005) et il serait intéressant qu'une

méthode d'imagerie puisse en rendre compte *in vivo*. La dystrophie polymorphe postérieure est à ce titre un autre exemple de pathologie que la dystrophie de Fuch's où la membrane de Descemet est très modifiée (Weisenthal *et al.*, 2005).

## 2) Amétropie et chirurgie réfractive

L'amétropie est le fait que l'objet à l'infini ne donne plus une image nette sur la rétine pour causes de problèmes réfractifs occasionnés principalement par la cornée: celle-ci peut trop converger devant la rétine (myopie), pas assez (hypermétropie) ou de façon dissymétrique (astigmatisme). La chirurgie qui permet de pallier à ces différents problèmes est la chirurgie réfractive.

Plusieurs façons de procéder sont possibles :

- procédures nécessitant un capot (voir plus bas),
- procédures de surface où la cornée est opérée près de l'épithélium (Herrmann *et al.*, 2008),
- procédures avec une insertion d'anneaux pour de fortes myopies (Guell, 2005),
- enfin il existe aussi des procédures où des incisions radiales ou très près du limbe permettent aussi par un jeu de modifications biomécaniques de corriger la myopie ou l'astigmatisme (Hanna *et al.*, 1989). Cependant ces opérations sont rares.

### LASIK (Laser Assisted In-Situ Keratomileusis)

Décrivons maintenant succinctement l'opération LASIK dont certains aspects ont été étudiés par des méthodes de microscopie non linéaire. Par ailleurs les coupes que nous avons réalisées pour nos résultats d'observation de coupes intrastromales (voir le chap. 8) ressemblent à ce qui est fait à l'occasion d'une procédure avec capot pour le LASIK (incisions lamellaires). Le LASIK consiste donc à retirer une part de stroma (kératomileusis) qui suivant l'endroit où cette ablation sera réalisée, amènera à soit aplatis (pour la myopie) ou au contraire bomber (pour l'hypermétropie) la cornée. Le LASIK réalise cette ablation par le biais d'un laser excimer dont le rayonnement ultraviolet est absorbé en un photon et mène à cette ablation. Le LASIK est l'opération la plus fréquente en chirurgie réfractive car, elle permet avec une forte prévisibilité une correction d'amétropies mêmes fortes, offre une récupération visuelle rapide et stable, implique un minimum d'inconfort postopératoire et réduit le risque de cornée « brumeuse ». Il a

été estimé qu'environ 1.5 millions de patients se font opérer par LASIK à travers le monde par année (Pallikaris *et al.*, 2005).

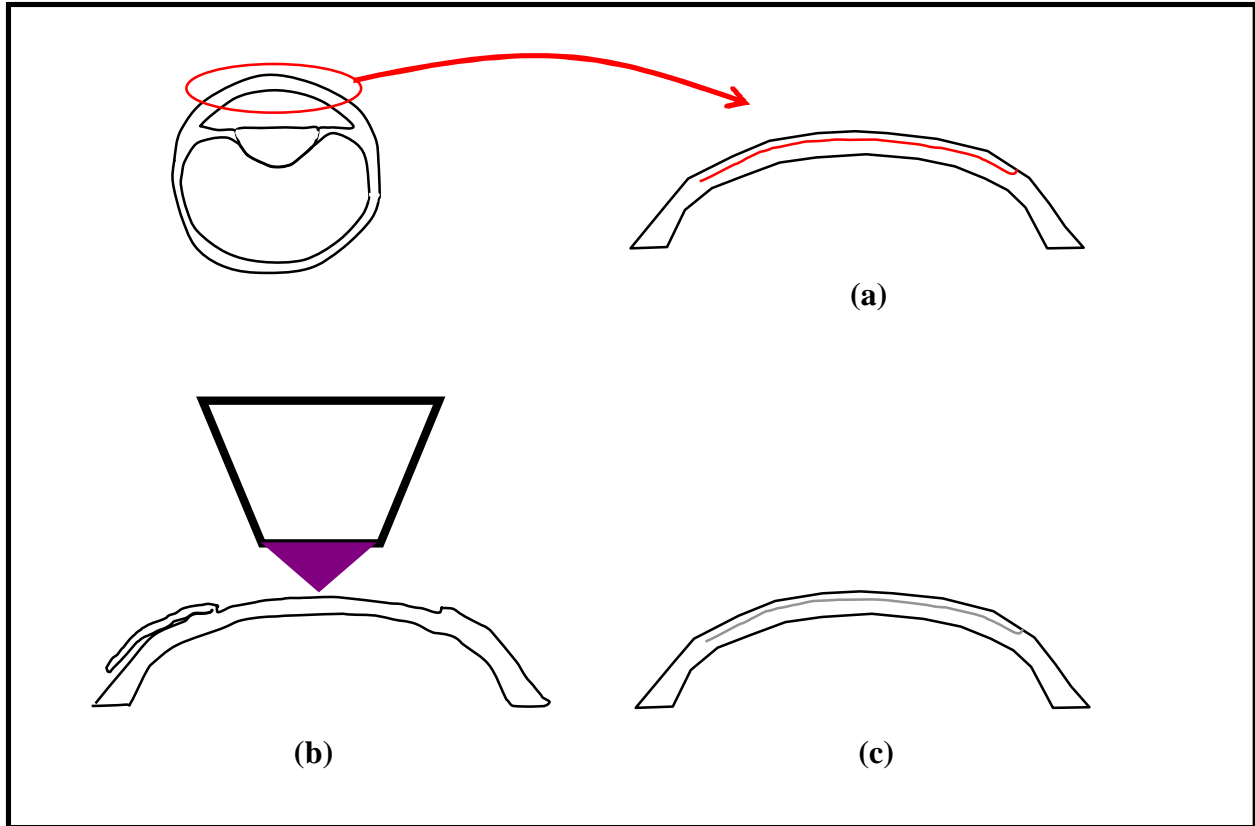
Pour accéder directement au stroma et pouvoir l'ablater, il faut donc réaliser une étape toute aussi cruciale que la correction excimer pour la réussite finale de l'opération : la création d'un capot maintenu sur l'œil par une charnière. Le capot contient donc l'épithélium, la membrane de Bowman (dans le cas humain) et une partie antérieure du stroma. Il peut être réalisé à des profondeurs différentes suivant par exemple l'importance d'une myopie (Phillips *et al.*, 2005). Il est soit réalisé par un procédé optique (laser femtoseconde) soit par un procédé mécanique (microkératome avec anneau de succion). L'important est que cette coupe reste à une même profondeur prédéterminée et soit la plus régulière et lisse possible pour empêcher les accrocs à la séparation des deux parties (Sarayba *et al.*, 2007).

Une fois le laser excimer appliqué pour la correction visuelle, le capot est replacé à sa position d'origine et sa réintégration à la cornée est assurée sans besoin de suture. La figure 2.6 résume les différentes étapes de cette opération qui est un exemple de coupe intrastromale lamellaire.

#### a) Le microkératome mécanique

Dans nos expériences qui seront présentées dans la partie résultat, nous nous sommes penchés sur les moyens mécaniques (avec lame métallique) d'effectuer une coupe dans la cornée, que cette découpe soit réalisée par une lame chirurgicale ou de façon plus sophistiquée par un microkératome. Cette démarche de coupe mécanique sera revue dans le chapitre 8 de résultats.

Le microkératome est un appareil comportant une lame oscillante mue sous pression gazeuse et qui permet un ajustement précis et constant de la profondeur de découpe. Sa progression dans la cornée peut être manuelle ou automatique (Hamill *et al.*, 2002, Keuch *et al.*, 1999).



**Figure 2.6 Opération chirurgicale LASIK**

(a) première étape : réalisation de la coupe intrastromale à l'aide d'un microkératome automatique ou par un laser femtoseconde permettant la création du « capot cornéen ». (b) deuxième étape : ablation du stroma par le laser excimer pour obtenir la correction voulue. (c) troisième étape : remplacement du « capot cornéen » et cicatrisation sans point de suture.

Plusieurs études font des comparatifs de microkératomes mécaniques et montrent en général des résultats similaires (Herrmann *et al.*, 2008, Keuch *et al.*, 1999). La figure 2.7 en montre un exemple.

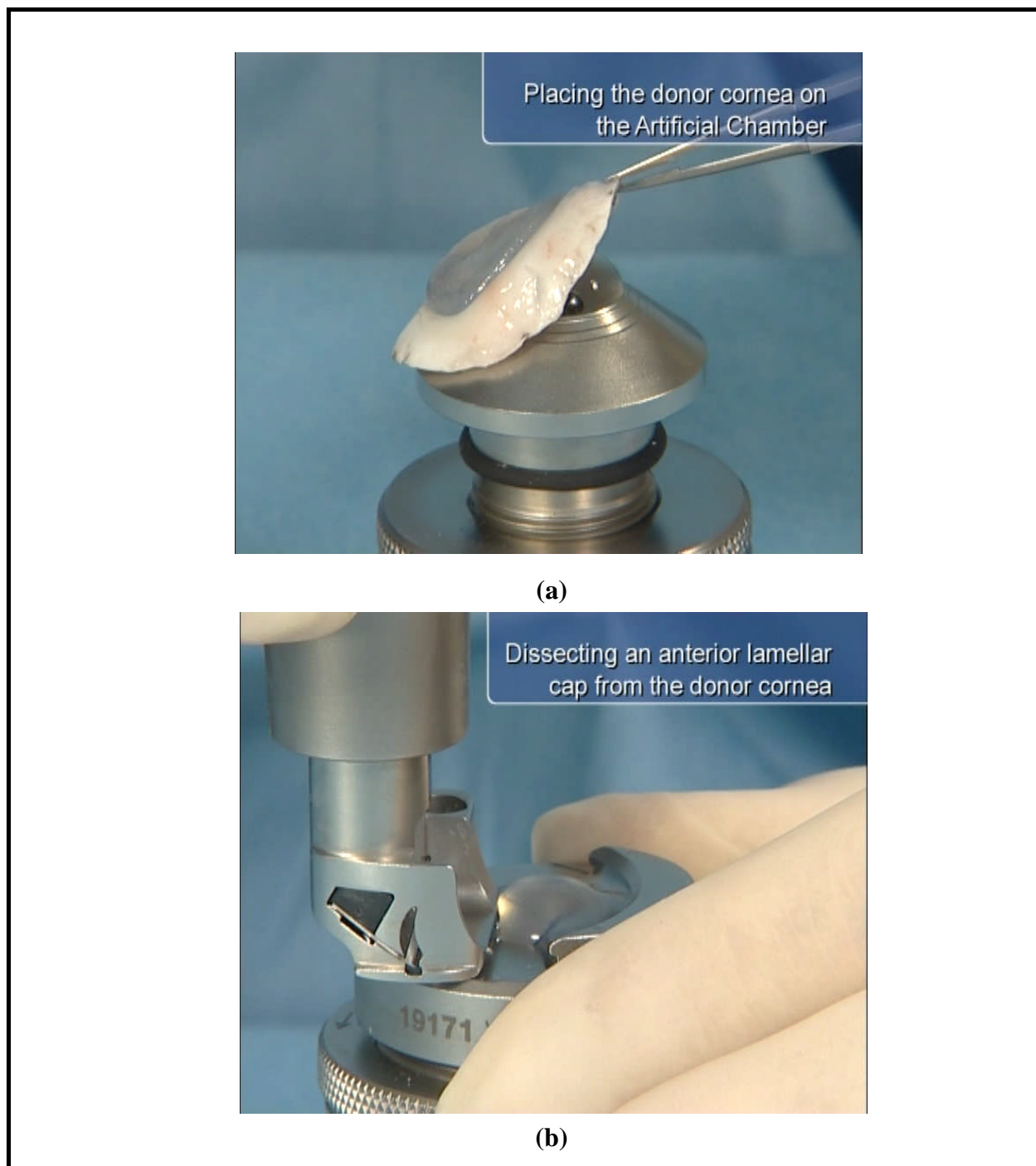
#### b) Le microkératome « optique »

A présent, voyons l'autre grande tendance actuelle de découpe, celle utilisant les lasers ultrabrefs et en particulier femtoseconde, lasers également utilisés pour l'imagerie non linéaire mais à des énergies moindres. Pour cette utilisation chirurgicale, la terminologie est femto-LASIK ou microkératome « optique ».

Principe :

Quand une impulsion de laser est suffisamment focalisée, la densité d'énergie, i.e. l'énergie fournie par l'impulsion rapportée à la surface dans laquelle elle est focalisée ( $\text{J.m}^{-2}$ ), permet de générer le phénomène (Vogel *et al.*, 2003, Vossmerbaeumer *et al.*, 2008) de brisure optique par induction laser (en anglais LIOB pour « laser-induced optical breakdown »). Contrairement aux phénomènes de génération d'harmoniques, il faut atteindre un seuil pour pouvoir déclencher le phénomène. Mis à part quelques expériences d'utilisation directement avec un oscillateur (Konig *et al.*, 2004), une étape d'amplification des impulsions est le plus souvent requise (Han *et al.*, 2004a) pour que chaque impulsion puisse gagner en énergie tout en conservant leur courte durée. Les atomes sont alors ionisés (voir la fig. 2.8) par l'impulsion dans un processus multiphoton, et les électrons libérés provoquent par leur énergie cinétique une avalanche d'ionisation jusqu'à la formation d'un plasma dont les densités d'électrons sont entre  $10^{18}$  et  $10^{22} \text{ cm}^{-3}$  (Vogel *et al.*, 2003) pour que le LIOB ait lieu. Ce plasma est accompagné d'une émission lumineuse (Vogel *et al.*, 1999) à large spectre (rayonnement/luminescence plasma). La relaxation thermique des électrons, induit au foyer une expansion explosive du plasma et une onde de choc d'amplitude de plusieurs GP. Cette expansion dans le matériau crée la bulle de cavitation (Faktorovich, 2009, Lubatschowski *et al.*, 2000). En positionnant une séquence de telles cavités avec de bonnes dimensions, le long d'une ligne, il est alors possible de créer une déchirure susceptible de permettre la séparation des deux parties du matériau.

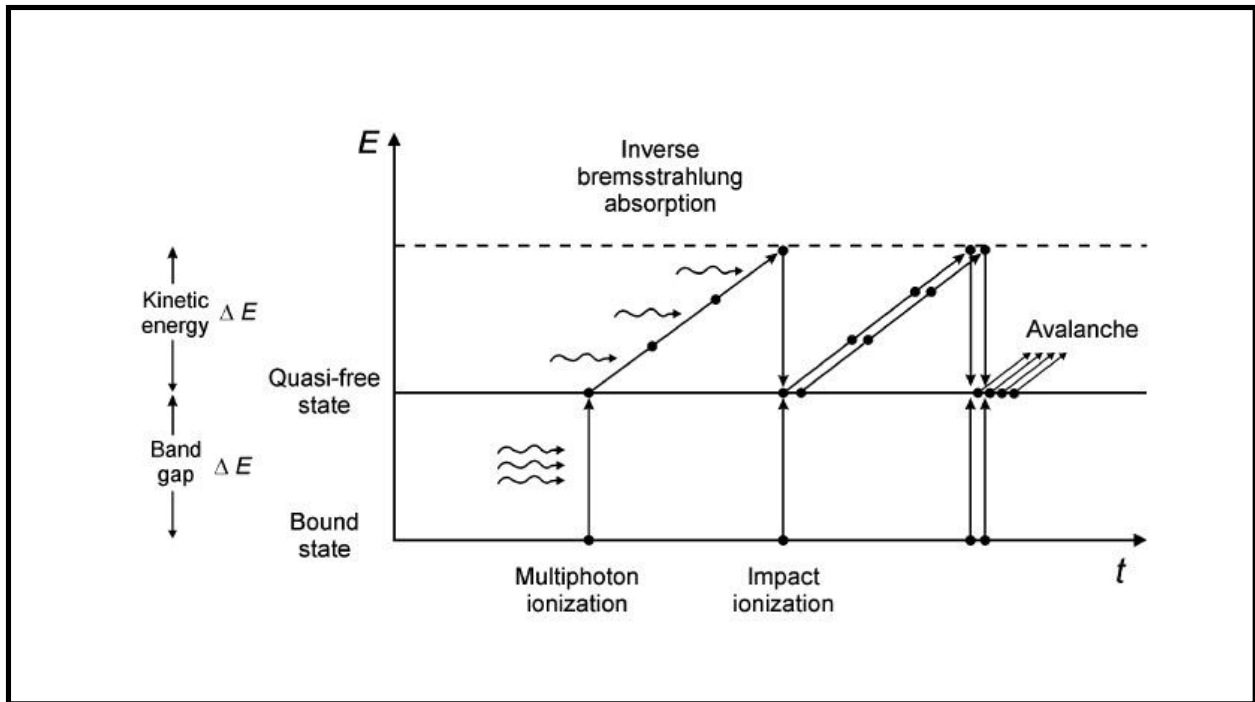
En génie biomédical et plus précisément en ophtalmologie cornéenne, ce « micromachining » est utilisé pour créer les coupes associées aux différentes procédures chirurgicales (LASIK, Femtosecond lenticular extraction, keratoplastie... (Chamberlain *et al.*, 2011, Dapena *et al.*, 2009, Faktorovich, 2009, Plamann *et al.*, 2010)). La théorie autant que l'expérience ont montré sur les régimes nanoseconde (ns), picoseconde (ps) et femtoseconde (fs) de la durée de l'impulsion pour ablater, que les effets collatéraux et les dommages thermiques étaient considérablement réduits si la durée de l'impulsion était raccourcie (Giguère *et al.*, 2007, Vogel *et al.*, 2003). La densité d'énergie ( $\text{J.m}^{-2}$ ) peut ainsi être diminuée pour réaliser le LIOB avec le raccourcissement de la durée des impulsions. À présent la tendance en chirurgie laser de la cornée, est donc aux impulsions fs qui ne laissent pratiquement aucun dommage collatéral autour du trou qu'elles ont créé. Pour cependant vérifier ce fait de qualité, certaines équipes de recherche ont caractérisé l'ablation mais aussi les déformations du tissu environnant : même si



**Figure 2.7** Le microkératome automatique

Dans cet exemple, le microkératome est utilisé pour préparer le tissu du donneur. (a) la cornée avec une part de sclère est déposée sur la chambre antérieure artificielle. (b) le microkératome est activé à travers la cornée sous pression pour réaliser le capot.

Illustrations de la compagnie Moria.



**Figure 2.8 Ionisation par absorption multiphoton**

Combinaison de l'absorption multiphoton et de la cascade d'ionisation comme explication de la production du plasma du LIOB. Une fois l'électron dans l'état quasi-libre, celui-ci peut être accéléré par des photons supplémentaires (absorption bremsstrahlung inverse) ayant pour conséquence une ionisation par impact.

Cette figure est tirée de la source : (Vogel *et al.*, 2003).

le tissu autour de la cavité ne subit pas des dommages thermiques comme aux régimes plus longs, l'expansion du plasma et l'onde de choc qui s'ensuit peuvent être à l'origine de contraintes mécaniques pouvant laisser une signature dans le réseau de collagène.

L'IGSH permet justement de très bien observer et caractériser les bulles de cavitations qui sont suffisamment volumineuses pour être résolues et facilement identifiables par l'absence de matériau générant la SH à l'intérieur de la cavitation. Ce dernier point n'est cependant pas complètement vrai car il a été quand même observé (par MET) des fibres de collagène restant dans les cavités (Lubatschowski *et al.*, 2000, Plamann *et al.*, 2010). Plus précisément les études en IGSH sur le sujet, ont permis de montrer qu'une bulle de cavitation avait normalement une forme typiquement elliptique avec des dimensions de l'ordre de la vingtaine de microns. Cependant ces formes et dimensions sont fonction des caractéristiques de l'excitation (Han *et al.*, 2004a, Han *et al.*, 2004b). Généralement il est nécessaire de dépasser le seuil strict d'ablation si



le but est véritablement de créer un capot cornéen séparable. Par ailleurs, le collagène environnant la bulle, est en fait perturbé dans une très petite proportion, de quelques microns autour de la bulle. Des stries micrométriques peuvent aussi apparaître si l'ouverture numérique (ON) de l'objectif de focalisation (condenseur) n'est pas forte (autour de 0.2 (Han *et al.*, 2004a)). Il faut signaler que ces ablations peuvent être étudiées à différentes échelles de temps, où trois dynamiques rentrent en jeu. Il y a d'une part la dynamique explosive de la bulle avec l'atteinte de son diamètre maximal : quelques microsecondes (Juhasz *et al.*, 1996). Il y a la dynamique de diffusion, d'évacuation des gaz laissés par les bulles et de leur effondrement : autour d'une vingtaine de secondes jusqu'à plusieurs dizaines de minutes suivant la taille des bulles (Juhasz *et al.*, 1996). Ce n'est qu'à la fin de ce processus que la cornée redevient claire : c'est à ce moment que le chirurgien, à l'aide d'une spatule de dissection peut venir couper les ponts qui étaient entre chaque bulle et lever le capot pour procéder à l'application du laser excimer. Enfin, il y a la dynamique biologique : celle de la cicatrisation (Jester, 2007a, Park *et al.*, 1999, Rumelt *et al.*, 2001, Teng *et al.*, 2007) qui a lieu sur plusieurs semaines. Il faut cependant remarquer que cette cicatrisation, réalisée par les kératocytes producteurs de collagène, a lieu surtout près des bords du capot plus que dans le stroma si bien qu'un décollement du capot est possible si une trop forte accélération de l'œil survient. Nous aurons l'occasion de revenir sur ces points à l'occasion du chapitre de résultat sur les coupes intrastromales (voir le chap. 8).

#### **2.1.4 Besoins en imagerie cornéenne**

Au vu de ces deux exemples de la dystrophie de Fuch's et de la chirurgie réfractive LASIK, on comprend la nécessité d'une imagerie non invasive offrant une haute résolution spatiale contrastant les différentes structures anatomiques en particulier du côté postérieur de la cornée, ou les marques d'une opération chirurgicale (incision, sutures...) pour en voir de potentielles complications.

En considérant ces deux exemples, le microscope doit ainsi idéalement être un outil :

- a) de diagnostic : donner une fine observation contrastée des couches postérieures cornéennes pour observer les changements morphologiques et structuraux précoces à cet endroit. L'instrument peut aussi réaliser des fonctions biométriques comme la pachymétrie qui servent de référence pour le diagnostic et la prise de décision d'opérer ou

non : une cornée trop fine est par exemple est une contre-indication pour opérer du LASIK (Probst *et al.*, 2010) ;

b) de contrôle opératoire : guider et observer l'opération chirurgicale elle-même. Cette tâche serait surtout utile dans le cas d'une opération longue qui demanderait par exemple l'utilisation de couteaux ophtalmiques car sinon des instruments comme le microkératome ou le laser femtoseconde chirurgical sont pré-paramétrés et effectuent leur tâche en un temps très court ;

c) de contrôle postopératoire :

- observer ce qui se passe à plus ou moins long terme aux endroits directement marqués dans le tissu, i.e. le long des incisions (cicatrisation) ou près des sutures pour contrôler si celles-ci ne sont pas des foyers d'infection ;
- mais aussi dans le reste de la cornée pour, par exemple, s'assurer que le stroma est bien redevenu structurellement normal alors que seules la membrane de Descemet et l'endothélium ont été remplacés.

Nous allons justement voir dans ce qui suit quelles méthodes sont déjà employées cliniquement pour essayer de répondre à ces besoins. Cette description de l'instrumentation ophtalmologique cornéenne et la revue de littérature associée nous permettra de comprendre ce que peut apporter la microscopie de génération d'harmoniques.

## 2.2 Imagerie cornéenne en optique linéaire

L'œil est de tous les organes celui qui est le plus exploré par l'imagerie médicale (Cavanagh *et al.*, 2006, Hormière, 2010, Wolffsohn *et al.*, 2008). La raison de cette prolifique exploration est justement que l'imagerie visible-IR est possible aussi bien sur ses éléments optiques (segment antérieur) qu'au plus profond de l'organe, i.e. la rétine. Par ailleurs, les méthodes « traditionnelles » de l'imagerie médicale corporelle y sont aussi déployées avec l'échographie, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et même la scintigraphie (Ducasse, 2009, Faber *et al.*, 2008, Kolk *et al.*, 2005, Mouriaux *et al.*, 2010). Cependant ces méthodes sont davantage dédiées, de par leur plus faible résolution spatiale, à l'observation entière du globe oculaire et de l'orbite.

Plus précisément dans l'œil, la cornée est un tissu de surface comme la peau, ce qui en fait un objet d'imagerie médicale très particulier par son accessibilité aux méthodes optiques. Par ailleurs, contrairement à la peau, la cornée est transparente et de diffusion très faible<sup>3</sup> ce qui permet de la sonder dans toute sa profondeur mais pose cependant un problème de contraste.

À cause de ces caractéristiques, l'offre en instrumentation de diagnostic de la cornée est très variée et contrairement à la rétine (tomographie par cohérence optique, ophtalmoscope), il y a une totale liberté sur les optiques de condensation et de collection : en particulier il est possible d'utiliser de fortes ouvertures numériques afin d'exploiter une haute résolution spatiale.

Quelles sont donc les technologies optiques qui passent pour être les plus performantes pour l'étude cornéenne dans le domaine de l'optique linéaire. Certaines d'entre elles sont surtout tournées vers la biométrie/optométrie dans la mesure où elles donnent des caractéristiques quantifiées de la géométrie de la cornée (ex. topographie, courbure, stigmatisme et pachymétrie (Hormière, 2010)). Ces méthodes en particulier, fonctionnent en mesurant des réflexions d'objets sur la cornée (mesures dimensionnelles (Laliberte *et al.*, 2007)) ou par la détection de fronts d'onde : aberrométrie (Platt *et al.*, 2001). D'autres sont plus des méthodes d'imagerie à part entière dans la mesure où elles permettent l'observation de la cornée dans ces trois dimensions. Bien évidemment, ces dernières méthodes mentionnées peuvent également fournir toutes les mesures associées à la biométrie cornéenne.

3 : Cette transparence évite à la cornée le principal problème que rencontre l'imagerie biomédicale optique : faire face à un tissu diffusif qui empêche d'observer en profondeur. Ce point est d'ailleurs actuellement ce qui distingue les familles d'imagerie médicale : soit la méthode permet d'avoir une haute résolution mais au détriment de la pénétration (échelle microscopique < 100  $\mu\text{m}$ ) soit le contraire (échelle macroscopique au delà du cm de profondeur). Les travaux actuels d'imagerie se concentrent d'ailleurs actuellement sur l'observation dite mésoscopique à l'interface entre ces deux domaines (Ntziachristos, 2010).

Ce sont ces méthodes qu'il nous importe de survoler pour apprécier la place de la microscopie non linéaire et son intérêt dans cette application ophtalmologique. Toutes les méthodes qui suivent dans ces chapitres, sont des méthodes optiques qui généralement sont dans le domaine spectral visible, voire IR. Certaines d'entre elles sont déjà utilisées dans le cadre de l'examen diagnostique et possèdent donc des intérêts certains pour l'observation de la cornée. Cependant nous allons montrer qu'elles ont aussi leurs limites qui légitiment d'autres voix de recherche en imagerie comme celles que nous avons explorées.

Avant de nous intéresser à ces imageries optiques non invasives, faisons un court chapitre sur les méthodes de microscopie d'observation de la cornée demandant une préparation de l'échantillon comme pour les coupes histologiques ou la MET. Ces méthodes bien qu'*in vitro* restent des outils d'analyse incontournables pour l'histologie cornéenne. Nous ne réaborderons le sujet que dans les résultats, mais la critique formulée ici envers ces méthodes vis à vis des imageries cliniques valent naturellement pour la microscopie de génération d'harmoniques, qui elle aussi, est pensée dans un but non invasif le plus proche possible des conditions physiologiques.

### **2.2.1 Les méthodes de microscopie à préparation**

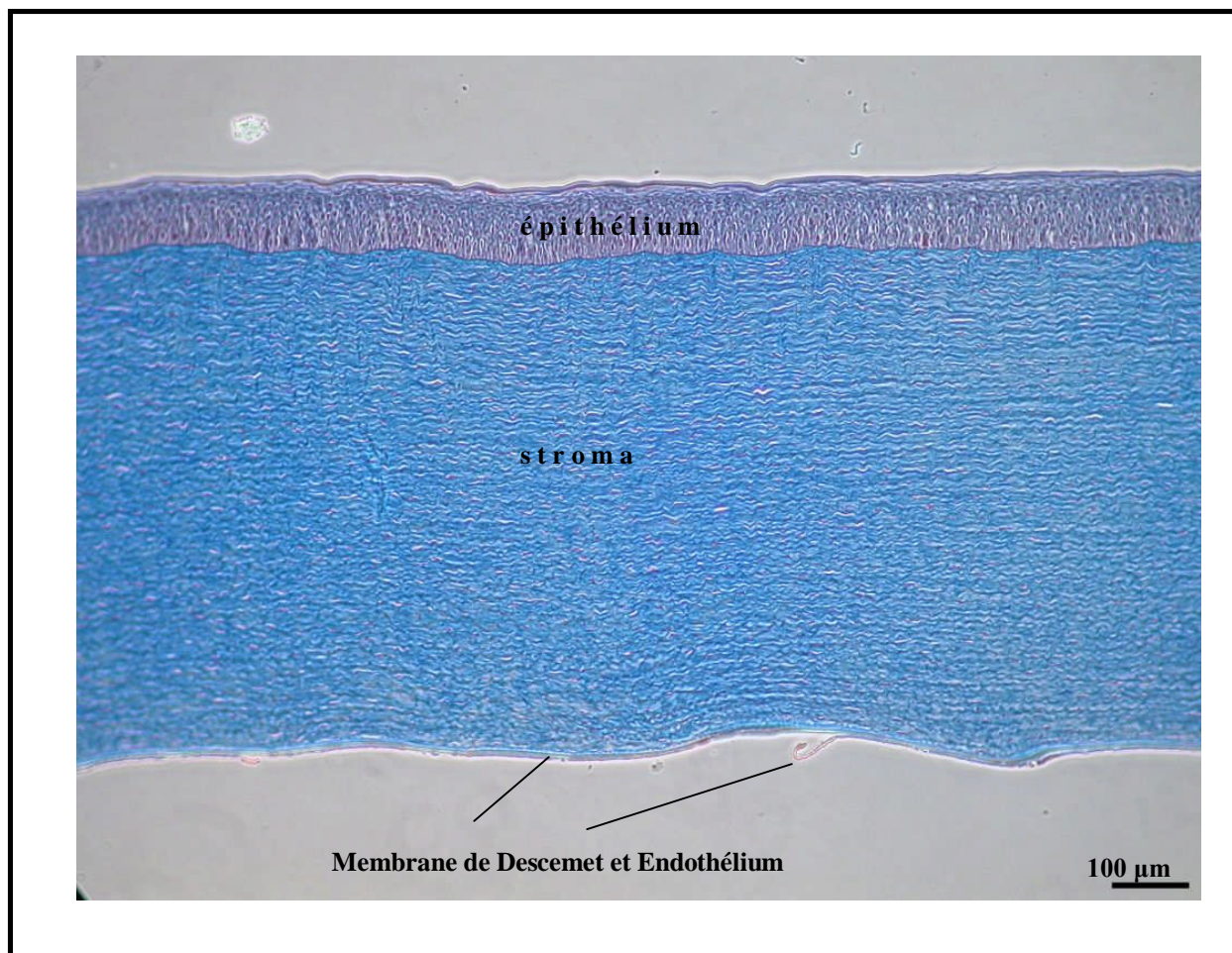
Les plus importantes de ces méthodes sont la microscopie optique (coupes histologiques) et la microscopie électronique, qu'elle soit à transmission (MET) ou à balayage (MEB). Historiquement, c'est naturellement par la microscopie optique qu'il a été possible de dégager l'anatomie de la cornée et d'y identifier les strates qui la constituent. Par exemple, Jean Descemet, médecin français, a ainsi découvert la membrane qui porte maintenant son nom, au 18<sup>ème</sup> siècle (Johnson *et al.*, 1982). La microscopie optique permet aussi de révéler avec un très bon contraste les différentes couches de la cornée jusqu'à la structure en lamelles du collagène stromal avec le jeu de colorants maintenant utilisés, comme le marquage au trichrome de Masson (fig. 2.9) (Wikipedia, 2012g). Par ailleurs comme les observations suivant l'épaisseur de la cornée sont réalisées, après fixation et coupe, concrètement *en face*, il y a la possibilité d'observer le profil de la cornée en bénéficiant de la résolution latérale (bien sûr meilleure qu'en axial) sous forte ouverture numérique (immersion huile). Ce point est important à garder à l'esprit pour comparer ces coupes histologiques aux méthodes microscopiques sur tissu frais où il n'est justement pas possible de faire ce changement de coordonnées.

La MET dont nous avons déjà présenté des clichés de cornée dans le chapitre précédent, a émergé dans les années 50 et a permis de faire un saut énorme dans la description de la structure de la cornée. Ces principales contributions ont été de révéler avec un immense détail la façon dont le collagène stromal était organisé et ceci jusqu'à la fibrille. Enfin, naturellement, la MET est un outil exceptionnel pour imager les cellules de la cornée comme celles de l'endothélium.

D'une façon générale, ces méthodes sont très importantes et ont permis d'apporter beaucoup pour l'anatomie de la cornée. De par leur historique et leur évolution, elles restent une référence pour de nouvelles méthodes de microscopie comme les imageries par génération d'harmoniques. Alors pourquoi ne pas se contenter d'elles seules pour imager et diagnostiquer la cornée ?

Naturellement, ces deux méthodes demandent à faire des biopsies dont une imagerie tridimensionnelle permettrait de se passer. Mais mis à part cette contrainte, les principaux défauts formulés habituellement vis-à-vis de ces techniques sont :

- l'impossibilité de mener une étude dynamique (s'étendant dans le temps) de l'échantillon dans la mesure où le processus vital cellulaire doit être arrêté. Cette possibilité de suivi est aussi fondamentale pour la compréhension des maladies ;
- le temps que l'examen prend : entre le moment où l'échantillon est prélevé à l'hôpital et celui des observations fournies par le laboratoire d'analyse il s'écoule rarement moins de deux semaines ;
- enfin sur un aspect plus fondamental, il est légitime de s'inquiéter des artefacts (Masters, 2009) que peuvent induire les différentes étapes nécessaires à la préparation de l'échantillon pour ces observations *post mortem*.



**Figure 2.9** Coupe histologique de la cornée porcine

Coupe histologique réalisée à l'aide du marquage de trichrome de Masson<sup>4</sup>. La membrane de Bowman est absente chez le porc.

Ces artefacts sont inévitables, que ce soit en microscopie optique ou en microscopie électronique, toutes les étapes suivantes étant nécessaires (B.S. Fine *et al.*, 1979, Wikipedia, 2012f) :

- 1) déhydrater et infiltrer le tissu pour remplacer l'eau par un agent durcissant (paraffine) pour préparer à la coupe,
- 2) fixer le tissu pour le préserver de sa décomposition et maintenir la structure des cellules et du tissu conjonctif. Une solution de formaldéhyde diluée est souvent utilisée à cette fin,

<sup>4</sup> : Les clichés d'histologie au trichrome Masson et de microscopie électronique à transmission ont été réalisés pour nos travaux (dans ce chapitre ou ceux des résultats) par le laboratoire LOEX de l'université Laval. Les protocoles de ces méthodes conventionnelles de microscopie sont développés en détail dans l'article (Proulx *et al.*, 2010).

- 3) couper avec un microtome l'échantillon durci en de très fines sections, cette finesse étant nécessaire pour la microscopie de transmission tant optique qu'électronique,
- 4) enfin marquer/colorer par des agents de contraste qui permettront, par exemple en microscopie optique, de révéler telle structure du tissu. C'est donc à ce moment qu'est, par exemple, réalisée la coloration au trichrome de Masson.

Ces traitements ont beaucoup évolué et, par exemple, les images actuelles (Rouiller *et al.*, 1954, Svaldenienè *et al.*, 2003) en MET de la cornée ne ressemblent plus trop à celles des premiers débuts et ont beaucoup gagné en contraste. Cependant, ces méthodes offrent des observations qui forcément diffèrent avec celles qui sont directement réalisées sur tissu frais. Une des erreurs notables tient au fait que les dimensions de l'échantillon sont modifiées par ces procédés de préparation : la fixation induit un rétrécissement du tissu (Wirbelauer *et al.*, 2002).

Par ailleurs une « bonne » préparation est difficile à réaliser et il n'est pas rare de voir, alors que la cornée était saine, de grosses cavités stromales.

Enfin, il est toujours plus appréciable de pouvoir compter sur des agents de contraste endogènes. Par exemple, il est possible de marquer la cornée d'un patient avec des colorants pour évaluer l'intégrité des cellules superficielles épithéliales ou diagnostiquer certaines pathologies virales de la cornée, à l'aide d'une lampe à fente (voir le chap. 2.2.2 1) a)). Ces colorants sont la fluorescéine et le rose de Bengale. Cependant un tel marquage *in vivo* a deux défauts principaux.

- il y a un risque de toxicité et d'effets secondaires : les deux produits ont fait l'objet d'études pour délimiter des cadres très stricts d'utilisation (Alfonso *et al.*, 2005, Dogru *et al.*, 2005, Feenstra *et al.*, 1992, Marimbert, 2005, Tauber *et al.*, 2005). Par ailleurs, en plus de la toxicité chimique, il peut y avoir une phototoxicité comme c'est justement le cas pour le rose de Bengale. D'une manière générale les fluorophores doivent le plus souvent être excités dans l'UV, ce qui peut être dommageable pour l'acide désoxyribonucléique (ADN) cellulaire. Nous reviendrons sur ces points de dommages cellulaires optiques à l'occasion du chapitre 5.2.2 6) ;
- le second point est que le colorant peut, parfois, ne pas marquer ce qui cherche à être révélé : ces deux mêmes fluorophores, fluorescéine et rose de Bengale, sont connus (Feenstra *et al.*, 1992) pour diffusés dans le stroma plus ou moins rapidement alors que leur action devrait rester cantonnée, pour l'application désirée, à la surface de

l'épithélium. Une imagerie qui exploite des constituants endogènes de l'organe ne pose pas ce problème de contrôle moléculaire ou particulière.

Enfin parallèlement à ces difficultés techniques et scientifiques que posent le recours à des méthodes à marquage, il faut également ajouter des considérations pratiques non négligeables puisque ces préparations nécessitent des consommables et donc génèrent un coût important.

Voyons justement quelles sont les imageries de la cornée dans le domaine linéaire n'ayant justement pas recours à un quelconque agent de contraste.

L'imagerie peut alors compter sur :

- un jeu d'atténuation : il inclut l'absorption mais vu la transparence de la cornée, il est plus pertinent de penser aux atténuations par réflexion ou diffusion  
→ c'est ce qu'exploite le microscope confocal ;
- un jeu de modification de phase  
→ c'est ce qu'exploite la TCO en plus du jeu d'atténuation.

Avant ceci, introduisons une notion importante dès lors que l'on s'intéresse à l'imagerie *in vivo* dans le domaine visible : la question de l'épi-détection. Ce sujet est important car il a été une de nos préoccupations majeures sur les expériences de microscopie de génération d'harmoniques.

### **Concept d'épi-détection**

Pour qu'un instrument optique (UV-VIS-IR) ait une utilité clinique, il est nécessaire que le signal qu'on veuille exploiter, soit détecté du même côté d'où vient l'illumination. C'est ce qu'on appelle une épi-détection. En effet, seules les radiations X et radiofréquence de l'IRM, permettent pour l'instant une imagerie électromagnétique à n'importe quelle profondeur chez l'humain : elles sont absorbées soit par les corps denses (électrons très énergétiques → X) soit par les tissus mous avec l'hydrogène de l'eau (spins → radiofréquences) mais parviennent quand même à traverser tout le corps, au prix toutefois d'une résolution spatiale de 1 à 2 ordres de grandeur moindre qu'en microscopie optique (voir aussi note de bas de page # 3). Ainsi, même si certains de nos résultats qui seront présentés par la suite peuvent montrer des acquisitions réalisées en transmission, il était très important de montrer la faisabilité de l'épi-détection des deux signaux d'harmonique. Dans ce cas, le microscope ne possède qu'un objectif qui joue aussi bien la fonction de condenseur pour l'éclairage, que de collecteur des signaux lumineux.



Au lieu d'épi-détection, on peut parfois rencontrer l'expression « microscopie en réflexion » souvent utilisée en métallographie ou minéralogie (Wikipedia, 2012k). Ce terme réflexion recouvre aussi bien la lumière qui revient par la seule réflexion spéculaire (dioptre lisse), par la réflexion diffuse ou par les diffusions multiples, la lumière transmise revenant en partie finalement.

Cependant, il est aussi important d'imaginer que les signaux aient pu être directement émis depuis le foyer d'excitation vers l'arrière. En effet suivant la mise en forme du faisceau plus ou moins focalisé (ouverture numérique), la structure des molécules excitées et l'organisation de celles-ci dans le volume du foyer, la lumière émise, qu'elle soit du domaine de l'optique linéaire ou non linéaire avec les harmoniques, peut être dirigée principalement vers l'avant (en anglais « forward »), en dehors de l'axe optique, et même vers l'arrière (en anglais « backward »). Par la suite nous conviendrons que ces termes avant et arrière ne font référence qu'à ces émissions directes dues aux phénomènes d'interaction lumière-matière. Sinon on parlera de façon générale de signaux de retour (ou en épi-détection) et de signaux en transmission. Cette question importante de la directionnalité (diagramme de rayonnement) sera discutée dans les chapitres spécifiques de la GSH et de la GTH.

Cependant avant d'aborder les instrumentations cliniques qui exploitent justement l'épi-détection, mentionnons que la lumière incidente sur la cornée est connue

- d'une part pour être réfléchi : c'est ce qui donne les images premières et seconde de Purkinje formées par la réflexion d'une source placée devant l'œil respectivement sur la surface antérieure ( $\approx 2\%$  de réflexion de la lumière incidente visible) et postérieure de la cornée ( $\approx 0.02\%$  (Schwiegerling, 2004)). Les imageries cliniques cornéennes exploitent directement ces deux réflexions spéculaires ;
- d'autre part pour diffuser : même si elle est saine et sans œdème, la cornée diffuse et les études de Feuk *et al.* (1971) ont, par exemple, approfondies comment la lumière incidente sur une cornée de lapin était redistribuée angulairement. Depuis d'autres travaux se sont intéressés à quantifier cette diffusion chez l'homme (Hillenaar *et al.*, 2011, Patel *et al.*, 2007b), y compris dans le cas de l'œdématisation (J. Wang *et al.*, 2004).

## 2.2.2 Les méthodes d'imagerie clinique de la cornée

### 1) Microscope avec lampe à fente et microscope spéculaire

Dans ces deux instrumentations, la lumière incidente, dans le visible, vient d'une source étendue et l'éclaire est oblique. Par ailleurs, les deux instruments exploitent la réflexion spéculaire suivant la règle de Snell-Descartes. Dans le cas du microscope avec lampe à fente cette obliquité se justifie pour offrir une liberté quant aux plans d'observations permettant tous les intermédiaires entre une observation de profil (transversale) de la cornée et une observation *en face*. Dans le cas du microscope spéculaire la raison de cet éclairage oblique, est davantage historique que technologique, dans la mesure où le microscope spéculaire est venu dans le prolongement du microscope à lampe à fente. Cependant cette obliquité permet aussi de séparer la lumière d'éclairage de celle à collecter sinon il faut utiliser une lame séparatrice ou un miroir dichroïque comme sur un microscope à réflexion « classique ». Cette obliquité conditionne avec la largeur de fente et les caractéristiques de l'objectif condenseur, le champ d'observation et les résolutions spatiales (Hormière, 2010) (voir fig. 2.10).

Sur la question du contraste, pour ces deux microscopes, l'éclairage oblique spéculaire a un certain intérêt. En effet, il permet de s'affranchir, à l'aide d'un diaphragme de champ placé dans le plan image de l'objectif :

- d'une réflexion parasite quant à la couche cornéenne qui doit être observée. C'est ainsi que la forte réflexion de l'interface extérieur/épithélium peut être occultée pour ne pas parasiter l'observation de l'endothélium ;
- d'une rétrodiffusion que le stroma peut induire.

#### a) Microscope avec lampe à fente

C'est un microscope<sup>5</sup> qui permet une observation macroscopique de la cornée, l'idée étant plus d'avoir une grande liberté d'utilisation et de manipulation (fig. 2.10 (a)) : plans d'observations multiples, grande distance de travail (90-125 mm) entre l'œil et l'instrument pour tester des lentilles de contact par exemple. L'éclairage, typiquement tungstène halogène mais possiblement filtré spectralement, est fait via une fente dont l'image est formée sur la cornée et qui n'est pas forcément la source primaire qui sera finalement observée. L'ouverture de la fente conditionne le contraste avec la condition de l'éclairage de Koehler pour son homogénéité.

5 : le microscope avec lampe à fente est parfois appelé biomicroscope

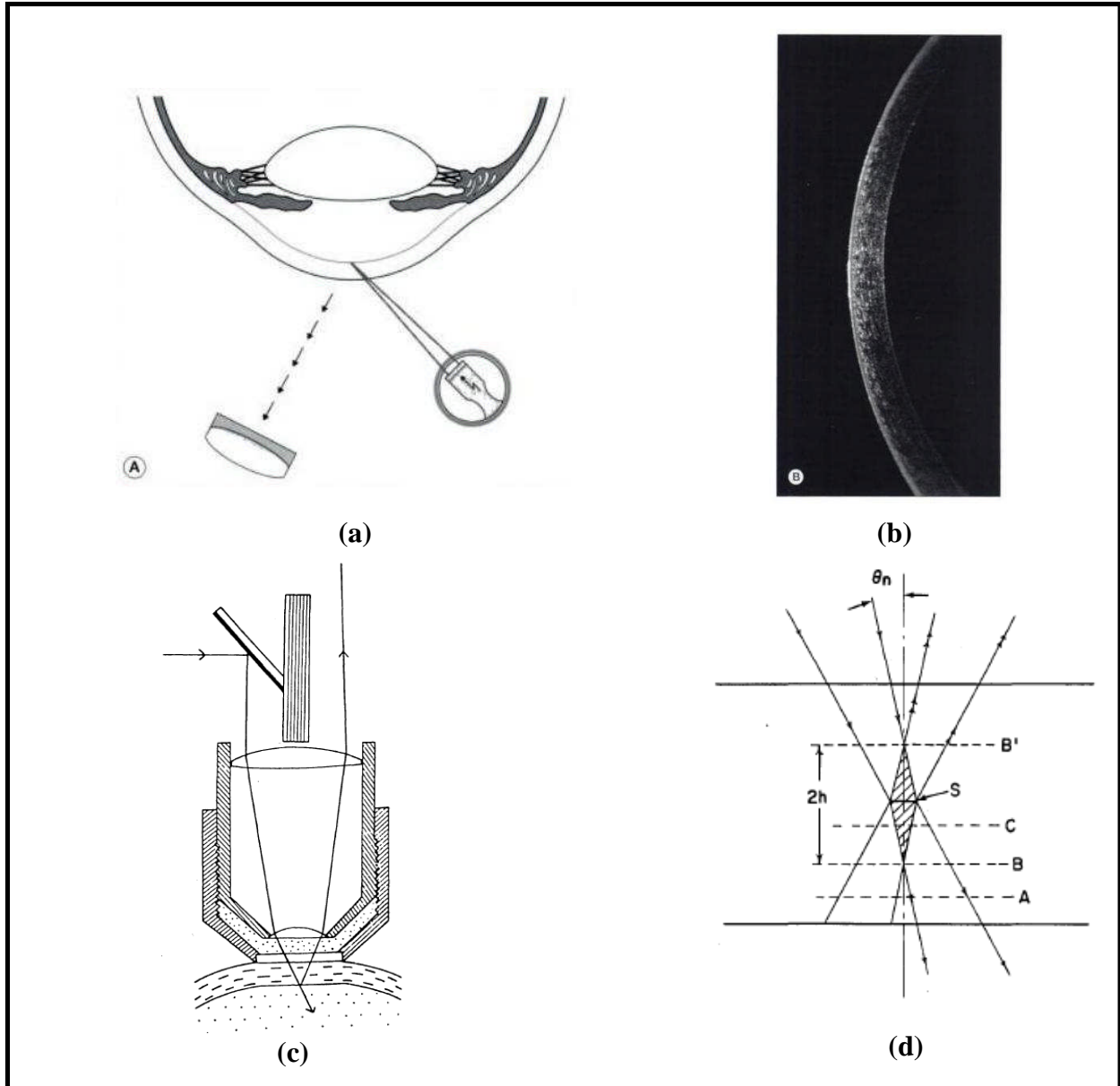
La partie collectrice du microscope à fente utilise des objectifs de faible grandissement interchangeables et sans remise au point et l'observation se fait avec deux oculaires pour permettre une vision stéréoscopique (stéréomicroscope).

Le microscope permet typiquement l'observation de certains défauts cornéens, la chambre antérieure, les opacités du cristallin et d'estimer la pachymétrie. C'est aussi par ce système qu'on réalise les photographies globales de la cornée. Dans les meilleurs réglages de l'instrument il est possible de réaliser des observations de cornée saine (fig. 2.10 (b)) très proches de ce que peut fournir la TCO (voir le chap. 2.2.2 3) et le chap. 6.4.3 sur la TCO). La résolution latérale du biomicroscope est typiquement de 10  $\mu\text{m}$ .

#### b) Microscope spéculaire

La microscopie spéculaire s'inscrit dans une continuité de développement technologique de la lampe à fente mais est limitée à l'observation de la cornée par les grossissements plus forts utilisés. Comme en microscopie avec lampe à fente, le microscope spéculaire utilise une source fente de largeur variable (conditionnant résolution, champ, contraste) avec un éclairage oblique d'angle fixé, réalisé par une division longitudinale, grâce à un diaphragme placé avant l'objectif condenseur/collecteur : la lumière de la source fente occupe une moitié des optiques de l'objectif et la lumière réfléchiée spéculairement sur les interfaces biologiques occupe l'autre moitié symétrique (fig. 2.10 (c)) (Bourne *et al.*, 2004, Koester, 1980).

L'ouverture numérique est ainsi deux fois moindre que normalement. La plupart du temps, l'objectif utilisé est un objectif avec contact à immersion à eau, cette immersion offrant l'avantage d'une réduction du reflet de la cornée à sa surface gênant l'observation de l'endothélium. En pratique, on utilise un gel ophtalmique dont la consistance visqueuse est plus pratique et dont l'indice de réfraction est très proche de l'eau. C'est avec un gel ophtalmique que nous avons également réalisé nos expériences de microscopie de génération d'harmoniques. Réaliser le contact en microscopie ophtalmique en clinique n'est pas rare et d'ailleurs certains objectifs sont munis d'un embout pour maintenir l'œil en position fixe sous l'objectif (Phillips *et al.*, 2005).



**Figure 2.10** Microscope à lampe à fente et microscope spéculaire

(a) et (b) microscope à lampe fente avec (a) une grande distance de travail, éclairage oblique et détection spéculaire. (b) observation de cornée saine vue transversalement. (c) et (d) microscope spéculaire avec (c) les mêmes caractéristiques qu'en (a) mais transposée sur un objectif. (d) la résolution axiale : sur un objet S, le recouvrement des faisceaux incidents et réfléchis définit la résolution axiale limitée par les positions B et B' ( $2h$ ), C n'est pas résoluble alors que A l'est. La résolutions axiale mais aussi latérale sont fixées, en plus de l'oblicité et de la largeur de fente, par l'ouverture numérique (convergence des faisceaux).

Les sources sont tirées de : (a) et (b) (Martonyi, 2005) ; (c) et (d) (Koester, 1980)

L'objectif du microscope spéculaire a typiquement un grandissement de 40X et une distance de travail de 1.6 mm (Millodot, 2008). Le microscope offre théoriquement d'après le principe d'éclairage oblique discuté plus haut, la possibilité d'observer et de résoudre (fig. 2.10 (d)) différentes régions de la cornée appelées zones (Hormière, 2010), mais dans les faits, de par la faiblesse des réflexions aux autres interfaces ou à cause du contraste particulier qu'implique l'obliquité, l'utilisation du microscope spéculaire est limitée à l'observation de la couche monocellulaire endothéliale *en face* en condition non oedémisée de la cornée (Cavanagh *et al.*, 2005a).

## 2) Microscope confocal

Dans l'étude *in vivo* de tissus, les microscopes classiques, plein champ, ont l'inconvénient d'être extrêmement sensible à la lumière parasite issue généralement de la diffusion des milieux mêmes, que cette lumière provienne du même plan focal de mise au point ou de plans à d'autres hauteurs (Lukosz, 1966, Wilson, 2009). Ceci amène une baisse de contraste et également une baisse de résolution. Le filtrage spatial de cette lumière parasite offre donc un moyen d'améliorer la qualité des images en particulier sur le plan de la résolution spatiale (latérale et axiale). La technologie confocale réalise ce filtrage spatial à cette fin. La figure 2.11 en présente le principe (Cavanagh *et al.*, 2006).

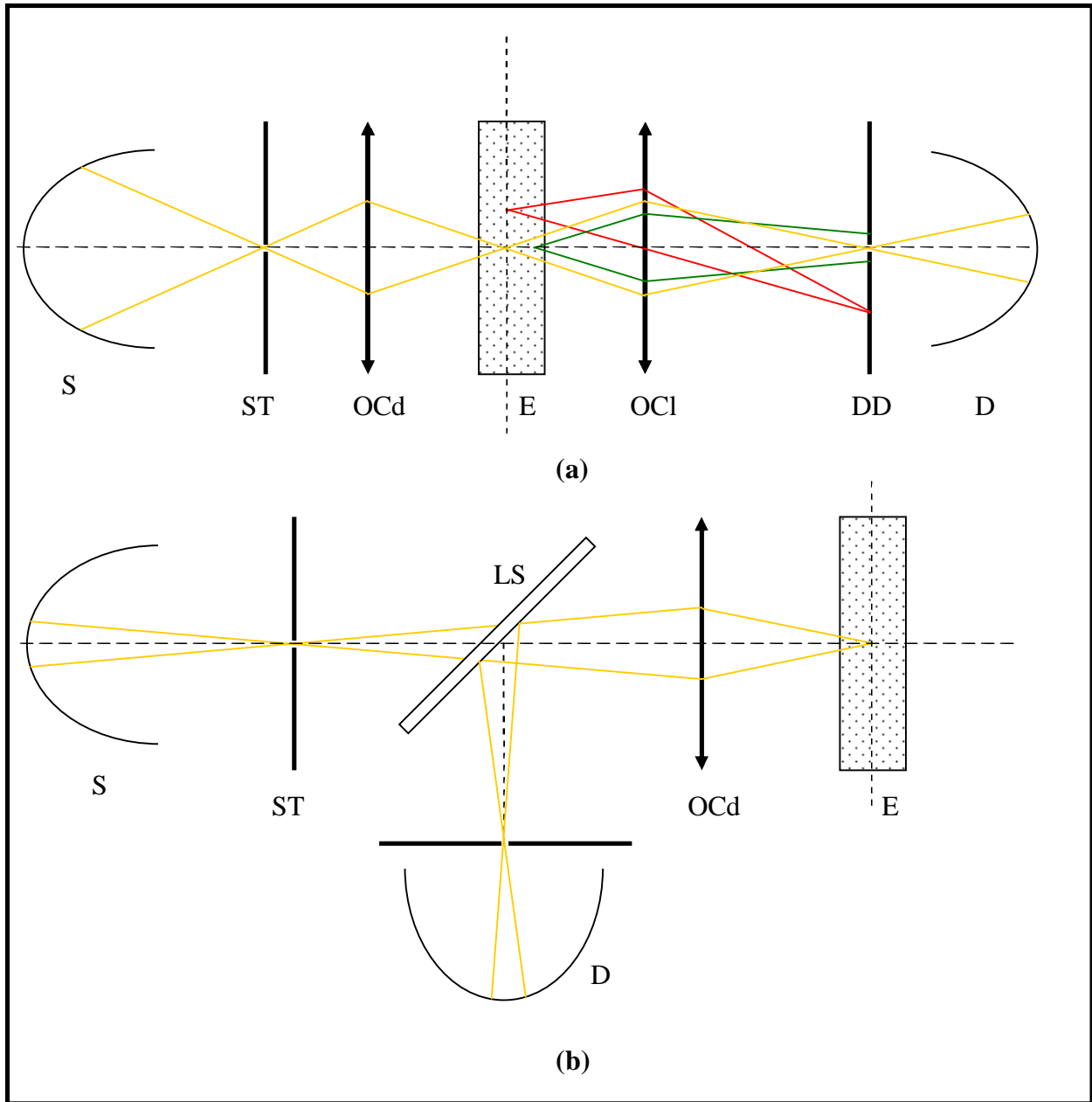
Comme l'illustre la figure 2.11, un point critique est que la source pour imager vient de ce minuscule trou (sténopé) placé devant une lampe qui est une source étendue incohérente et la lumière qui vient de ce sténopé est ainsi cohérente spatialement. Dans le cas d'un éclairage par laser (Ferrando *et al.*, 2000), ce diaphragme n'est *a priori* plus nécessaire puisque le laser est justement cohérent spatialement. Dans le commerce, il y a maintenant les deux types de source, soit (lampe + sténopé), soit laser. L'image du point source par l'objectif condenseur est donc réduit à la tâche d'Airy sur l'échantillon, et l'objectif collecteur dont la mise au point est faite sur ce point, partage ainsi, le même foyer que celui d'éclairage d'où le terme de confocal. Ainsi, la dimension du sténopé doit de façon optimale, correspondre aux dimensions de la tâche d'Airy (résolution latérale) dans le plan focal de l'échantillon.

Cependant, comme nous l'avons mentionné plus haut, un autre diaphragme au niveau de la détection, est absolument nécessaire, quel que soit le type de source, pour s'assurer que la lumière ne provienne bien que de ce point objet avec les avantages de résolution, surtout en

axial, qui en résultent. Ainsi, pour réaliser une image de l'échantillon, il faut, soit déplacer l'échantillon sous cet éclairage fixe, soit balayer le faisceau sur l'échantillon qui reste fixe en hauteur. Cependant dans cette seconde option, il faut pour assurer un retour collecté par le sténopé de détection soit refaire passer le faisceau collecté à travers le balayage par miroirs (laser) soit utiliser un montage avec un disque de Nipkow (lampe) (Cavanagh *et al.*, 2006). Cette dernière option est ce qui est appelé le microscope confocal à balayage tandem. Nous ne développerons pas davantage ces aspects techniques mais ils sont importants à garder à l'esprit puisque la microscopie non linéaire qui nécessite également un balayage laser n'a pas cet inconvénient de rajout de matériel, comme ce disque, puisqu'il n'y a justement pas de diaphragme (voir aussi le chap. 5.2.2).

En ophtalmologie cornéenne, le microscope confocal fait maintenant suite au microscope spéculaire (Jurkunas *et al.*, 2005), même si celui-ci reste toujours utilisé pour l'examen de l'endothélium pour les cornées non oedémisées. En microscopie confocale, la fente du microscope spéculaire s'est donc réduite au faisceau à balayer (Cavanagh *et al.*, 2005b, Erie *et al.*, 2009, Koester, 1980, Masters, 1998, Phillips *et al.*, 2005). En réalité, même si idéalement les diaphragmes confocaux doivent être des trous ronds, certains appareils, tout de même appelés confocaux, utilisent plutôt de fines fentes rectangulaires pour accélérer le balayage. La séparation entre l'éclairage et la collection se réalise, suivant les appareils offerts, avec division sur l'objectif (donc obliquité voir la fig. 2.10 (c)) ou avec une lame séparatrice/miroir dichroïque dans le cas d'un microscope confocal laser à fluorescence ou tandem (voir la fig. 2.11 (b)). Dans le commerce justement, les microscopes confocaux ont tendance à utiliser des lasers comme source d'émission. L'appareil HRT III (Heidelberg Retina Tomograph III, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany) est un ophtalmoscope pour l'observation de la rétine adaptable aussi pour la cornée. Sa résolution est de 4 et 2  $\mu\text{m}$  respectivement en latéral et axial (Hormière, 2010).

Les meilleurs microscopes confocaux donnent actuellement une résolution de 200 nm dans les trois directions mais au prix d'une ouverture numérique supérieure à 1.5 limitant par conséquent la distance de travail (Hormière, 2010).



**Figure 2.11 microscope confocal en transmission et épi-détection**

(a) microscope confocal en transmission. Les rayons jaunes sont ceux qui sont effectivement détectés alors que les rayons verts et rouges émis d'un autre point que le foyer sur l'échantillon sont éliminés par DD. (b) microscope confocal en épi-détection.

S : source ; ST : sténopé ; OCd : objectif condenseur ; E : échantillon ; OCl : objectif collecteur ; DD : diaphragme de détection ; D : détecteur ; LS : lame séparatrice.

Même si les microscopes confocaux permettent d'observer de nombreuses structures de la cornée (cellules en particulier) et sont même à présent utilisés cliniquement comme moyen de contrôle postopératoire pour les greffes de cornée et la chirurgie réfractive (Kitzmann *et al.*, 2007, Moller-Pedersen *et al.*, 2000), il est tout de même abusif comme le disent certains auteurs (Baudouin *et al.*, 2009), de comparer les images de microscopie confocale aux coupes histologiques *in vitro*. En effet, les coupes histologiques, offrent, par leur jeu de marquage, un contraste exceptionnel entre les différentes couches et, au sein du stroma, la visualisation des lamelles de collagène et des kératocytes quel que soit leur niveau d'activité. Par exemple en microscopie confocale sur cornée fraîche et sans recours à la fluorescence, l'interface d'un LASIK (au microkératome optique ou mécanique) n'est pas révélée directement mais les kératocytes dans le voisinage de la coupe en périphérie sont plus actifs et donnent un signal plus fort en microscopie confocale (Kitzmann *et al.*, 2007, Sonigo *et al.*, 2006) (voir aussi le chap. 8). C'est donc dans ces conditions physiologique particulières de la cornée que les kératocytes contrastent vraiment.

### **3) Tomographie par cohérence optique (TCO)**

L'interférométrie optique temporelle est la base théorique de la technologie TCO. Ainsi, il est possible de modéliser l'instrument par un interféromètre de Michelson où une des réflexion se fait sur un miroir de référence et l'autre sur l'œil (fig. 2.12). Cependant comme il est question de microscopie, il doit y avoir utilisation d'un objectif pour l'épi-détection des signaux oculaires. Pour annuler les aberrations optiques, surtout chromatiques, qui pourraient être occasionnées par la dispersion des différents milieux oculaires, qui ont tous à peu près l'indice de réfraction de l'eau, le bras de référence comporte idéalement le même objectif que celui de l'échantillon et est immergé dans le même milieu. C'est la configuration de Linnik (fig. 2.12). La figure 2.13 illustre un résultat d'imagerie cornéenne en TCO.

#### **a) La TCO dans le domaine du temps**

Chronologiquement et logiquement par rapport au montage de Michelson, la TCO a d'abord acquis des images par déplacement du miroir de référence. C'est ce qui définit la TCO dans le domaine du temps. À chaque fois que la différence de marche est suffisamment faible devant la cohérence temporelle de la source pour permettre une interférence avec une lumière réfléchi sur une interface croisée dans l'échantillon, il y a détection d'un signal à cet endroit. Pour avoir un



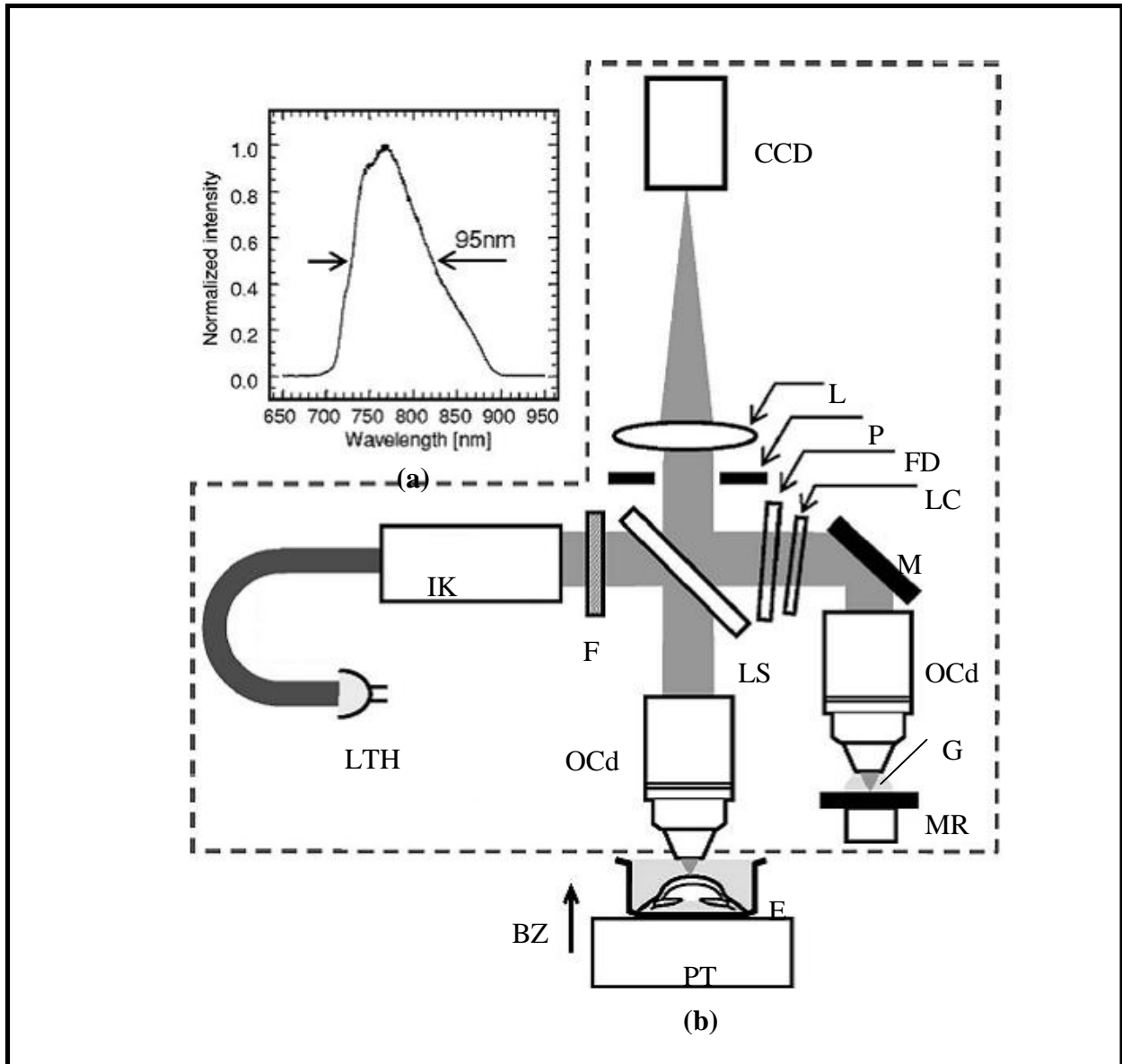
profil suivant l'épaisseur de l'échantillon, il faut donc déplacer le miroir d'autant que cette épaisseur totale (A-scan) (voir la fig. 2.14). Ensuite il faut réaliser un balayage latéral (B-scan) pour construire des images transversales (sur ces questions de balayage voir aussi le chap. 5.2.2) ou des volumes.

#### b) La TCO dans le domaine de Fourier

Cependant, les instruments actuels performant davantage en vitesse en intégrant plutôt la démarche avec transformée de Fourier pour ne plus effectuer le A-scan mais seulement le B-scan (Tomlins *et al.*, 2005) : si la source est à large bande et qu'un spectromètre résout spectralement les interférences des signaux de référence et d'échantillon, la fréquence du spectre obtenu encode pour une position dans l'échantillon où s'est produite une réflexion ou rétrodiffusion. Ce type de TCO également plus sensible (de Boer *et al.*, 2003, Yaqoob *et al.*, 2005). La figure 2.15 en donne le principe. Cependant pour pouvoir réaliser une telle acquisition simultanée sur toute l'épaisseur, il faut une profondeur de champ qui est forcément contrariante pour la résolution latérale (voir plus bas sur la résolution en TCO). L'appareil de TCO que nous avons utilisés dans nos expériences (voir résultats) est justement un appareil qui procède dans le domaine de transformée de Fourier. Plutôt que d'utiliser un spectromètre, il est aussi possible d'illuminer avec une source accordable (« swept-source » en anglais) et ce balayage en longueur d'onde assurera également le A-scan.

#### b) La résolution spatiale en TCO

Alors que la résolution latérale est comme dans tout microscope optique linéaire directement reliée à l'ouverture numérique de l'objectif, la résolution axiale de par ce principe interférométrique procède très différemment.

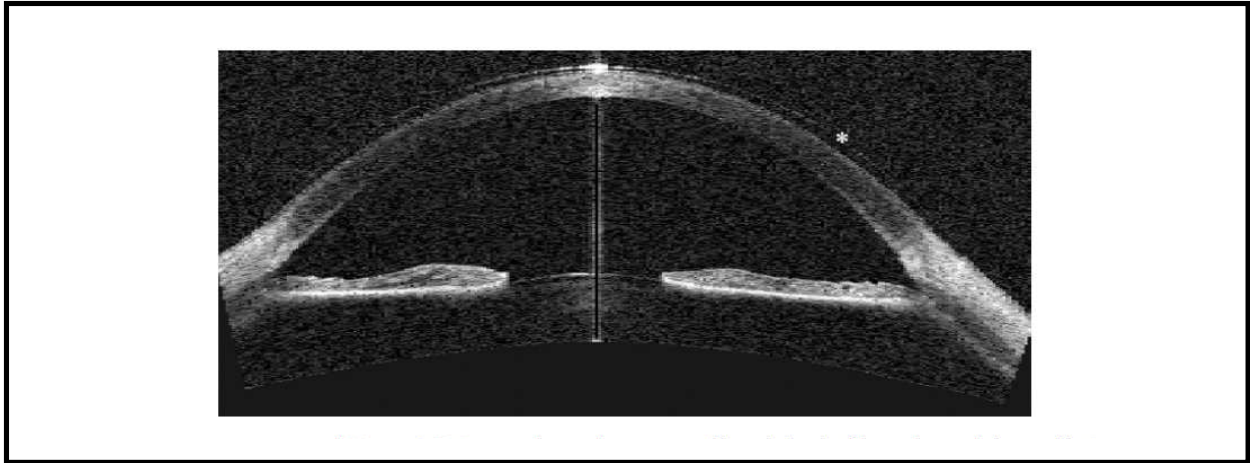


**Figure 2.12** Schéma du tomographe de cohérence optique (TCO) en configuration Linnik

(a) spectre large bande de la source. (b) montage de TCO basé sur un interféromètre de Michelson. Dans ce montage, un balayage suivant z (focalisation dynamique) de l'échantillon est nécessaire pour bénéficier d'une forte ouverture numérique et ainsi une résolution latérale proche du micron.

LTH : lampe tungstène hallogène ; IK : illumination de Köhler ; F : filtre ; LS : lame séparatrice ; OCd : objectif condenseur ; E : échantillon ; PT : platine de translation ; BZ : balayage suivant z ; G : gel ophtalmique ; M : miroir ; MR : miroir de référence ; LC : lame de compensation ; FD : filtre de densité ; P : pupille ; L : lentille.

La figure est modifiée de : (Akiba *et al.*, 2007).



**Figure 2.13** Observation d'un segment antérieur humain en TCO

Cornée humaine avec port d'un verre de contact en TCO commercial.

La figure est tirée de : (Konstantopoulos *et al.*, 2007).

Le dessin en figure 2.14 représente le principe de la résolution axiale en TCO et l'expression de la résolution axiale est :

$$\delta z = \frac{l_c}{2.n}, \quad \text{éq. 1}$$

où  $l_c$  est la longueur de cohérence dans l'air et  $n$ , l'indice de réfraction dans l'échantillon.

La longueur de cohérence est liée aux temps de cohérence  $\tau_c$  des trains d'impulsion avec  $l_c = c. \tau_c$  et  $\tau_c$  est donné par

$$\tau_c = \frac{A}{\Delta\nu}. \quad \text{éq. 2}$$

Ainsi

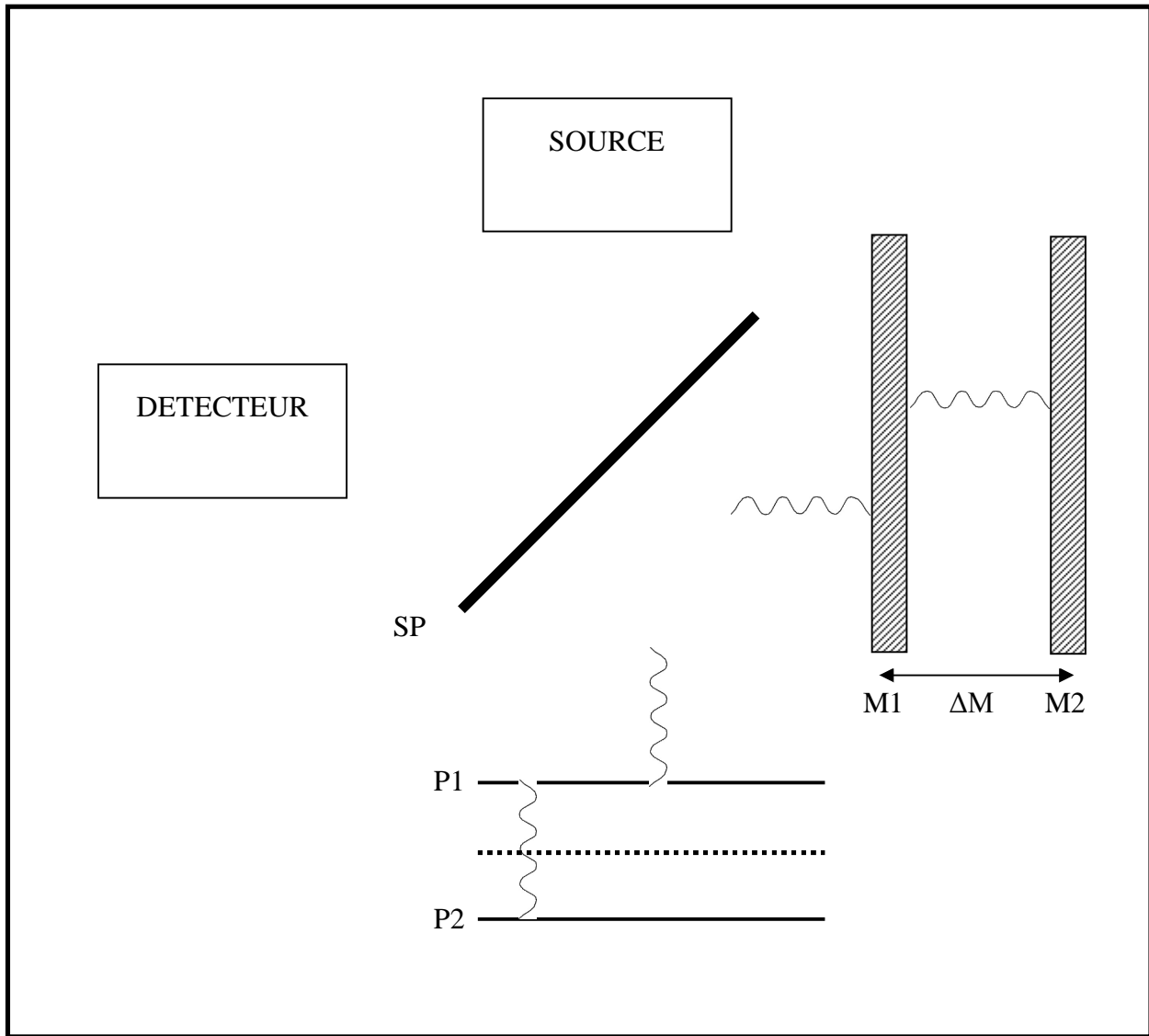
$$l_c = \frac{A.\lambda_0^2}{\Delta\lambda}, \quad \text{éq. 3}$$

où  $A$  vaut  $2\ln 2/\pi$  pour un faisceau gaussien,

$\Delta\nu$  et  $\Delta\lambda$  respectivement les largeurs spectrales en fréquence ou en longueur d'onde,

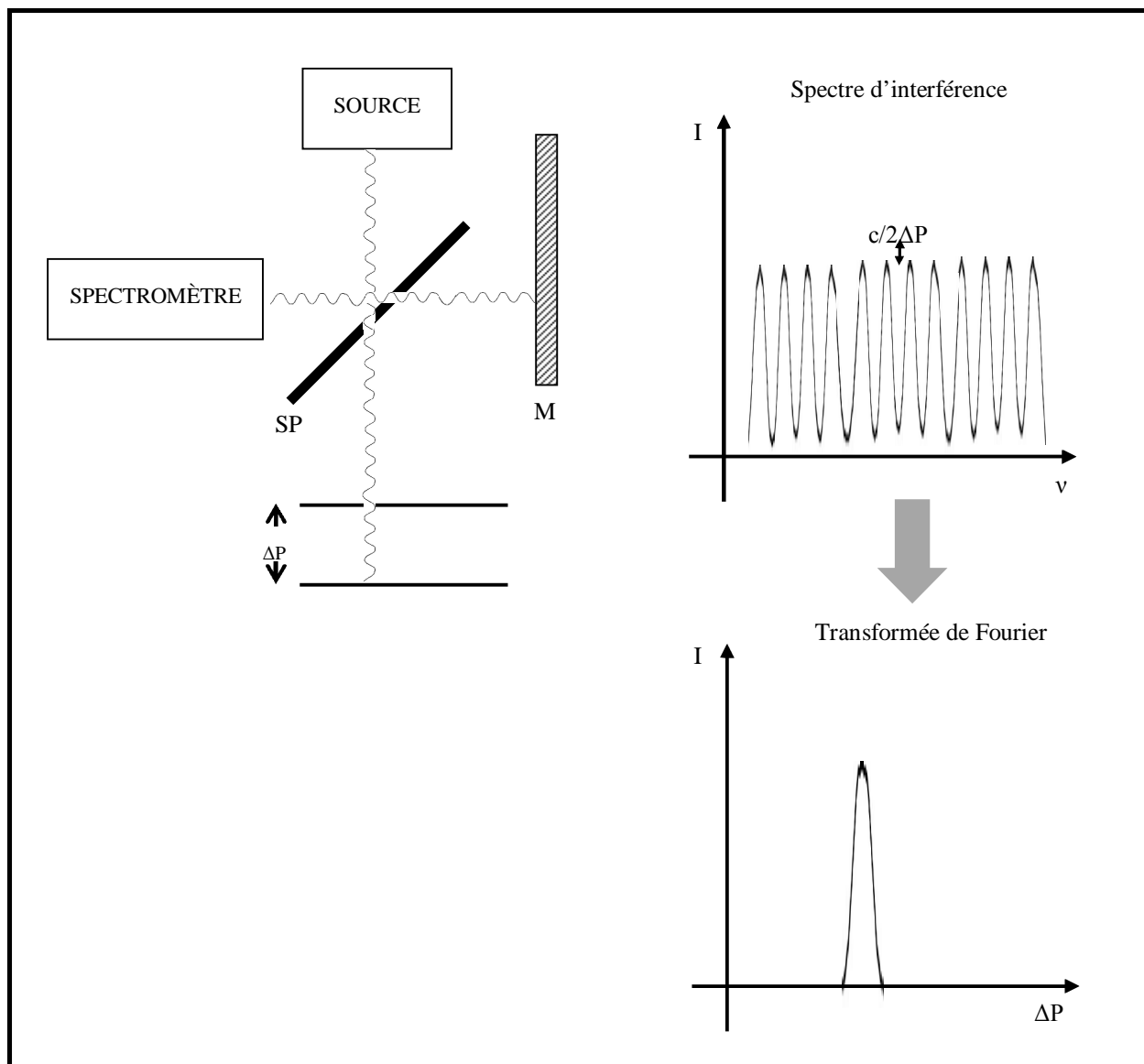
$\lambda_0$  la longueur d'onde centrale de la source.

Ainsi pour obtenir une haute résolution axiale, il y a intérêt à travailler avec une source large bande d'où le fait de parler de TCO à faible cohérence (Fujimoto *et al.*, 2009).



**Figure 2.14** Résolution axiale en TCO

Le principe est ici illustré dans le domaine temporel mais reste valable dans le domaine de Fourier. SP : séparatrice ; P1 et P2 : la position des deux interfaces à résoudre axialement dans l'échantillon ; M1 et M2 : les deux positions du miroir de référence pour les deux interfaces correspondantes. Les sinusoïdes représentent des trains d'impulsions de la source, sur lesquels la cohérence temporelle est maintenue. Ils représentent donc ici la longueur de cohérence. La ligne en pointillé donne la position au milieu des deux interfaces. Ainsi en déplaçant le miroir de référence de M1 à M2 il y aura un moment où celui-ci passera, au niveau de l'échantillon sous la position milieu et donc privilégiera l'interférence avec I2 plutôt qu'avec I1.



**Figure 2.15 TCO dans le domaine de Fourier**

Dans ce cas, le miroir de référence M reste à une position fixe. Les différentes réflexions se produisant dans l'échantillon interfèrent avec la réflexion sur le miroir M et ces interférences sont analysées spectralement. La transformée de Fourier de ce spectre permet d'obtenir la position des réflexions.

SP : séparatrice ; M : miroir de référence ;  $\Delta P$  : différence de longueur entre M et les réflexions de l'échantillon ;

I : intensité ;  $\nu$  fréquence lumineuse de la source ; c : célérité de la lumière dans le vide.

Comme la longueur de cohérence ( $l_c$ ) définit la résolution axiale, il est donc possible de la conserver avec une très grande focale de l'objectif de microscope : on a ainsi une grande profondeur de champ<sup>6</sup> avec une haute résolution axiale alors que dans le cas de la microscopie optique, les deux sont liées par l'ouverture numérique (Fujimoto *et al.*, 2009) : dans ce cas, il faut bien souvent faire un empilement d'images mises au point successivement (focalisation dynamique voir fig. 2.12) (Wikipedia, 2012e) et nous avons vu que par exemple le microscope confocal y aidait grandement. C'est pour cette raison que la TCO a surtout eu du succès dans l'imagerie de la rétine, malgré l'ouverture numérique très faible de l'œil. Comme nous le verrons dans les chapitres sur la théorie des harmoniques, à propos de la résolution axiale, la microscopie de génération d'harmoniques fait aussi intervenir un compromis entre longueur de cohérence et longueur confocale impliquée par l'objectif, mais dans ce cas d'imagerie non linéaire, c'est quand même plus souvent l'ouverture numérique qui est décisive.

Un TCO commercial, , comme celui que nous avons utilisé dans nos résultats (OCP930SR, Thorlabs, NJ, opérant dans le domaine de Fourier, centré à 930 nm avec une bande spectrale de 100 nm) est assez typique de ce qui peut être trouvé sur le marché. Cet appareil a une résolution dans l'air transversale de 15  $\mu\text{m}$  et axiale de 6.2  $\mu\text{m}$ . Des efforts ont été menés pour que l'avantage gagné en résolution latérale handicape moins la résolution axiale, cette dernière caractéristique restant quand même le principal attrait de la TCO. Maintenant les TCO à très haute résolution spatiale permettent d'atteindre environ 2  $\mu\text{m}$  dans les deux directions (Akiba *et al.*, 2007, Drexler, 2004, Qi *et al.*, 2004). Cette question de la résolution latérale reste quand même un problème par rapport à ce qu'offre le microscope confocal ou comme nous le verrons par la suite, la microscopie non linéaire.

La TCO a une bonne sensibilité (Swanson *et al.*, 1996) par sa capacité à détecter de faibles réflexion sur les interfaces biologiques associées aux différences d'indice de réfraction. Elle tire cette caractéristique de son principe interférométrique par la recombinaison avec le signal de référence qui ainsi « amplifie » celui provenant de l'échantillon. Cependant, la TCO souffre des mêmes problèmes de contraste que le microscope confocal dans la mesure où elle ne s'appuie

6 : La dimension axiale de la fonction d'étalement du point (FEP) définit la résolution axiale. Cette longueur est, entre autres, déterminée par la mise en forme du faisceau (longueur confocale pour un faisceau gaussien sans aberrations). En revanche la profondeur de champ (ou profondeur de foyer dans l'espace image) est un concept plus large faisant intervenir les mêmes paramètres que la longueur axiale de la FEP, mais également le détecteur par la tolérance de dimensions du point image qui est permise à cette position : la question se pose davantage pour une image plein champ puisque dans ce cas la détection numérique imposera une taille de pixels. Avec un détecteur non matriciel, la profondeur de champ est alors équivalente à la longueur axiale.

que sur un seul signal (une seule coloration) et reste cantonnée aux seuls contrastes linéaires : absorption ou sauts de phase forts comme avec les cellules. D'ailleurs, dans la cornée, l'information qu'apporte la TCO reste très proche de celle que peut fournir le microscope confocal malgré le fait que la TCO fonctionne sur un contraste de phase (Hormière, 2010).

Par ailleurs, le microscope confocal est également sensible, et c'est d'ailleurs la seule information dont il peut rendre compte, aux réflexions cornéennes. Toutes les deux méthodes ne peuvent pas révéler le réseau de collagène stromal (ni en transversal ni *en face*) (Vohnsen *et al.*, 2008). Aussi, les kératocytes, en situation sanitaire normale donc non activés, ne sont pas toujours facilement observables mis à part leur noyau (Cavanagh *et al.*, 2006, Cavanagh *et al.*, 2005b), leur cytoplasme ayant un indice de réfraction très proche de leur environnement pour ne pas porter atteinte à la transparence cornéenne (Doutch *et al.*, 2008).

### **2.2.3 Conclusion imageries de la cornée**

Nous reviendrons à l'occasion des chapitres de résultat sur l'application de la TCO dans le tissu cornéen, car certains de ses résultats applicatifs seront intéressants à comparer avec les nôtres en microscopie non linéaire d'harmoniques. Cependant, nous avons vu que toutes ces méthodes d'observations cliniques de la cornée, qu'elles soient basées sur un jeu de contraste d'opacité ou uniquement de phase, avaient des limitations pour l'observation de ce tissu transparent qu'est la cornée et les informations de chacune sont souvent redondantes. Il y a un besoin d'une imagerie optique qui puisse exploiter d'autres contrastes endogènes permettant une caractérisation et une biométrie sans toxicité ou dommages du tissu, tout en maintenant une très haute résolution spatiale (micrométrique voire sous micrométrique en latéral) dans toutes les couches cornéennes. Comme nous le verrons par la suite le fait d'être relativement libre sur la longueur d'excitation est un atout majeur de l'imagerie par GH, en plus de permettre une réduction de la diffusion atténuant le signal en profondeur.

Par exemple, nous avons vu les limitations des méthodes cliniques actuelles à décrire le stroma où d'importants enjeux médicaux ont lieu comme ceux impliqués par la chirurgie réfractive. Il est d'ailleurs intéressant comme nous le verrons dans le chapitre suivant, que de nombreuses études y compris *in vivo* portent désormais sur les observations en microscopie GSH du stroma et semblent prendre le relais dans ce champ de l'imagerie cornéenne. Cette tendance va

naturellement de pair avec la technologie femto-LASIK. Par ailleurs toutes les couches cornéennes ne parviennent pas à être facilement identifiées dû à de trop infimes différences d'indice de réfraction de part et d'autres des dioptries (Cavanagh *et al.*, 2006). Ceci est critique sur les couches postérieures de la cornée, et il est important que l'instrument puisse offrir des images d'une même qualité autant en observation *en face* que transversale. Ce qui, encore une fois, implique d'avoir une haute résolution spatiale dans les trois dimensions et un jeu de contraste différent pour chaque couche.

Certaines pathologies comme la dystrophie de Fuch's pourraient bénéficier de cette avancée et permettre peut-être un diagnostic plus précoce, ou du moins mieux cerné dans le temps, de ces dysfonctionnements y compris dans les autres régions de la cornée que les couches postérieures (ex. kératocone, fibrosis). Là encore, nous verrons que la GSH a déjà apporté des éléments de réponse sur ce sujet.

Par rapport à la microscopie de GTH, nous verrons dans le chapitre consacré, que cette méthode a déjà fait ses preuves en imagerie cellulaire mais que le principe sous-tendant le phénomène permet *a priori* une production de signal pour de nombreux objets y compris pour ceux qui peuvent déjà être observés en microscopie linéaire (confocal ou TCO). L'IGTH semble ainsi toute indiquée, en complément de l'IGSH, pour une application en ophtalmologie cornéenne.



### 3 THÉORIE ET ETAT DE L'ART EN MICROSCOPIE GSH

Dans ce chapitre nous introduisons la GSH de façon simple, i.e. dans les cas extrêmes où l'onde excitatrice est plane ou fortement focalisée. Ces exemples permettent d'introduire les concepts importants comme l'accord de phase. Nous verrons à travers cette approche qualitative ce qui fait la particularité de la GSH en microscopie et dans les milieux biologiques hautement hétérogènes où généralement aucune anisotropie ne permet, comme en technologie laser, de compenser la dispersion à l'origine du désaccord de phase. Enfin nous décrirons l'état de l'art de la microscopie biologique par GSH et en particulier celle de la cornée. Le chapitre suivant, consacré à la GTH, sera l'occasion de développer plus rigoureusement un modèle théorique qui nous a permis d'évaluer, entre autres, la résolution spatiale axiale pour ce phénomène.

#### 3.1 Phénomènes d'optique non linéaire du second ordre

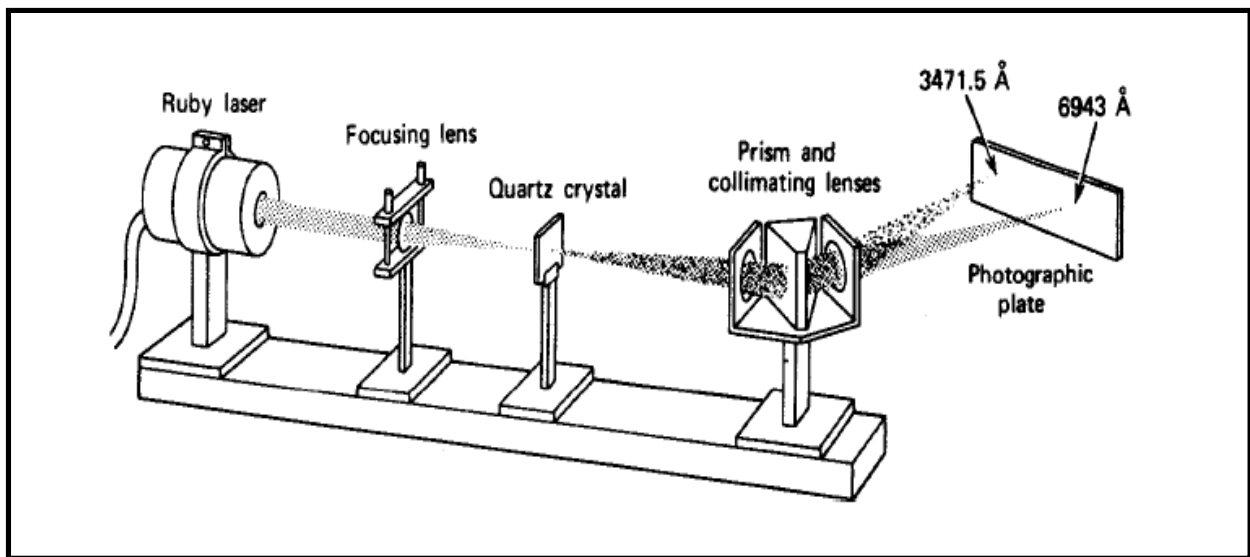


Figure 3.1 Montage de la première expérience de génération de seconde harmonique

La figure est tirée de : (Franken *et al.*, 1961).

De par sa capacité à atteindre des valeurs d'irradiance<sup>7</sup> élevées ( $\text{W.m}^{-2}$ ), le laser a rapidement débouché sur la recherche en optique non linéaire. En particulier le premier doublage de fréquence, ou génération de seconde harmonique, a été réalisé sur du quartz cristallin en 1961 (fig. 3.1) soit seulement un an après la construction du premier laser. Cette expérience avait été réalisée avec un laser rubis continu et même si ce régime permet déjà d'accéder aux phénomènes d'optique non linéaire, les lasers impulsions développés par la suite dans les années 70 (Masters *et al.*, 2008), et en particulier les lasers femtoseconde (Brun *et al.*, 1996) ont facilité grandement leur observation. Les lasers femtoseconde, produisent des puissances crêtes et donc des irradiances instantanées très élevées impliquant facilement des champs électriques du même ordre de grandeur que le champ de Coulomb liant les électrons de valence à leur noyau (Boyd, 2008, F. Sanchez, 1999).

Dans cette situation où le champ électrique est élevé, le potentiel liant les électrons à leur noyau est décrit plus justement par un potentiel anharmonique et le moment dipolaire induit, n'oscille plus à la seule fréquence du champ électrique exciteur. Si différents champs électriques excitateurs<sup>8</sup>  $\mathbf{E}_i$  ont pour fréquence  $\omega_i$ , le champ électrique total exciteur est :

$$\mathbf{E} = \sum_i \mathbf{E}_i . \quad \text{éq. 4}$$

Dans le formalisme semi-classique, le moment dipolaire total peut alors s'écrire comme un développement en série du champ  $\mathbf{E}$  :

$$\boldsymbol{\mu} = \boldsymbol{\mu}_0 + \boldsymbol{\alpha} : \mathbf{E} + \frac{1}{2} \boldsymbol{\beta} : \mathbf{E}\mathbf{E} + \frac{1}{6} \boldsymbol{\gamma} : \mathbf{E}\mathbf{E}\mathbf{E} + \dots \quad \text{éq. 5}$$

où  $\boldsymbol{\mu}_0$  est le moment dipolaire permanent potentiel de la molécule en l'absence de  $\mathbf{E}$ ,

$\boldsymbol{\alpha}$  est la polarisabilité linéaire,

$\boldsymbol{\beta}$ ,  $\boldsymbol{\gamma} \dots$  sont les hyperpolarisabilités respectivement du premier (ou quadratique) et du second ordre (ou cubique).

7 : Les autres grandeurs qui ont la même dimension que l'irradiance sont la densité de puissance ou l'éclairement. La densité d'énergie ( $\text{J.m}^{-2}$ ) que nous avons déjà eu l'occasion de voir avec le LASIK (chap. 1.1.4) est justement plus pertinente sur les questions d'ablations. L'irradiance sera tout de même considérée dans le chap. 5.2.2 à propos des possibilités de dommages cellulaires en imagerie d'harmoniques.

8 : les vecteurs et les tenseurs anisotropes sont notés en gras.

Au niveau macroscopique, pour une population moléculaire, on exprime de la même façon la polarisation diélectrique suivant l'équation :

$$\mathbf{P} = \mathbf{P}_0 + \varepsilon_0(\chi^{(1)} : \mathbf{E} + \chi^{(2)} : \mathbf{E}\mathbf{E} + \chi^{(3)} : \mathbf{E}\mathbf{E}\mathbf{E} + \dots), \quad \text{éq. 6}$$

où  $\mathbf{P}_0$  est la polarisation permanente potentielle en l'absence de  $\mathbf{E}$ ,

$\chi^{(1)}$  est la susceptibilité linéaire (absorption et dispersion),

$\chi^{(2)}, \chi^{(3)} \dots$  sont les susceptibilités non linéaires respectivement du second et du troisième ordre.

Le lien entre le moléculaire et le macroscopique est donné par la formule ci-dessous :

$$\chi^{(2)} = N_v \langle \boldsymbol{\beta} \rangle . \quad \text{éq. 7}$$

Elle exprime, ici pour le second ordre, le fait que la susceptibilité non linéaire d'ordre deux est la moyenne en orientation de l'hyperpolarisabilité d'ordre un des molécules et que ceci est à pondérer par la densité locale de molécules considérées  $N_v$ .

Dans l'équation 6, chaque polarisation non linéaire inclut tous les phénomènes pouvant survenir à cet ordre par les différentes combinaisons des différents champs excitateurs impliqués. Ainsi pour le deuxième ordre, où ces phénomènes restent relativement limités en nombre comparativement à ceux du troisième ordre, le tenseur de susceptibilité d'ordre deux s'écrit :  $\chi^{(2)}(\omega_3 ; \omega_1, \omega_2)$  où  $\omega_3$  est la nouvelle fréquence associée au phénomène et  $\omega_1$  et  $\omega_2$  les fréquences des deux champs excitateurs impliqués.

Sur l'exemple en particulier de la GSH, considérons  $E_1$  et  $E_2$ , deux champs électriques excitateur de fréquence  $\omega_1$  et  $\omega_2$ .

Dans ce cas, le champ électrique total s'écrit :

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}_1 e^{-i\omega_1 t} + \mathbf{E}_2 e^{-i\omega_2 t} + \text{c.c.} , \quad \text{éq. 8}$$

où c.c sont les complexes conjugués pour  $E_1$  et  $E_2$

En ne développant que la polarisation non linéaire d'ordre deux, il vient :

$$\mathbf{P}^2 = \varepsilon_0 \chi^{(2)} : \mathbf{E}_1 \mathbf{E}_2 . \quad \text{éq. 9}$$

En admettant que  $\mathbf{E}_1$  et  $\mathbf{E}_2$  aient la même composante vectorielle unique pour faire le calcul avec  $\chi^{(2)}$  scalaire, et que ce dernier soit approximé constant en fonction de la fréquence (loin de la résonnance),  $P^2(t)$  s'exprime suivant l'équation 8 :

$$P^2(t) = \varepsilon_0 \chi^{(2)} \cdot \left[ 2E_1 E_2 e^{-i(\omega_1 + \omega_2)t} + 2E_1 E_2^* e^{-i(\omega_1 + \omega_2)t} + E_1^2 e^{-2i\omega_1 t} + E_2^2 e^{-2i\omega_2 t} + \text{c.c.} \right] \quad \text{éq. 10}$$

$$+ 2\varepsilon_0 \chi^{(2)} \left[ E_1 E_1^* + E_2 E_2^* \right]$$

Quatre phénomènes sont donc associés à la non linéarité du deuxième ordre et la figure 3.2 les présente schématiquement avec, le cas échéant, le diagramme d'énergie.

Voyons succinctement chacun de ces phénomènes et pour certains leur application. La génération de fréquence somme (GFS) correspond à la destruction sans absorption des deux photons de fréquence  $\omega_1$  et  $\omega_2$  et à l'émission d'un photon à  $\omega_3 = \omega_1 + \omega_2$ . Dans cette situation, il n'y a pas de résonnance avec les énergies quantifiées de l'atome ou de la molécule. Cependant, elle est exaltée près de la résonnance (Campagnola *et al.*, 2001) qui correspond aux fréquences d'excitation de fluorescence non linéaire (ceci vaut pour tous les phénomènes non linéaire à interaction élastique (F. Sanchez, 1999)). Cependant en se plaçant dans cette situation de résonnance, il y a le même risque le photoblanchiment du dipôle qu'en fluorescence non linéaire (Campagnola, 2008, Zoumi *et al.*, 2002).

La génération de seconde harmonique<sup>9</sup> que nous exploitons dans notre projet d'imagerie est donc le cas particulier de la GFS avec  $\omega_1 = \omega_2 = \omega$ .

L'amplification paramétrique optique (APO) ou Génération de différence de fréquence est pratiquement le phénomène inverse de la GFS avec  $\omega_3 = \omega_1 - \omega_2$  en détruisant  $\omega_1$  et en émettant  $\omega_2$  (ce dernier champ est amplifié -au détriment de  $\omega_1$ - d'où le terme « amplification »). Le champ à la fréquence  $\omega_2$  peut être complètement inexistant initialement et l'émission  $\omega_2$  est dans ce cas spontanée. Les champs émis sont cependant faibles dans une telle situation (Boyd, 2008). Dans ce cas  $E_2$  ou  $E_3$  ne sont pas discernables mais le champ exploité est appelé signal et l'autre idler. Enfin le terme paramétrique est un synonyme d'élastique pour désigner les interactions lumière/matière.

L'APO est importante (plus que la GFS) pour réaliser des lasers accordables : oscillateur paramétrique optique (OPO) et amplificateur paramétrique optique (APO).

9 : l'absorption deux photons ne correspond pas à la mise en résonnance de la GSH mais est un phénomène du troisième ordre (voir chap. 4.1).

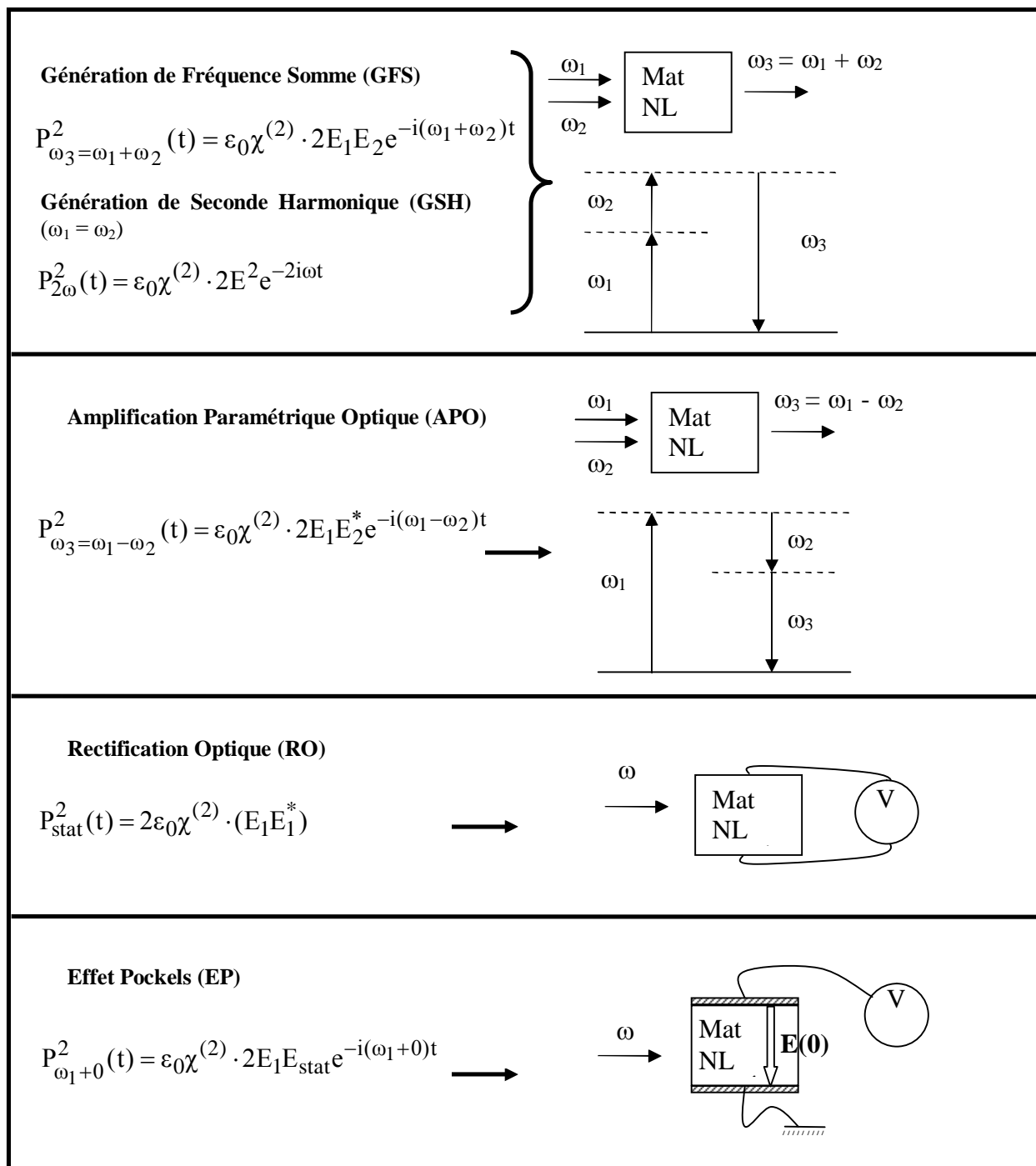


Figure 3.2 Panorama des phénomènes d'optique nonlinéaire du second ordre

Expression de la polarisation d'ordre 2 en fonction des champs électriques appliqués pour les différents phénomènes du second ordre dans un matériau non linéaire (Mat NL) non centrosymétrique. Les diagrammes de Jablonsky sont représentés dans les cas pertinents (GFS, APO).

La rectification optique est un cas particulier de l'APO où  $\omega_1 = \omega_2 = \omega$ . Ce phénomène correspond à la génération d'une tension électrique aux bornes du matériau non linéaire impliqué sous l'action du champ électrique  $\omega$ .

Un dernier phénomène important reste l'effet Pockels. L'effet Pockels peut être approché par le tenseur électro-optique linéaire : un champ électrique statique est susceptible de changer

l'ellipsoïde des indices. Cependant, il peut également s'interpréter par le biais de l'optique non linéaire par GFS avec un champ  $E_1$  oscillant à  $\omega$  et un champ  $E_2$  statique. Cette double interprétation linéaire (avec  $\chi^{(1)}$ ) et non linéaire (avec  $\chi^{(2)}$ ) montre que  $\chi^{(2)}$  est déductible de  $\chi^{(1)}$  (Boyd, 2008).

En toute généralité,  $\chi^{(2)}$  est fonction de la pulsation et chacun de ces phénomènes a un  $\chi^{(2)}$  propre et par ailleurs, chacun de ces tenseurs  $\chi^{(2)}$  est de rang 3 dans un milieu non linéaire anisotrope. Ainsi, sans considération de symétrie sur le matériau, il existe 27 éléments correspondant aux différentes combinaisons des composantes spatiales des deux champs électriques excitateurs impliqués ( $E_1 E_2$ ).

Par exemple, en coordonnées cartésiennes, la polarisation non linéaire d'ordre 2 suivant l'axe x se développe suivant dans le cas général :

$$P_x^2 = \epsilon_0(\chi_{xxx}^{(2)} E_{1x} E_{2x} + \chi_{xyy}^{(2)} E_{1y} E_{2y} + \chi_{xzz}^{(2)} E_{1z} E_{2z} + \chi_{xxy}^{(2)} E_{1x} E_{2y} + \chi_{xyx}^{(2)} E_{1y} E_{2x} + \chi_{xxz}^{(2)} E_{1x} E_{2z} + \chi_{xzx}^{(2)} E_{1z} E_{2x} + \chi_{xyz}^{(2)} E_{1y} E_{2z} + \chi_{xzy}^{(2)} E_{1z} E_{2y}) \quad \text{.} \quad \text{éq. 11}$$

Ce nombre d'éléments de  $\chi^{(2)}$  peut déjà être réduit à 18 par les relations de Kleiman loin de la résonance. Par ailleurs, des conditions de symétries du matériau sondé, peuvent aussi éliminer des éléments du tenseur. Au sein de celles-ci, la présence de centrosymétrie, comme peut en offrir par exemple certains systèmes cristallins (ex. cubique  $m\bar{3}m$ ) est particulièrement importante puisqu'elle implique que le matériau ait un  $\chi^{(2)}$  nul en « bulk » et d'une manière générale induit l'annulation de toute susceptibilité non linéaire d'ordre pair.

En effet si le milieu est centrosymétrique structurellement (comme peut l'être le quartz amorphe ou suivant l'axe optique d'un cristal uniaxe) alors il est invariant dans un système sphérique entre  $r$  et  $-r$  et  $P(r) = -P(-r)$ . Il vient d'après l'équation 6 :

$$P(\mathbf{r}) = \epsilon_0 (\chi^{(1)} : E(\mathbf{r}) + \chi^{(2)} : E(\mathbf{r})E(\mathbf{r}) + \chi^{(3)} : E(\mathbf{r})E(\mathbf{r})E(\mathbf{r}) + \dots) ,$$

et

$$-P(-\mathbf{r}) = \epsilon_0 (\chi^{(1)} : E(\mathbf{r}) - \chi^{(2)} : E(\mathbf{r})E(\mathbf{r}) + \chi^{(3)} : E(\mathbf{r})E(\mathbf{r})E(\mathbf{r}) + \dots) .$$

$P(\mathbf{r}) = -P(-\mathbf{r})$  implique  $\chi^{(2)}$  nul.

Si un matériau ne présente pas naturellement de non centrosymétrie, celle-ci peut être induite par l'application d'un champ électrique statique. Mais au sein d'un matériau non centrosymétrique ou entre deux matériaux centrosymétriques, les interfaces ou surfaces permettent de retrouver à nouveau localement un  $\chi^{(2)}$  non nul, appelé hyperpolarisabilité d'ordre deux de surface (Revillod, 2006, Shen, 1989, Wikipedia, 2011b). Dans les faits, ce phénomène est tempéré car l'émission de surface dépend d'autres facteurs dont la composition des molécules qui la constitue ou sa rugosité (An, 2003), rugosité qui justement induit localement des variations de symétrie et à plus grande échelle des variations d'angle d'incidence pour la fondamentale.

Indépendamment de cette différence de susceptibilité non linéaire en surface ou en « bulk », celle-ci en microscopie d'harmonique, n'a de toute façon de sens que relativement aux échelles du foyer, i.e. la zone limitée en référence à la fondamentale (col latéral et col axial voir les chap. 3.3.2 1) et 3.3.2 2)).

Mis à part cette question d'inhomogénéité potentielle de la susceptibilité non linéaire, il faut aussi prendre en compte, pour la GSH la question de la centrosymétrie qui se pose autant à l'échelle moléculaire que macroscopique (Stoller *et al.*, 2002a) :

- à l'échelle moléculaire (i.e. par rapport à  $\beta$ ) il faut soit une configuration donneur-accepteur soit une caractéristique chirale ;
- à l'échelle macroscopique (i.e. déjà pour la population de molécules contenues dans le foyer) il faut une organisation moléculaire non centrosymétrique.

Abordons justement dans les chapitres suivant ces deux échelles et pourquoi seul le fait de remplir les conditions de symétrie dans les deux cas permet la GSH.

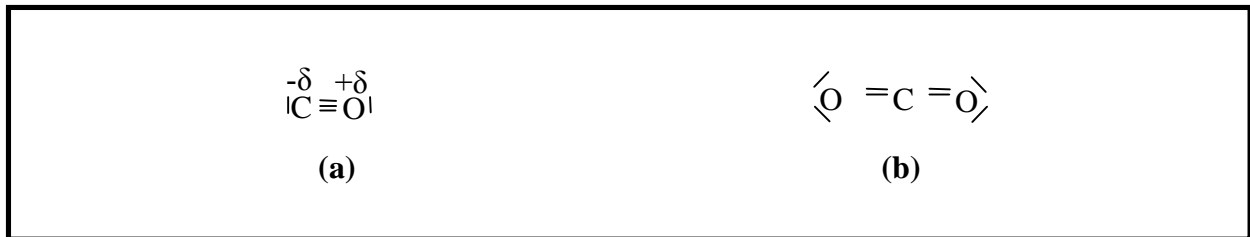
### 3.2 Diffusion hyper-Rayleigh et opposition avec la GSH

Voyons comment une molécule est susceptible de réaliser le doublement de fréquence de la fondamentale. Ensuite nous expliquerons la diffusion Hyper-Rayleigh (DHR) puis la GSH qui sont au niveau macroscopique respectivement un processus incohérent ou cohérent de cette interaction lumière/matière.

Le moment dipolaire d'une molécule est défini par  $\boldsymbol{\mu} = q\mathbf{r}$ .

où  $q$  (charge partielle) est la charge, positive ou négative, créée par l'éloignement des noyaux atomiques de leur nuage électronique et  $\mathbf{r}$  est le vecteur distance séparant le barycentre de ces charges.  $\mathbf{r}$  qui peut aussi se développer en puissance est donc porteur du caractère non linéaire de l'interaction lumière/matière (Boyd, 2008).

Dans une situation où les barycentres des charges positives et négatives partielles sont non confondus, il existe un moment dipolaire permanent. Par exemple, la molécule de monoxyde de carbone a un moment dipolaire permanent de par sa non centrosymétrie contrairement au dioxyde de carbone (Bouvier, 1999) (fig. 3.3)

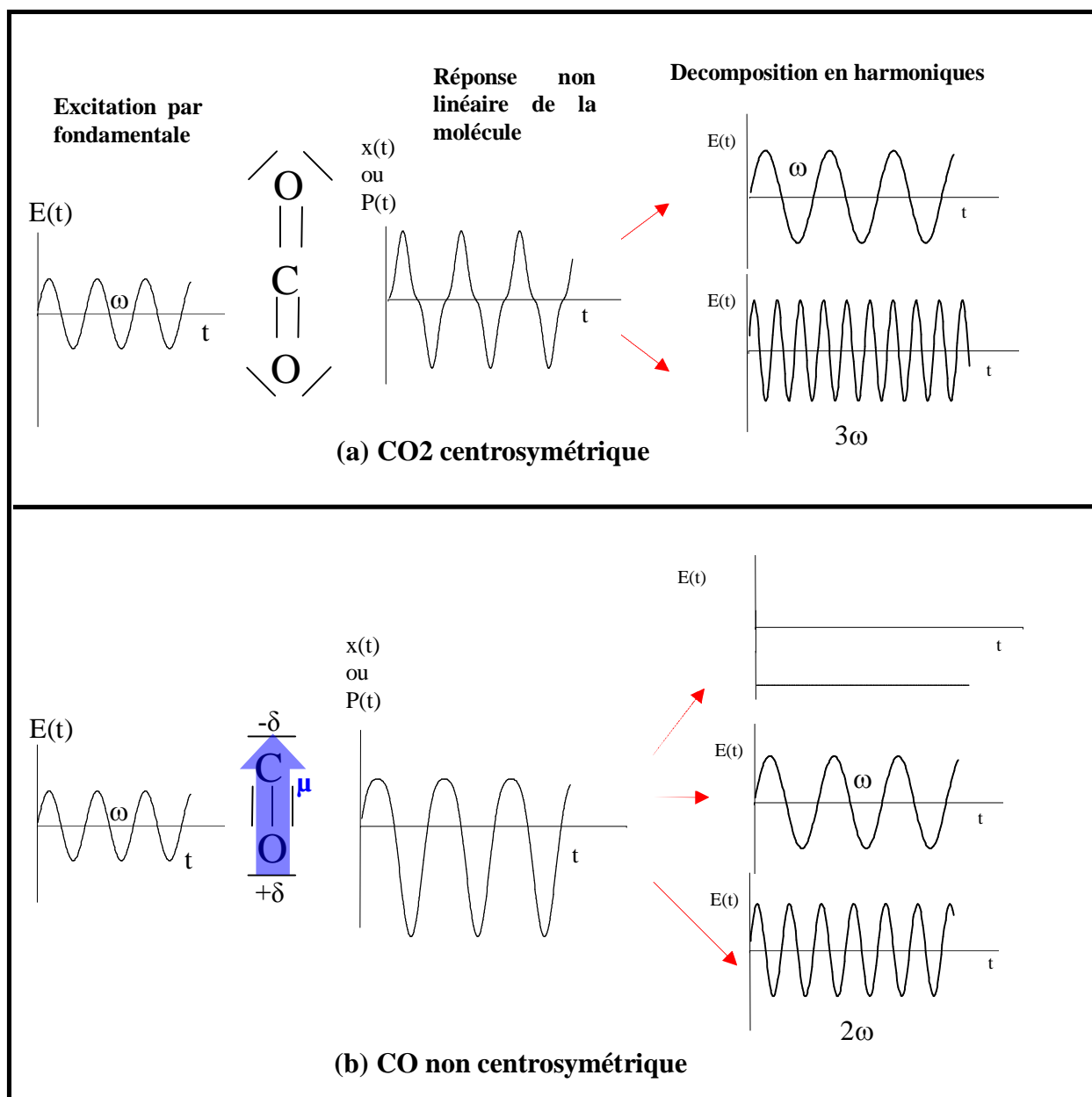


**Figure 3.3** Centrosymétrie moléculaire

(a) Le monoxyde de carbone possède une non-centrosymétrie des charges lui permettant de posséder un moment dipolaire permanent. (b) Au contraire le dioxyde de carbone est centrosymétrique.

Cette caractéristique de symétrie, empêche  $\text{CO}_2$  d'être associée aux phénomènes non linéaires d'ordre deux (dont la GSH).  $\text{CO}$ , en revanche, par son moment dipolaire permanent peut générer un doublement de fréquence. La figure 3.4 illustre cette différence entre ces deux molécules et permet de comprendre leur particularité en optique non linéaire.





**Figure 3.4 Asymétrie moléculaire et possibilité de doublement de fréquence**

(a) CO<sub>2</sub> est excité par un champ électrique  $E$  de fréquence  $\omega$ . La molécule donne une réponse non linéaire  $x(t)$  (mouvement des électrons relativement au noyau) ou de façon équivalente la polarisation instantanée  $P(t)$ . Cependant, par centrosymétrie de la molécule, les champs électriques émis par CO<sub>2</sub> ne sont que des harmoniques impaires. (b) CO réagit avec un mouvement électronique dissymétrique pour les deux amplitudes positives et négatives du champ exciteur. Le mouvement ( $x(t)$ ) illustre aussi la présence d'un moment dipolaire permanent (offset). Dans ce cas, la polarisation implique un spectre radiatif composé d'un champ statique et pour ce qui nous intéresse d'un champ à fréquence double.

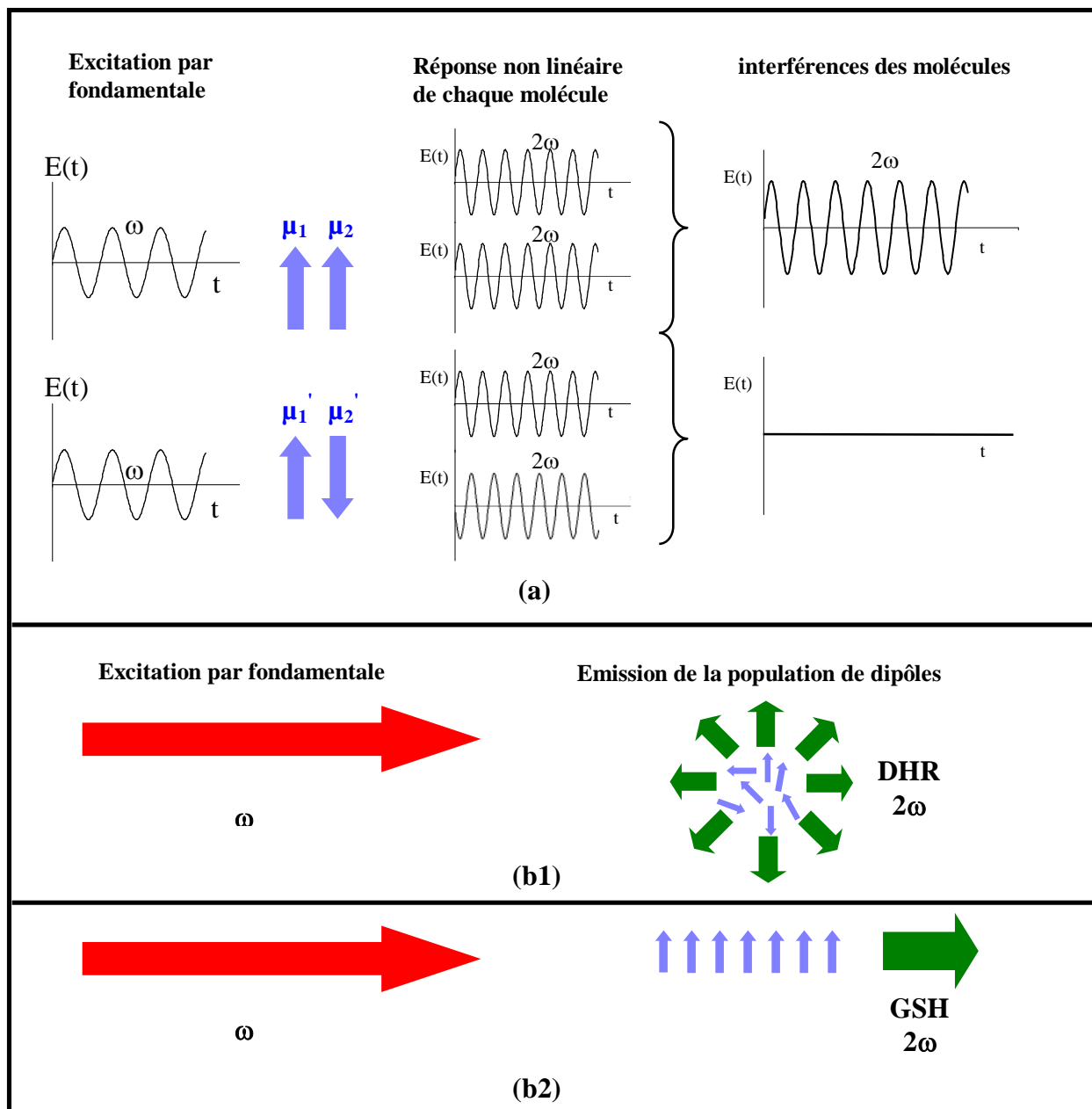


Figure 3.5 Implication de l'organisation moléculaire sur la GSH

En supposant dans tous les cas que le champ  $E_\omega$  soit polarisé linéairement verticalement dans la figure (rendement maximal). (a) seuls deux dipôles électriques colinéaires et orientés dans le même sens construisent par interférence la GSH. (b1) les dipôles orientés de façon arbitraire génèrent un signal doublé en fréquence mais sans relation de phase entre eux, il n'y a pas de cohérence spatiale : l'émission est isotrope comme en fluorescence. Il y a DHR à fréquence double. (b2) dans une situation d'alignement moléculaire le jeu d'interférence induit une direction d'émission privilégiée caractéristique des générations d'harmoniques.

Lorsqu'une molécule n'a pas de moment dipolaire permanent pour permettre la GSH, il est possible de la modifier chimiquement pour l'induire : en accrochant aux extrémités de cette molécule deux groupes chimiques dont l'un est donneur (électronégatif) et l'autre attracteur (électropositif), il est possible de créer des molécules à fort moment dipolaire dont le rendement de conversion pour la GSH peut atteindre jusqu'à 50 % de la puissance de la fondamentale. Ces chromophores, ou plus exactement harmonophores, sont appelés « push-pull » (Campagnola *et al.*, 2001, LeCours *et al.*, 1996), le site électronégatif « poussant » des électrons que le site électropositif « tire ».

Pour faire la transition entre l'échelle moléculaire et celle macroscopique, considérons la figure 3.5. Dans cette figure toutes les molécules ont un moment dipolaire non nul permanent et sont donc prédisposées au doublement de fréquence. Un premier cas simple, consiste en une association de deux dipôles (fig. 3.5 (a)). Les deux dipôles  $\mu_1$  et  $\mu_2$  sont orientés dans le même sens et les deux champs doublés en fréquence qu'ils émettent interfèrent constructivement en champ lointain. En revanche, dans le cas  $\mu_1'$  et  $\mu_2'$ , les moments étant opposés, les deux ondes sont en opposition de phase et l'interférence est destructive : alors même que chacune des molécules réalise le doublement de fréquence la conjonction de leur émission a pour conséquence de ne produire aucun signal.

La GSH naît donc d'un jeu constructif d'interférences des harmonophores constituant le matériau sondé. La possibilité de GSH peut être interprétée de deux façons :

- chacune des molécules est susceptible de réaliser le doublement de fréquence mais si l'ensemble des molécules présente une centrosymétrie, alors leurs émissions se détruisent par interférences. Ces interférences sont bien sûr fonction de la distance laissée entre les molécules impliquées ;
- $\chi^{(2)}$  rend compte de la disposition des molécules et moyenne leur moment d'hyperpolarisabilité, elle-même liée à la présence d'un moment dipolaire. Ainsi, si le milieu est centrosymétrique,  $\chi^{(2)}$  est nul et la GSH n'a pas lieu. C'est la nécessité de la non centrosymétrie à l'échelle macroscopique.

Par cette double interprétation de l'annulation de la GSH, il apparaît que la condition de non centrosymétrie est plus précisément requise le long de la direction de la polarisation du champ électrique excitateur.

Les figures 3.5 (b1) et (b2) illustrent, sur une plus grande population, l'importance de la disposition des dipôles pour la construction de la GSH. Si dans le cas (b1), il est possible d'avoir un doublement de fréquence macroscopique par la DHR dans la mesure où la moyenne n'implique pas forcément une destruction mutuelle de chacune des contributions, l'émission globale n'est pas cohérente spatialement et il n'y a pas de diagramme de rayonnement dans une direction particulière. En revanche le cas (b2) où les molécules ont une organisation linéaire crée, au niveau macroscopique, une relation de phase qui amène une direction privilégiée de l'émission. C'est ce qui définit la GSH.

Il faut remarquer que la direction d'émission de la SH n'est pas obligatoirement vers l'avant comme représenté dans l'illustration, mais qu'au contraire le diagramme de rayonnement dépend de la mise en faisceau de l'excitation et de la structure de l'échantillon même. Ainsi une contribution vers l'arrière est possible même si elle n'est généralement pas favorisée.

Cette discussion amène à parler d'un concept crucial pour la compréhension de la génération d'harmonique : l'accord de phase. Alors que la conservation d'énergie, illustrée par les diagrammes de Jablonsky (Boyd, 2008), permet de savoir à quelle nouvelle fréquence le rayonnement va être émis, l'accord de phase ou conservation des moments cinétiques (des photons impliqués) donne la direction du faisceau et la rentabilité de la génération.

### 3.3 Équations de propagation de la SH et accord de phase

#### 3.3.1 Expression du champ électrique de SH par les équations de Maxwell

L'accord de phase garantit l'optimalité de la génération d'harmoniques en mettant spatialement et temporellement en phase dans le matériau non linéaire la fondamentale et l'harmonique se construisant. Il est tout aussi pertinent à l'échelle moléculaire (la conservation de la quantité de mouvement  $\hbar k$  conditionne le rayonnement non linéaire du dipôle) que pour une population d'harmonophores.

Pour comprendre l'origine de cette condition d'optimalité pour la génération d'harmoniques, il est nécessaire d'établir l'expression du champ électrique de seconde harmonique généré dans un matériau de  $\chi^{(2)}$  non nul.

Les équations de Maxwell sont :

$$\nabla \cdot \mathbf{D} = \rho , \quad \text{éq. 12}$$

$$\nabla \cdot \mathbf{B} = 0 , \quad \text{éq. 13}$$

$$\nabla \wedge \mathbf{E} = - \frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t} , \quad \text{éq. 14}$$

$$\nabla \wedge \mathbf{H} = - \frac{\partial \mathbf{D}}{\partial t} + \mathbf{J} , \quad \text{éq. 15}$$

où  $\mathbf{B}$  est le champ magnétique et  $\mathbf{H}$  l'induction magnétique,

$\mathbf{D}$  est le vecteur déplacement,

$\rho$  (densité de charges) et  $\mathbf{J}$  (densité de courant) : si le matériau est supposé non chargé et non traversé par un courant,  $\rho$  et  $\mathbf{J}$  sont nuls.

Par ailleurs le matériau est supposé non magnétique d'où :  $\mathbf{B} = \mu_0 \mathbf{H}$ .

$\mathbf{D}$  et  $\mathbf{E}$  sont liés par :  $\mathbf{D} = \epsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P}$ .

où  $\mu_0$  et  $\epsilon_0$  sont respectivement la perméabilité magnétique et la permittivité diélectrique dans le vide.

En appliquant un autre produit vectoriel sur l'équation 14, il vient en fonction de  $\mathbf{E}$  et  $\mathbf{P}$  et sachant que

$$\frac{1}{c^2} = \epsilon_0 \mu_0 , \quad \text{éq. 16}$$

$$\nabla \wedge \nabla \wedge \mathbf{E} + \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathbf{E} = \frac{-\partial^2 \mathbf{P}}{\epsilon_0 c^2 \partial t^2} . \quad \text{éq. 17}$$

Cette équation est la plus générale qui soit en optique linéaire ou non linéaire. Ainsi les ondes solutions de cette équation peuvent aussi bien être supposées planes que gaussiennes suivant l'hypothèse considérée. Dans cette équation le terme de droite est le terme source dû à la polarisation du matériau.

En décomposant  $\mathbf{P}$  :

$\mathbf{P} = \mathbf{P}^1 + \mathbf{P}^{\text{NL}}$  où  $\mathbf{P}^{\text{NL}}$  regroupe les seules polarisations non linéaires il vient :

$$-\nabla^2 \mathbf{E} + \frac{\varepsilon_r}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathbf{E} = \frac{-\partial^2 \mathbf{P}^{\text{NL}}}{\varepsilon_0 c^2 \partial t^2} , \quad \text{éq. 18}$$

où  $\varepsilon_r$  est la permittivité relative.

Dans cette équation,  $\mathbf{E}$  est le champ total sommant les différents champs électriques pouvant être générés dans le matériau. En supposant l'excitation monochromatique à  $\omega$ ,  $\mathbf{E}$  inclut donc tout aussi bien le champ électrique à la fréquence  $\omega$  (la fondamentale) que toutes les harmoniques de celle-ci pouvant être justement dues aux interactions non linéaire ( $\mathbf{E} = \mathbf{E}_\omega + \mathbf{E}_{2\omega} + \mathbf{E}_{3\omega} + \dots$ ). Par ailleurs comme nous l'avons vu au début du chapitre,  $\mathbf{P}$  est une combinaison de différentes puissances de la composante  $\mathbf{E}$  à la fréquence  $\omega$ . Or  $\mathbf{P}^1$  ayant cette composante à la puissance 1,  $\mathbf{P}^1$  peut être porté dans le membre de gauche de l'équation. Il en résulte que le membre de droite de l'équation ne comporte que les composantes non linéaires de la polarisation.

La solution générale de l'équation 18 est donnée par l'expression (J. X. Cheng *et al.*, 2002) :

$$\mathbf{E}_{n\omega}(\mathbf{R}) = \frac{-4\pi(n\omega)^2}{c^2} \iiint_V \left( \mathbf{I} + \frac{\nabla\nabla}{k_{n\omega}^2} \right) \mathbf{G}(\mathbf{R} - \mathbf{r}) \cdot \mathbf{P}_{n\omega}(\mathbf{r}) dV , \quad \text{éq. 19}$$

où  $n\omega$  est à  $2\omega$  ou  $3\omega$  suivant le phénomène,  $V$  est le volume de l'échantillon (fig. 3.6),  $\mathbf{I}$  est la matrice identité de dimension 3,  $\mathbf{G}(\mathbf{R} - \mathbf{r})$  est la fonction de Green qui vaut :

$$\mathbf{G}(\mathbf{R} - \mathbf{r}) = \frac{e^{(i\mathbf{k}_n|\mathbf{R}-\mathbf{r}|)}}{4\pi|\mathbf{R} - \mathbf{r}|} , \quad \text{éq. 20}$$

où  $\mathbf{R}$  est la position du point où est considéré le  $\mathbf{E}_{n\omega}$ , et  $\mathbf{r}$  est la position du point décrivant l'échantillon.

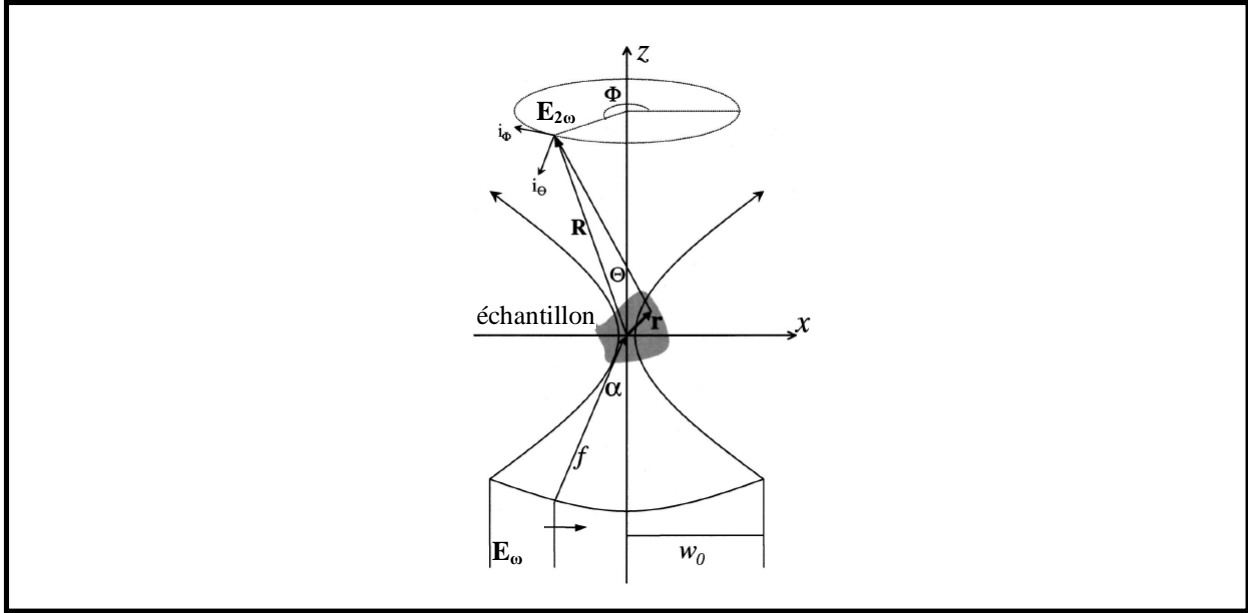


Figure 3.6 Notations pour la description de  $E_{2\omega}$

$E_{\omega}$ , d'un col  $w_0$  localisé sur la pupille arrière d'une optique de focale  $f$  et de demi-angle  $\alpha$ .  $E_{\omega}$  est focalisé suivant l'axe optique  $z$  sur un échantillon de volume  $V$  décrit par la position  $\mathbf{r}$ .  $E_{2\omega}$  est décrit à la position  $\mathbf{R}$ . Cette figure servira également de référence pour la description de la GSH du collagène (voir chap. 3.4.3).

Figure modifiée depuis la source : (J. X. Cheng *et al.*, 2002).

Cependant une telle équation ne peut pas se résoudre analytiquement et Cheng *et al.* (2002) ont par exemple réalisé des simulations numériques pour décrire l'émission de TH suivant différentes géométries d'échantillon. Dans ce chapitre, comme dans celui consacré à la TH, nous nous contenterons de résoudre l'équation 18 en faisant les hypothèses :

- la SH n'est due qu'à la susceptibilité d'ordre 2 : elle ne découle pas d'ordres supérieurs ;
- les calculs peuvent être faits en scalaire et il n'y a pas de double réfraction qu'il y aurait dans un milieu uniaxe. Nous ne prenons donc pas en compte l'anisotropie des deux tenseurs  $\chi^{(1)}$  et  $\chi^{(2)} \rightarrow \chi^{(1)}$  et  $\chi^{(2)}$  ;
- le faisceau du laser exciteur (fondamentale) est gaussien avant le condenseur et n'est pas diffracté par la pupille arrière de celui-ci ;

- d) la fondamentale est également décrite, après le condenseur, par une gaussienne (TEM<sub>00</sub>) à polarisation rectiligne<sup>10</sup> ;
- e) seule l'émission vers l'avant est considérée (nous ne nous intéressons donc pas à la GSH de surface). Cette émission est suffisamment proche de l'axe optique pour supposer que la SH soit considérée comme une onde plane ou gaussienne.

Les expressions sont alors :

- pour le champ électrique de la fondamentale :

$$E_1(x, y, z, t) = A_1(x, y, z) e^{i(k_1 z - \omega t)} , \quad \text{éq. 21}$$

- pour la polarisation non linéaire de la seconde harmonique :

$$P_2(x, y, z, t) = p_2(x, y, z) e^{i(2k_1 z - 2\omega t)} , \quad \text{éq. 22}$$

$$\text{où } p_2(x, y, z) = \epsilon_0 \chi^{(2)} A_1^2(x, y, z) ,$$

- pour le champ électrique de la seconde harmonique :

$$E_2(x, y, z, t) = A_2(x, y, z) e^{i(k_2 z - 2\omega t)} . \quad \text{éq. 23}$$

Dans ce cas l'équation 18 peut se réécrire sur les composantes spatiales avec le laplacien transversal  $\nabla_T$ . Par ailleurs comme les transferts d'énergie, suivant  $z$ , entre la fondamentale et la seconde harmonique sont relativement longs par rapport aux oscillations de longueur  $\lambda$  (approximation des enveloppes lentement variables), le terme  $\frac{d^2}{dz^2} E_2(z)$  peut être négligé

devant  $2ik_2 \frac{d}{dz} E_2(z)$ . Il vient ainsi :

$$2ik_2 \frac{\partial A_2(r, z)}{\partial z} + \nabla_T^2 A_2(r, z) = -\frac{(2\omega)^2}{c^2} \chi^{(2)} A_1^2(r, z) \cdot \exp(i\Delta k \cdot z) , \quad \text{éq. 24}$$

où  $\Delta k = 2k_1 - k_2$  ( $\Delta k$  est scalaire : différence des vecteurs d'onde le long de l'axe optique  $z$ ).

10 : l'approximation paraxiale peut être posée jusqu'à une ON de l'objectif de 1 (Chu et al., 2004).



Une onde gaussienne TEM<sub>00</sub> (A<sub>1</sub>(x,y,z) dans l'équation 21), serait spatialement de la forme :

$$A_{1(x,y,z)} = \frac{A_{01} \cdot w_0}{w(z)} e^{i \left( -\arctan\left(\frac{z}{z_R}\right) \right)} e^{\left( \frac{-(x^2+y^2)}{w(z)^2} \right)} e^{\left( \frac{ik(x^2+y^2)}{2R(z)} \right)}, \quad \text{éq. 25}$$

où w<sub>0</sub> est le col du faisceau minimum et w(z) le col à la position z

$$w(z) = w_0 \left( 1 + \left( \frac{z}{z_R} \right)^2 \right)^{\frac{1}{2}}, \quad \text{éq. 26}$$

$$\text{où } z_R = \frac{\pi n_\omega w_0^2}{\lambda_\nu}, \quad \text{éq. 27}$$

où z<sub>R</sub> est la longueur de Rayleigh et b la longueur focale b = 2z<sub>R</sub>,

λ<sub>ν</sub> : longueur d'onde dans le vide de l'onde ω et n<sub>ω</sub> : indice de réfraction associé au milieu.

R(z) : le rayon de courbure à la position z :

$$R(z) = z \left( 1 + \left( \frac{z_R}{z} \right)^2 \right). \quad \text{éq. 28}$$

La phase de Gouy est :

$$\varphi_G = -\arctan\left(\frac{z}{z_R}\right). \quad \text{éq. 29}$$

Elle est caractéristique de l'onde gaussienne et représente le déphasage suivant l'axe optique de l'onde gaussienne par rapport à une onde plane. Nous en reparlons plus loin à propos du désaccord de phase.

Une expression plus pratique est :

$$A_{1(x,y,z)} = \frac{A_{01}}{1 + i\zeta_1} e^{\frac{-(x^2+y^2)}{w_0^2(1+i\zeta_1)}}. \quad \text{éq. 30}$$

avec ζ<sub>1</sub> = 2z/b<sub>1</sub> .

Ainsi en faisant l'approximation que la fondamentale excitatrice de l'échantillon non linéaire soit de cette forme gaussienne et dans l'hypothèse de sa non déplétion ( $A_{01}$  est une constante), et en admettant que l'harmonique peut également être décrite par une fonction gaussienne comme solution triviale de l'équation différentielle 24, le champ électrique de SH peut s'écrire :

$$A_2(x, y, z) = \frac{A_{02}(z)}{1 + i\zeta_2} e^{\frac{-2(x^2 + y^2)}{w_0^2(1 + i\zeta_2)}} . \quad \text{éq. 31}$$

Il vient par identification entre les deux termes en exponentielle que :

- $\zeta_2 = \zeta_1$  et donc les deux faisceaux gaussiens ont le même paramètre confocal : l'harmonique est générée de façon cohérente sur une région dont l'étendue longitudinale est celle de la fondamentale ;
- un nouveau col minimum peut être défini pour l'harmonique qui vaut :

$$w_{02} = \frac{w_{01}}{\sqrt{2}} . \quad \text{éq. 32}$$

Ces deux points sont importants car ils sont liés à la résolution spatiale.

### 3.3.2 Résolutions spatiales pour la SH

#### 1) la résolution latérale

En microscopie laser, pour un faisceau gaussien  $TEM_{00}$ , sans système confocal et avec une même ON pour l'excitation et la collection, la résolution latérale ( $\delta r$ ) est donnée par son col latéral ( $w_r$ ) minimum :  $w_0$ . Elle est donnée en fonction de l'ON par (Mertz, 1998) :

$$\delta r = w_r = w_0 = \frac{0.52 \cdot \lambda}{ON} , \quad \text{éq. 33}$$

$\lambda$  est la longueur d'onde dans le milieu d'immersion, donc incluant  $n_{im}$  :

$$\lambda = \frac{\lambda_v}{n_{im}} .$$

Ainsi la microscopie d'harmoniques, permet une réduction de la taille du faisceau de  $\sqrt{N}$  et la résolution latérale est donnée pour les harmoniques par :

$$\delta r_N = \frac{0.52 \cdot \lambda}{ON \cdot \sqrt{N}}, \quad \text{éq. 34}$$

où  $N$  est l'ordre considéré, par rapport au faisceau de la fondamentale. Pour cette raison, la divergence du faisceau d'harmonique est, dans ce cas général, également divisée par  $\sqrt{N}$  puisque la divergence d'un faisceau gaussien est lié à son col minimum, pour  $z \gg z_R$ , par

$$\theta = \frac{\lambda}{\pi w_0}, \quad \text{éq. 35}$$

où  $\lambda$  est la longueur d'onde dans le milieu d'indice  $n_N$  à la pulsation de l'harmonique.

## 2) la résolution axiale

Pour un microscope laser, pour un faisceau gaussien  $TEM_{00}$ , sans système confocal et avec une même  $ON$  pour l'excitation et la collection, la résolution axiale  $\delta z$  est la mesure de l'étendue longitudinale de la fonction d'étalement du point, i.e. le paramètre confocal  $b$ , avec  $n_o$ , ici l'indice de réfraction d'immersion de l'objectif de focalisation.  $b$  correspond à la largeur à mi-hauteur du profil d'irradiance le long de l'axe optique ( $r^2 = x^2 + y^2 = 0$ ), une fonction lorentzienne.

L'expression en fonction des caractéristiques de l'objectif est alors (Mertz, 1998) :

$$\delta z = w_z = \frac{0.76 \cdot \lambda}{n_{im}(1 - \cos \alpha)}, \quad \text{éq. 36}$$

où  $\lambda$  est la longueur d'onde dans le milieu d'immersion,  $n_{im}$  l'indice d'immersion de l'objectif (sensé être proche de celui de l'échantillon) et  $\alpha$  le demi-angle au sommet du foyer joignant le bord du diaphragme d'ouverture (la frontale de l'objectif) qui est dans l'expression de l'ouverture numérique :  $ON = n_{im} \sin \alpha$ .

Cette expression (éq. 36) est valable pour la fondamentale dans ce modèle de faisceau gaussien. Cependant pour la SH, comme  $A_2(x,y,z)$  a son amplitude  $A_{20}$  fonction de  $z$ , la résolution axiale n'est pas obligatoirement  $b$ . Nous reviendrons sur ces questions de résolution et de diagramme de rayonnement par la suite dans ce chapitre, celui de la GTH (voir le chap. 4.2) et celui des méthodes (voir le chap. 5.2.2 8)).

### 3.3.3 Cas particuliers d'ondes de SH en ondes planes et fortement focalisées

En utilisant l'expression de la SH (éq. 31) et celle de la fondamentale (éq. 30) pour résoudre l'équation différentielle (éq. 24), il vient :

$$\frac{dA_{02}(z)}{dz} = i \frac{2\omega}{2n_{2\omega}c} \chi^{(2)} A_{01}^2 e^{\frac{i\Delta k \cdot z}{(1+i\zeta)}} . \quad \text{éq. 37}$$

Comme seul le dernier terme de droite est fonction de  $z$ , en intégrant il vient :

$$A_{02}(z) = i \frac{\omega}{n_{2\omega}c} \chi^{(2)} A_{01}^2 J_2(\Delta k, z_0, z) . \quad \text{éq. 38}$$

avec

$$J_2(\Delta k, z_0, z) = \int_{z_0}^z \frac{e^{i\Delta k \cdot z'}}{(1+i\zeta)} dz' , \quad \text{éq. 39}$$

où  $z_0$  est la position d'entrée dans le matériau non linéaire et  $z$  sa position de sortie. Pour un ordre supérieur  $n$ , le dénominateur est élevé à la puissance  $(n-1)$ .

Cette intégrale est cruciale et détermine justement beaucoup d'autres caractéristiques que le seul modèle gaussien ne peut expliquer sur les harmoniques. Cette intégrale ne peut être résolue analytiquement que pour certains cas particuliers idéaux qui permettent cependant de comprendre les concepts fondamentaux d'accord de phase et d'accord de phase modifié sous focalisation.

#### 1) onde plane

Dans le cas d'une onde plane,  $b$  tend vers l'infini.  $J_2$  s'écrit alors :

$$J_2(\Delta k, z_0, z) = \int_{z_0}^z e^{i\Delta k \cdot z'} dz' ,$$

$$J_2(\Delta k, z_0, z) = \frac{e^{i\Delta k \cdot z} - e^{i\Delta k \cdot z_0}}{i\Delta k} .$$

Ainsi

$$A_{02}(z) = i \frac{\omega}{n_{2\omega}c} \chi^{(2)} A_{01}^2 \frac{e^{i\Delta k \cdot z} - e^{i\Delta k \cdot z_0}}{i\Delta k} , \quad \text{éq. 40}$$

et l'irradiance  $I$ , moyenne temporelle du vecteur de Poynting dont l'expression générale est :

$$\mathbf{\Pi} = \frac{\mathbf{E} \wedge \mathbf{H}^*}{2}, \quad \text{éq. 41}$$

Sa moyenne temporelle vaut pour une onde plane monochromatique (F. Sanchez, 1999) :

$$I_2 = \frac{1}{2} n_{2\omega} \varepsilon_0 c E_2 E_2^*, \quad \text{éq. 42}$$

soit

$$I_2(L) = \frac{2\omega^2 \left(\chi^{(2)}\right)^2}{n_{2\omega} n_{\omega}^2 \varepsilon_0 c^3} I_{01}^2 L \operatorname{sinc}^2\left(\frac{L\Delta k}{2}\right), \quad \text{éq. 43}$$

où  $L = z - z_0$ .

Cette hypothèse idéale de l'onde plane permet d'introduire déjà le concept d'accord de phase.

Or  $\Delta k$  vaut :

$$\Delta k = 2k_1 - k_2,$$

$$\Delta k = \frac{2\omega(n_{\omega} - n_{2\omega})}{c}, \quad \text{éq. 44}$$

où  $n_{2\omega}$  et  $n_{\omega}$  sont respectivement les indices de réfraction à la fréquence seconde harmonique et à celle de la fondamentale.

En effet,  $\operatorname{sinc}$  est maximal pour  $\Delta k = 0$  et cette condition est justement l'accord de phase<sup>11</sup>.

Physiquement, cette situation signifie que la fondamentale et l'harmonique sont en phase spatialement et temporellement pour optimiser le transfert d'énergie de la fondamentale à l'harmonique. Même si dans ce cas la résolution des équations précédentes doit se faire dans un autre cadre car l'approximation de non déplétion n'est plus valable, une part non négligeable de la fondamentale étant convertie, c'est sous cette condition que le signal de seconde harmonique est optimal : théoriquement la conversion est de 100 % et SH est une fonction croissante de l'épaisseur du matériau finissant par saturer, la fondamentale étant complètement convertie. Pratiquement des facteurs comme l'absorption, la diffusion, la mise en forme du faisceau

11 : il est également possible de trouver la condition  $|\Delta k|L \ll \pi$  (Han *et al.*, 2005) dans la mesure où  $\pi$  est le premier zéro de la fonction  $\operatorname{sinc}$  (pour l'amplitude) ou  $\operatorname{sinc}^2$  pour l'irradiance. Mais cette condition traduit plus l'incapacité de réaliser le strict accord de phase et est donc la condition retrouvée en microscopie de GSH biologique voir chap. 3.4.

(gaussien) ne permet pas d'atteindre le plein rendement et les meilleurs cristaux non linéaires permettent d'atteindre des taux de conversion de 80-90 % (Sudmeyer *et al.*, 2008).

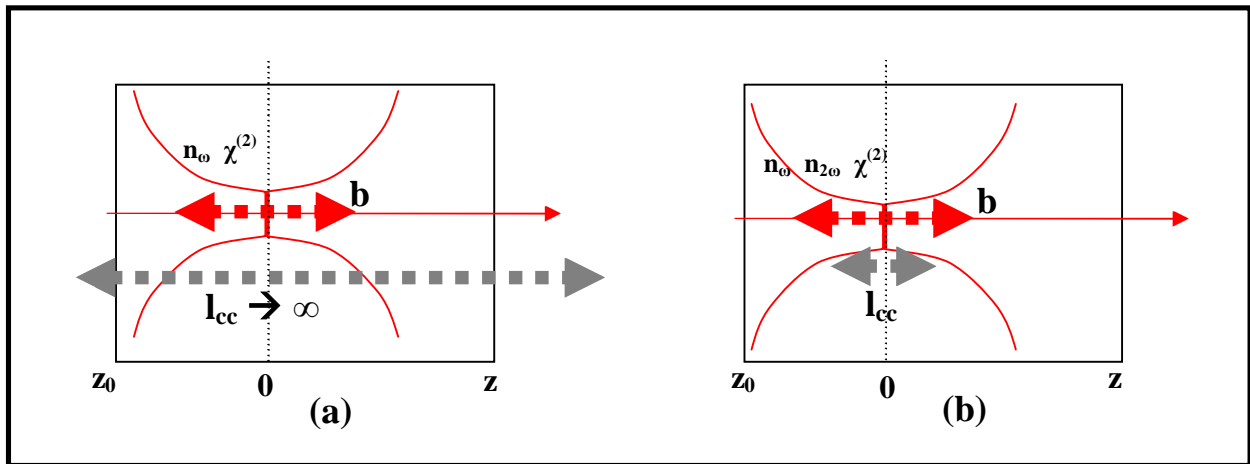
A propos de la diffusion, le phénomène est particulièrement présent dans les milieux biologiques. Elle est dommageable à la génération d'harmoniques car elle « casse » le processus cohérent nécessaire à l'émission et change la polarisation du champ électrique (Gusachenko *et al.*, 2010). Cependant si le photon a dans le milieu d'intérêt une distance de diffusion supérieure aux dimensions du volume actif de génération d'harmoniques, délimité par le paramètre confocal et le col, alors l'émission n'est pas handicapée (Mertz, 2008). La plupart du temps c'est le cas et en particulier dans la cornée.

Ainsi, la principale difficulté à réaliser l'accord de phase tient à contrecarrer la dispersion en trouvant un matériau qui permette  $n_{2\omega} = n_{\omega}$ .

En technologie laser, l'obtention du doublement de fréquence est résolu par l'utilisation de cristaux dont la biréfringence peut justement offrir, entre l'indice de réfraction ordinaire et celui extraordinaire, cette égalité. Mais les milieux biologiques offrent rarement cette opportunité et le collagène, qui pourtant, peut être structuré, a une biréfringence trop faible pour réaliser l'accord de phase (Stoller *et al.*, 2002a).

Même si l'accord de phase permet d'avoir un rendement optimal pour la GSH, il n'est pas une nécessité absolue et la seconde harmonique peut être émise alors que  $\Delta k \neq 0$ . Cette souplesse quant à la GSH permet d'ailleurs d'expliquer en partie, la structure du matériau et les effets « classiques » de diffraction participant également, que le signal n'est pas dirigé dans la seule direction où est vérifié  $\Delta k = 0$ . Cependant dans ce cas de désaccord de phase, l'irradiance de la SH est périodique avec la longueur du matériau. D'après l'équation 43, la périodicité sur le sinus cardinal carré est :  $2\pi/\Delta k$  (F. Sanchez, 1999). Cette périodicité est la longueur de cohérence  $l_c$ . Sur la moitié de cette valeur la fondamentale est transférée à la SH et sur l'autre moitié l'inverse se produit et cette alternance a lieu sur la longueur du matériau non linéaire. Par ailleurs dans le cas plus réaliste où la déplétion de l'onde pompe (fondamentale) est prise en compte, les intensités de la fondamentale et de la SH sont rigoureusement périodiques en situation de désaccord de phase. Pour cette raison il y a intérêt à avoir  $l_c$  la plus grande possible, autrement dit à minimiser le désaccord de phase. Par ailleurs, plus le module de  $\Delta k$  est élevé moins la GSH est efficace.

Dans le cas de la microscopie laser, avec un faisceau focalisé supposé gaussien, il apparaît, comme nous avons pu déjà le voir avec la TCO, que la longueur de cohérence peut intervenir dans la définition de la résolution axiale puisqu'elle commande la longueur sur laquelle l'harmonique est générée. Il faut donc comparer celle-ci par rapport au col axial de la fondamentale (éq. 36). C'est ce qu'illustre ci-dessous la figure 3.7. Ainsi, il est théoriquement possible que la résolution axiale soit fixée par la longueur de cohérence et non par  $b$  et il peut y avoir des situations intermédiaires dépendamment de l'ordre du phénomène (SH, TH). Nous reviendrons plus précisément sur ce point dans le chapitre théorique sur la TH (voir le chap 4.2) où justement nous avons fait l'hypothèse que la focalisation était forte, avec une  $ON = 0.9$ . C'est sur le phénomène de GTH que nous confronterons les mesures expérimentales avec la théorie (voir le chap. 5.2.2 8).



**Figure 3.7** Résolution axiale en fonction de la longueur confocale ou de la longueur de cohérence en microscopie de génération d'harmoniques

(a) représente le cas limite où il n'y a pas de dispersion et par conséquent la zone de génération de la SH est fixé par  $b$ . Dans ce cas le milieu est caractérisé par son indice de réfraction  $n_{\omega}$  (puisque  $n_{2\omega} \approx n_{\omega}$ ) et par sa susceptibilité d'ordre 2, si elle existe,  $\chi^{(2)}$ . Dans le cas (b) la dispersion est suffisamment forte ( $n_{2\omega} \neq n_{\omega}$ ) pour déphaser au-delà de  $l_{cc}$  l'harmonique et la fondamentale. La SH n'est alors générée que sur  $l_{cc}$  qui fixe, dans ce cas, la résolution axiale.

## 2) onde fortement focalisée

Si l'onde est très fortement focalisée à l'intérieur du matériau non linéaire (« bulk »), ceci revient à avoir les conditions suivantes :  $z_0 = -|z_0|, z = |z|$  et  $b \ll |z_0|, |z|$  ce qui équivaut à ce que les bornes de l'intégrale soient  $\pm \infty$  (voir la fig. 3.7 pour les repères) soit :

$$J_2(\Delta k) = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{e^{i\Delta k \cdot z'}}{(1 + i\zeta)} dz' . \quad \text{éq. 45}$$

Cette intégrale peut être évaluée par son contour d'intégration (Wikipedia, 2012i) et il vient :

$$J_2(\Delta k) = \begin{cases} 0, & \text{pour } \Delta k \leq 0 \\ b\pi e^{\left(\frac{-b\Delta k}{2}\right)} & \text{pour } \Delta k > 0 \end{cases} . \quad \text{éq. 46}$$

Il apparait que dans ce cas idéal le strict accord de phase  $\Delta k = 0$ , par compensation de la dispersion, ne permet pas d'avoir le signal optimal de SH. Ainsi  $\Delta k$  doit être strictement positif pour avoir ce maximum, maximum qui de toute façon ne peut donner un signal aussi fort que lorsque  $\Delta k$  est nul, i.e. en onde plane (même si d'autres paramètres doivent être pris en compte dont justement l'irradiance de la fondamentale fonction de la focalisation, voir plus bas). Dans l'équation 46,  $\Delta k$  doit tendre vers  $0^+$  pour cette valeur optimale mais dans les faits ce désaccord de phase positif optimal est fonction de nombreux paramètres autant de focalisation que de caractéristiques du matériau sondé. N'importe comment aucun matériau homogène isotrope ne peut remplir la condition  $\Delta k > 0$  d'après l'équation 44 et à moins d'une dispersion anormale survenant dans le voisinage fréquentiel d'une résonance électronique, l'indice de réfraction de l'harmonique (SH ou TH) est obligatoirement inférieur à celui de la fondamentale. Si le matériau n'est pas biréfringent il ne peut pas y avoir désaccord de phase positif et la GSH, sous faisceau focalisé, ne peut se faire que sur une interface entre deux milieux d'indice de réfraction différents (milieu inhomogène) (Itoh *et al.*, 2009).

La nécessité d'un désaccord de phase positif s'explique par le fait que la focalisation d'un faisceau, induit un terme de phase supplémentaire le long de l'axe de propagation  $z$  (phase de Gouy en éq. 29 et terme  $\frac{1}{1 + i\zeta_1}$  de l'éq. 31). Ce déphasage s'explique en partie par le fait qu'un

faisceau focalisé est une superposition d'ondes planes de différentes directions de propagation : cette superposition induit un déphasage de ces ondes avec une unique onde plane le long de l'axe optique. Le déphasage total à la traversée du foyer est de  $\pi$ . Cette phase de Gouy est contenue dans le dénominateur de l'intégrale  $J_n(\Delta k, z_0, z)$  (éq. 39) et peut donc être intégré dans le désaccord de phase par un vecteur d'onde propre à la phase de Gouy dans la mesure où cette



dernière est fonction de  $z$  : la phase de Gouy contribue à amplifier le désaccord de phase et raccourci ainsi la longueur de cohérence (J. X. Cheng *et al.*, 2002, Han *et al.*, 2005).

Le désaccord de phase sous faisceau focalisé ( $\Delta k_{\text{foc}}$ ) est ainsi :

$$\Delta k_{\text{foc}} = 2k_{\text{Gouy}} - \Delta k_{\text{opl}} , \quad \text{éq. 47}$$

ou en unifiant les vecteurs d'onde liés à l'excitation :

$$\Delta k_{\text{foc}} = 2\xi k_1 - k_2 , \quad \text{éq. 48}$$

d'où

$$l_{\text{cfoc}} = \frac{2\pi}{\Delta k_{\text{foc}}} , \quad \text{éq. 49}$$

où  $\Delta k_{\text{opl}}$  est donné par l'équation 44 (pour les ondes planes) et  $\xi$  le coefficient de réduction du vecteur d'onde fondamentale. Ainsi la nouvelle condition d'accord de phase devient  $\Delta k_{\text{foc}} = 0$ .

S'il faut, comme le montre l'équation 46, que  $\Delta k_{\text{opl}}$  soit positif pour avoir le maximum de signal alors ce maximum de signal n'est plus le long de l'axe de propagation  $z$  comme c'est le cas avec les ondes planes. Moreaux *et al.* (2000b) ont établi cette correspondance entre la focalisation, qui affecte la phase de Gouy par le biais de  $b$ , et le diagramme de rayonnement de la GSH. Ils ont montré dans le cas particulier d'harmonophores parallèles disposés suivant une même direction, comme peut l'offrir des membranes cellulaires marquées avec des molécules « push-pull » (Moreaux *et al.*, 2000a), que l'émission GSH se faisait suivant deux lobes pointant suivant des angles d'émission maximum ainsi définis par la focalisation (ON). Ce profil de rayonnement a été également démontré sur la fibrille de collagène (Y. Chang *et al.*, 2009). Cependant, le concept de désaccord de phase modifié se généralise à ce que l'échantillon même peut induire par sa structure. Mertz & Moreaux (2001) ont justement publié un travail théorique pour expliquer comment une périodicité spatiale dans l'échantillon excité, pouvait modifier l'accord de phase avec la création de facteurs multiplicatifs sur les vecteurs d'onde, comme de façon équivalente a été introduit  $\xi$  pour la phase de Gouy (éq. 48). De la même façon, Cheng *et al.* (2002) montrent cette influence de la géométrie de l'échantillon pour la GTH. La structure du matériau est donc elle aussi susceptible de modifier le diagramme de rayonnement des harmoniques.

Nous verrons dans le chapitre de GTH l'expression de son irradiance dans le cas où le foyer d'excitation est près d'une interface entre deux milieux optiques différents ( $\chi^3$  ou  $n$ ) mais nous pouvons déjà établir la liste des paramètres importants influençant le signal de seconde harmonique.

- Irradiance de la fondamentale :

Quelque soit l'expression de  $J_2$  (éq. 39)  $I_2$  est fonction carré de  $I_1$  qui elle-même peut s'écrire :

$$I_1(x,y,z,t) = \frac{2P}{\pi w^2(z)} e^{\left(-\frac{2(x^2+y^2)}{w^2(z)}\right)} e^{\left(-\frac{2t^2}{\tau^2}\right)} . \quad \text{éq. 50}$$

En faisant l'hypothèse que le champ de la fondamentale est de la forme d'une impulsion gaussienne de durée  $\tau$  et avec  $P$  étant la puissance crête associée à la fondamentale.

Ainsi

$$I_2(x,y,z) \propto ON^4 . \quad \text{éq. 51}$$

Cependant l'ON influence également  $I_2$  par le biais du désaccord de phase (Y. Chang *et al.*, 2009) rendant cette variation plus complexe.

Par ailleurs, en calculant  $\langle I_2 \rangle_t = \langle I_1^2 \rangle_t$ , l'irradiance moyenne de SH est proportionnel à  $\frac{T}{\tau}$ , avec

$T$  la période de l'oscillateur. Ce qui montre tout l'intérêt de travailler avec des lasers ultrabrefs et en particulier femtoseconde (Campagnola *et al.*, 2002, Gauderon *et al.*, 1998, Itoh *et al.*, 2009, Tang *et al.*, 2006).

- Désaccord de phase :

Il prend tout autant en compte la mise en forme du faisceau (ex. ondes planes, gaussiennes...) que la géométrie de l'échantillon. Son influence sur le signal est critique et il est aussi responsable de la façon dont le champ, et donc l'irradiance, est rayonnée autour du foyer d'excitation (Moreaux *et al.*, 2000b).

- Susceptibilité  $\chi^2$  :

C'est la caractéristique du matériau qui joue sur le signal de GSH. Celle-ci est associée, de par sa nature tensorielle, aux questions de variations de la GSH en fonction de la polarisation de la fondamentale comme nous le verrons avec le collagène. En effet contrairement aux phénomènes de fluorescence, les temps de relaxation en génération d'harmoniques sont suffisamment courts en comparaison du temps de rotation moléculaire pour qu'un lien existe entre le signal émis et la polarisation de la fondamentale (Y. Chang *et al.*, 2009, Chu *et al.*, 2004).

Si une forte irradiance est possible avec la technologie actuelle (avec de fortes ON ou des lasers en régime femtoseconde...), il est légitime de se demander si les matériaux biologiques répondent d'une part, au besoin de non centrosymétrie pour avoir un  $\chi^{(2)}$  non nul, et d'autre part, comment dans ces conditions est-il possible de résoudre le problème du désaccord de phase.

### 3.4 Génération de seconde harmonique dans les tissus biologiques

#### 3.4.1 Non centrosymétrie et désaccord de phase

La non centrosymétrie du tissu est une condition qu'il est possible de rencontrer en biologie et c'est ce que nous verrons plus loin dans le chapitre associé au collagène fibrillaire cornéen.

Par rapport au désaccord de phase positif requis en équation 46 ou, ce qui revient au même pour  $\Delta k_{\text{foc}} = 0$ , il n'est clairement pas possible de répondre à ces conditions dans un matériau biologique éclairé par un faisceau fondamental focalisé avec une incidence et une polarisation arbitraire par rapport à l'objet sondé. Par ailleurs, dans la cornée, la biréfringence est inhomogène en fonction de la position par rapport à l'apex (Gotzinger *et al.*, 2004) mais surtout elle est trop faible (Stoller *et al.*, 2002a) pour compenser le désaccord de phase. Cependant il est important de préciser que si l'accord de phase ne peut être réalisé pour cause d'une biréfringence faible, le matériau n'est pas forcément isotrope, ou sur un cristal uniaxe, ne correspond pas forcément à la direction suivant l'axe optique. La non GSH peut donc avoir deux causes matérielles bien distinctes : la centrosymétrie (isotropie) ou un désaccord de phase trop important.

Comme les conditions d'accord de phase ne peuvent, en général, pas être remplies en biologie, le désaccord de phase doit être minimisé (Han *et al.*, 2005) :

$$|2k_{\text{Gouy}} - \Delta k_{\text{opl}}| \cdot l \ll \pi .$$

Cette condition, comme nous l'avons dit précédemment, doit par ailleurs prendre en compte les caractéristiques spatiales particulières de l'échantillon. Il faut donc que la longueur d'interaction avec le matériau soit idéalement de la longueur de cohérence  $l_{\text{foc}}$ .

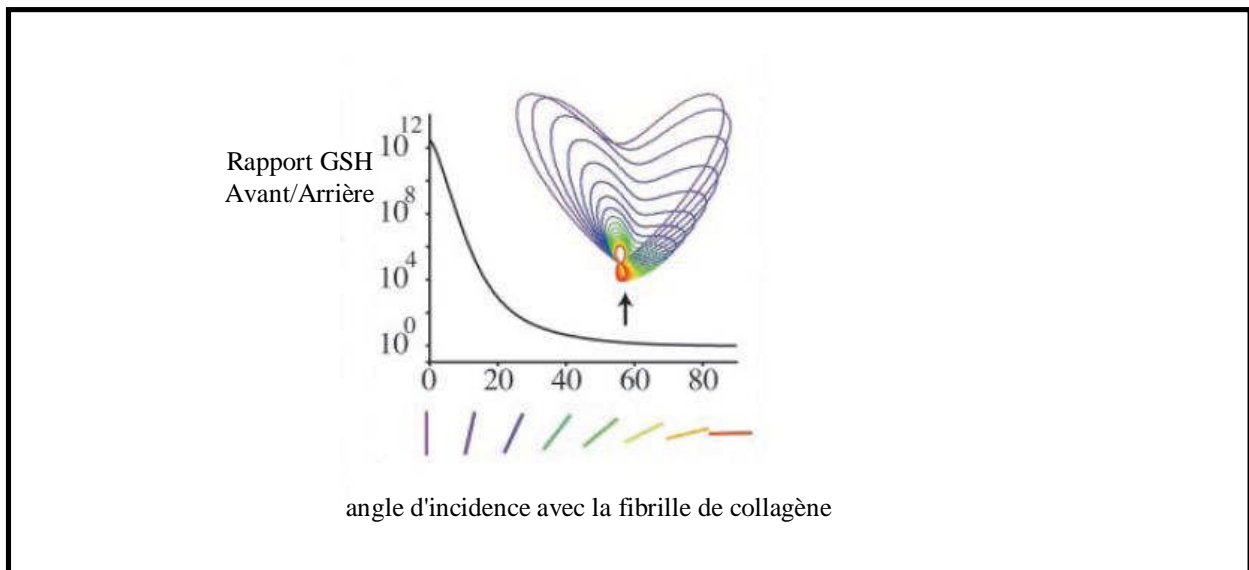
En microscopie, le faisceau est focalisé pour atteindre une haute résolution spatiale. Les longueurs focales impliquées en microscopie de génération d'harmoniques sont justement du même ordre de grandeur ou inférieures à cette longueur de cohérence et l'harmonique (SH ou TH) peut être émise sur cette longueur. En fait la région d'interaction est délimitée, par le faisceau excitateur supposé gaussien, transversalement par le diamètre du faisceau au foyer ( $2w_0$ ) et axialement par  $w_z$  défini en (éq. 36). Elle est alors typiquement de l'ordre du  $\mu\text{m}^2$  pour une ON de 0.9 (Mertz, 2008).

Parmi les premiers travaux de microscopie SH, Moreaux *et al.* (Moreaux *et al.*, 2000b) mais aussi Campagnola *et al.* (1999) ont travaillé sur l'imagerie de membranes cellulaires marquées régulièrement par des harmonophores synthétiques (molécules « push-pull ») (Campagnola *et al.*, 2001, Mertz, 2008, Moreaux *et al.*, 2000a). Ces objets offrent l'avantage de pouvoir y contrôler facilement l'agencement spatial des émetteurs et par ailleurs le matériau à sonder se réduit à une couche sans épaisseur à la vue du faisceau excitateur. Dans ce cas, la longueur d'interaction est si courte de par la courbure de la membrane (vésicules lipidiques d'une dizaine de microns de diamètre et de quelques nm d'épaisseur membranaire), qu'il n'est même pas nécessaire (en fonction de la résolution spatiale désirée) de focaliser pour avoir cette condition sur la longueur de cohérence. Ces mêmes conditions valent pour le collagène avec celui-ci organisé sous forme de fibrille d'une cinquantaine de nm (Han *et al.*, 2005). Par ailleurs, la SH ne peut se révéler qu'entre objets séparés d'au moins  $l_c$  pour éviter les interférences destructives et la limite minimale à cette distance est de l'ordre de  $\frac{\lambda_{2\omega}}{10}$  où  $\lambda_{2\omega}$  est la longueur d'onde SH dans le milieu d'indice  $n_{2\omega}$  (Campagnola, 2008).

## Émission en arrière des harmoniques

Une autre problématique associée au désaccord de phase concerne la direction de l'émission de l'harmonique (diagramme de rayonnement). Nous avons déjà abordé cette question mais il est important de savoir, en particulier, si l'harmonique peut dans certaines conditions être directement émise vers l'arrière pour savoir quelle est sa contribution à l'épi-détection (voir le chap. 2.2 « concept d'épi-détection »).

En optique linéaire, d'après la théorie de Mie, les objets qui s'étendent suivant l'axe optique et sur une distance au moins égale à la longueur d'onde de cette lumière incidente, rayonnent principalement vers l'avant. Ce fait reste valable pour les phénomènes d'optique non linéaire, que ce soit pour la GSH, la GTH ou les autres phénomènes cohérents en faisant la comparaison avec la longueur d'émission de la lumière générée. La figure 3.8, tirée de la référence (Zipfel *et al.*, 2003a), illustre cette possibilité à propos du collagène. Comme nous le verrons par la suite, dans



**Figure 3.8** Rapport de signal avant/arrière en fonction de l'angle d'une fibrille de collagène avec l'incidence de la fondamentale

Cette figure est tirée de la source : (Zipfel *et al.*, 2003a).

le chapitre 3.4.3 sur le collagène, celui-ci est pour ce qui est de la cornée, organisé sous la forme de longue fibrille mais dont le diamètre n'est que de quelques dizaines de nm. Or, justement, un objet dont la dimension suivant l'axe optique est de l'ordre de  $\frac{\lambda_{2\omega}}{10}$  ou moins, implique, entre l'avant et l'arrière, un rapport de 50 %.

En revanche si l'objet est de dimension  $\lambda_{2\omega}$  ou plus suivant la même direction le champ est principalement émis vers l'avant. Ces considérations peuvent être faites autant à l'échelle d'une molécule que pour une population et encore une fois, ces rapports s'expliquent toujours par le désaccord de phase généralisé (focalisation et structure de l'échantillon). A propos de l'échantillon, mentionnons que la GSH sur interfaces est également susceptible de donner un signal directement émis vers l'arrière (Boulesteix, 2004, Boyd, 2008, Gauderon *et al.*, 2001). De nombreuses études autant théoriques (Mertz *et al.*, 2001, Moreaux *et al.*, 2000b, Williams, Williams *et al.*, 2005) qu'expérimentales (Fu *et al.*, 2007, Han *et al.*, 2005, Sun *et al.*, 2003, Sun *et al.*, 2005, Williams *et al.*, 2005) dans différents tissus ont permis de le vérifier. Elles peuvent, par exemple, permettre de savoir quelle est la structure d'une fibre protéique (tubulaire ou cylindre plein) sans forcément avoir la résolution spatiale pour observer cette ultrastructure (Han *et al.*, 2005, Williams *et al.*, 2005) (voir le chap. 3.4.4).

Enfin comme nous l'avons déjà dit en chapitre 2.2, il ne faut pas oublier les contributions à l'épi-détection par rétrodiffusion ou réflexion (diffusante ou spéculaire), plus ou moins importantes suivant le tissu. A ce titre la peau ou la sclère de l'œil sont des tissus très diffusif, ce qui n'empêche pas que leurs composants mêmes puissent aussi émettre directement la SH en arrière (voir les travaux de Han *et al.* (2005) sur l'interprétation du signal arrière de la sclère).

En conclusion de cette question de l'accord de phase en biologie, nous avons déjà vu que la mise en forme du faisceau, par l'apport de la phase de Gouy en focalisation, importait dans le diagramme de rayonnement. Mais la géométrie du matériau, qui en biologie est hautement inhomogène, et la position où l'on focalise est tout aussi importante pour la génération des harmoniques et en fait un sujet complexe (Stoller *et al.*, 2002a). Par ailleurs mentionnons dès maintenant le cas particulier de la cornée où le collagène prend une structure régulière à partir d'une certaine profondeur dans le stroma (voir le chap. 2.1.2 3). Les dernières recherches sur ce tissu émettent la possibilité qu'à défaut d'un accord de phase strict du fait de la dispersion il

pourrait y avoir un quasi accord de phase par l'empilement des lamelles (Campagnola *et al.*, 2011, Lacombe *et al.*, 2008).

### 3.4.2 GSH biologique endogène

Les travaux que nous avons mentionnés de GSH dans les membranes sont particulièrement intéressants pour comprendre comment, dans un modèle biologique simple, la GSH peut être réalisée. Ils ont également permis une importante avancée dans l'imagerie membranaire en situation biologique réelle. Ces harmonophores synthétiques permettent entre autres de faire des mesures physiologiques sur les neurones car il a été mis en évidence que la GSH était sensible aux potentiels d'action de ceux-ci (Dombeck *et al.*, 2005, Pons *et al.*, 2003).

Cependant, il est toujours préférable, comme nous l'avons mentionné au chapitre 2, d'exploiter les molécules corporelles (endogènes) qui ont la capacité par leur structure spatiale d'offrir la GSH.

La possibilité de la GSH dans les tissus biologiques a été discutée pour la première fois en 1965 (S. Fine, 1965, Zaret, 1965). Des études par Vasilenko *et al.* (1965) ont suggéré la même année que la GSH pouvait avoir lieu dans l'œil. Ces observations étaient basées sur le fait que des humains rapportaient subjectivement des sensations visuelles vertes à environ la fréquence double de la lumière d'excitation.

En 1971, Fine *et al.* (S. Fine *et al.*, 1971), utilisant un laser rubis « Q-switched », rapportent des travaux de GSH sur un nombre important de tissus différents chez plusieurs espèces animales : cornée, sclère, peau d'abdomen, tendon d'Achille, cristallin, tissu rétinien-choroidal, sang et mélanosomes tumoraux.

Cependant ces travaux ne sont encore à ce moment que des mesures de signal. Les premières études de microscopie à balayage laser exploitant la GSH, sont réalisées sur des cristaux dans le milieu des années 70 (Gannaway *et al.*, 1978, Hellwarth *et al.*, 1975) où l'intérêt de ces observations est déjà démontré pour révéler des objets invisibles par microscopie conventionnelle. Des images furent rapidement obtenues ensuite (I. Freund *et al.*, 1986b, Roth *et al.*, 1979, Roth *et al.*, 1981) dans les mêmes tissus que ceux précédemment cités.

Tous ces différents tissus ont en commun de posséder des molécules qui présentent une non centrosymétrie. Comme nous l'avons dit précédemment, cette condition moléculaire est déjà nécessaire avant même d'aborder la question de la symétrie dans la structure du tissu. Une molécule biologique présentant par exemple une géométrie hélicoïdale, possède aussi une chiralité qui assure sa non centrosymétrie. Or de nombreuses molécules ont une telle forme que ce soit dans les sucres, les protéines ou à une plus grande échelle, les filaments moléculaires.

### 3.4.3 Le collagène

Les molécules de collagène forment une superfamille de protéines constitutives de la matrice extracellulaire et du tissu conjonctif (Pena, 2006, Ricard-Blum *et al.*, 2005), ce qui fait d'elles, les protéines les plus abondantes du règne animal. Chez l'homme elle représente ainsi 30 % en masse des protéines corporelles (Pena, 2006). Il se trouve que certains types de collagène dits fibrillaires respectent à toutes les échelles structurales, de la molécule unique à l'échelle supramoléculaire (fibre), la non centrosymétrie qui nous importe pour la GSH. En fait, mis à part les tissus composés de collagène, les muscles possèdent aussi de la myosine qui est fibrillaire et constitue l'autre grande famille tissulaire animale à avoir été imagée par la GSH (Both *et al.*, 2004, Campagnola *et al.*, 2002, Plotnikov *et al.*, 2006). Il faut cependant faire remarquer que certaines molécules fibrillaires peuvent être centrosymétriques si par ex. la disposition des hélices  $\alpha$  et des feuilletts  $\beta$  est aléatoire comme c'est le cas avec l'élastine qui n'est donc pas en mesure de réaliser la GSH (Campagnola, 2008).

On dénombre 27 types de collagène fibrillaires ou non. Les collagènes non fibrillaires (globulaires) forment des réseaux dans les membranes basales (collagène IV). Ils sont impliqués dans l'organisation tridimensionnelle des fibres collagéniques (collagènes IX, XII, XIV,...) ou dans l'ancrage des tissus de recouvrement aux tissus conjonctifs sous-jacents (collagènes VII, XVII). Cependant, dans 90 % des cas, le collagène tissulaire est fibrillaire (I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII) (Birk, 2001, Knoesen, 2009). Ceux-ci confèrent une résistance mécanique au tissu le composant. Parmi eux, le collagène de type I est le plus abondant et se retrouve dans de nombreux tissus. La figure 3.9 le représente et montre en particulier sa structure chirale en longueur, justifiant sa non centrosymétrie.



La cellule qui est à l'origine de la biosynthèse du collagène (Wikipedia, 2012a) est le fibroblaste (kératocyte dans la cornée). Le fibroblaste couvre en son sein les étapes de synthèse polypeptidique et la formation de la triple hélice, alors que le tropocollagène et son association en fibrille et fibre sont réalisés en milieu extracellulaire.

La structure primaire du collagène I, i.e. sa séquence d'acides aminés, est caractérisée par une périodicité de la glycine qui se retrouve toutes les trois fois dans la séquence. La glycine fait ainsi partie d'une unité tripeptidique répétitive (GlyXY)<sub>n</sub>, essentielle pour la conformation en hélice  $\alpha$  gauche. Dans 20 à 30 % des cas, X est la proline, et Y, l'hydroxyproline.

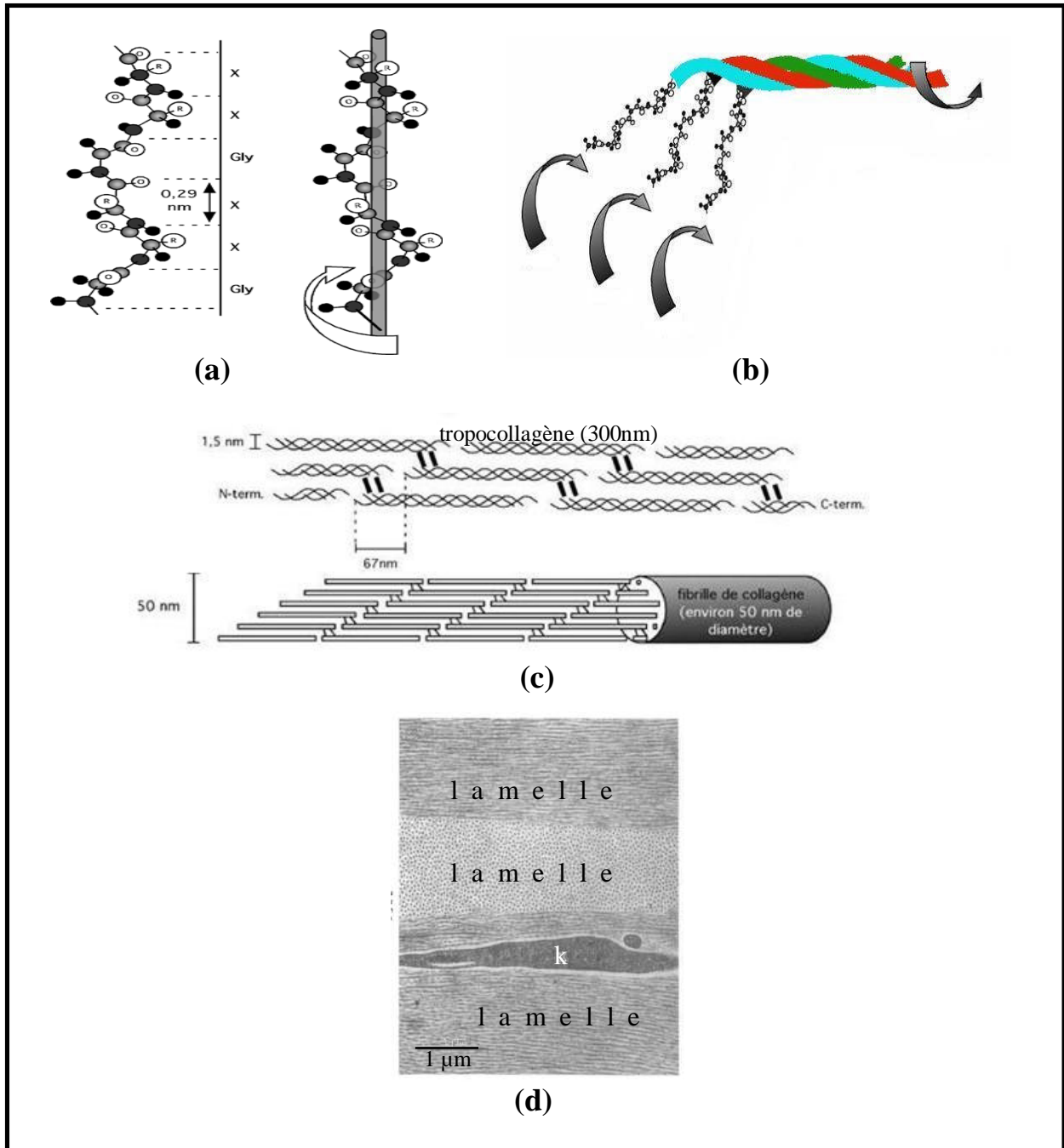
Etant le plus petit acide aminé, avec seulement un atome d'hydrogène dans sa chaîne latérale, la glycine occupe une position centrale dans l'hélice, tandis que les autres acides aminés X et Y ont leurs chaînes latérales dirigées vers l'extérieur.

Ceci permet un assemblage compact de trois chaînes : deux  $\alpha 1(I)$  et une  $\alpha 2(I)$  (les deux types de chaînes différent un peu par la structure primaire et le « I » fait référence au type de collagène). Cette triple hélice droite est la molécule de procollagène

Le procollagène n'est cependant pas la molécule de collagène mature. Diverses réactions biochimiques réalisées dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi contribuent à la production de la molécule finale de tropocollagène constitué de 1050 acides aminés.

Ensuite, a lieu par réactions enzymatiques à la surface du fibroblaste, l'association, maintenue par liaisons covalentes, de ces molécules de tropocollagène en fibrille. Durant la construction du polymère, un décalage de 67 nm entre chaque molécule de tropocollagène est laissé.

Dans la cornée, la fibrille dont le diamètre est en moyenne de 31 nm chez l'humain {37 nm chez le porc} (Meek *et al.*, 2001b). Elles sont espacées les unes des autres de 55 {59} nm en moyenne (Meek *et al.*, 2001b). Ces données sont recoupées entre les mesures effectuées par microscopie électronique et spectrométrie X, cette dernière offrant l'avantage de pouvoir réaliser la mesure sur le tissu frais (Meek *et al.*, 2009, Meek *et al.*, 2001b). Cependant, la spectrométrie X pose le problème des rayonnements ionisants et ne permet une imagerie 3D de la cornée.



**Figure 3.9 Collagène fibrillaire de type I : de la molécule à la lamelle stromale**

(a) structure secondaire du collagène en chaîne  $\alpha$  gauche : Gly : glycine ; X : autre acide aminé. (b) microfibrille de procollagène ou tropocollagène (hélice droite). (c) fibrille de tropocollagènes. (d) lamelles cornéennes perpendiculaires rassemblant des fibrilles (petits ronds) ; k : kératocyte enchassé dans une lamelle.

Figures (a), (b), (c) modifiées depuis la source (Leblanc).

Figure (d) modifiée de la source (Komai *et al.*, 1991).

Dans la cornée les fibrilles de collagène de type I s'alignent parallèlement et forment une fibre (ou lamelle) de collagène alors que dans la sclère les orientations des fibrilles sont différentes et celles-ci s'entrecroisent pour former des réseaux complexes (Meek *et al.*, 2001a). Une lamelle de collagène dans la cornée a un diamètre typiquement autour de 2  $\mu\text{m}$  (0.5 et 3  $\mu\text{m}$ ) et peut varier en longueur entre 10 et 300  $\mu\text{m}$ .

#### 3.4.4 Microscopie GSH du collagène

Le collagène fibrillaire est présent dans la cornée et nous aborderons ce sujet dans le chapitre 3.4.5 mais il est aussi présent dans les tendons qui constituent l'autre tissu sur lequel ont été menées de nombreuses études. Voyons ici quelles généralités sont à faire ressortir sur le signal GSH du collagène quelque soit son environnement.

Nous avons déjà vu précédemment que des molécules relativement simples telles que les harmonophores « push-pull » pouvaient réaliser le doublement de fréquence grâce à leur polarité unidimensionnelle. Cependant des molécules plus complexes structurellement comme les molécules chirales (Knoesen, 2009) sont aussi susceptibles d'avoir une hyperpolarisabilité du premier ordre conséquente et même plus élevée que d'autres molécules non centrosymétriques (Campagnola *et al.*, 1999). Toutes les molécules non centrosymétriques ne sont pas forcément chirales alors que le contraire est toujours vrai. En fait, un assemblage macromoléculaire est susceptible de maintenir la non centrosymétrie par alignement de segments non centrosymétriques le composant suivant une même direction ou le long d'une hélice.

Dans notre cas, on voit que de nombreuses caractéristiques prédisposent le collagène fibrillaire à être une source d'exception pour réaliser le doublement de fréquence (par le biais de la DHR).

Plus précisément, le collagène de type I fournit un signal élevé pour deux raisons.

- la première est associée à la chiralité de la chaîne  $\alpha$ . Des mesures effectuées par Génération de Fréquence Somme (Knoesen, 2009) (voir le chap. 3.1), plus pratique que la GSH pour les mesures de DHR, ont permis, à l'aide d'autres relevés spectrométriques, d'identifier plus précisément au sein de la chaîne  $\alpha$  ce qui contribuait à cette non centrosymétrie. Elle est attribuable d'une part aux groupes chimiques méthylène de la proline et de l'hydroxyproline. Leur disposition spatiale perpendiculaire et asymétrique autour de l'axe principal de la chaîne  $\alpha$  fournit une chiralité propice à un fort effet

nonlinéaire d'ordre 2. D'autre part, la vibration d'élongation des groupes carbonyles et peptides disposés perpendiculairement autour de l'axe principal de la chaîne et de façon hélicoïdale, contribue aussi à la chiralité et donc à la forte hyperpolarisabilité ;

- la seconde tient au fait que la structure quaternaire (également chirale de pas droit) du tropocollagène avec ses trois chaînes  $\alpha$  enroulées, permet une coopération menant à une plus forte hyperpolarisabilité (Campagnola *et al.*, 2002) que se qu'offrirait la simple somme des trois contributions des chaînes.

Pour autant, le collagène moléculaire, pour plusieurs groupes de recherche en optique non linéaire, est fixé à la fibrille (la structure où les tropocollagènes sont assemblés) : la fibrille est donc l'harmonophore considéré et sur lequel on définit l'hyperpolarisabilité  $\beta$ . Pour remonter aux éléments du tenseur  $\beta$ , on modélise la fibrille par un matériau nonlinéaire de symétrie cylindrique  $C_\infty$  (forme en bâton). Les éléments restant du tenseur  $\beta$  s'en trouvent très simplifiés surtout que la condition de la symétrie de Kleinman peut aussi, le plus souvent, être vérifiée expérimentalement en se tenant loin des fréquences de résonance de la molécule sondée. Ainsi pour le champ fondamental  $E_1$  polarisé linéairement et focalisé sur une fibrille, elle-même dans le plan de  $E_1$ , il ne reste plus que deux éléments du tenseur  $\beta$  avec ces simplifications (Y. Chang *et al.*, 2010b).

Ainsi, en se référant à la figure 3.6, pour une fibrille cylindrique dont l'axe de révolution est suivant  $x$ , pour un faisceau fondamental se propageant suivant  $z$  mais polarisé linéairement dans le plan  $(x,y)$ .

$$\mu_{2\omega,i} = \frac{1}{2} \sum_{j,k} \beta_{ijk} E_{\omega,j} E_{\omega,k} \quad , \quad \text{éq. 52}$$

où  $i, j, k$  codent pour les trois axes  $x, y, z$

En prenant en compte la condition de Kleinman et la symétrie cylindrique de la fibrille, il vient :

$$\mu_{2\omega,x} = \frac{1}{2} \left( \beta_{xxx} E_{\omega,x}^2 + \beta_{xyy} E_{\omega,y}^2 \right) \quad , \quad \text{éq. 53}$$

et

$$\mu_{2\omega,y} = \frac{1}{2} \left( \beta_{xyy} E_{\omega,x} E_{\omega,y} + \beta_{xyy} E_{\omega,y} E_{\omega,x} \right) \quad . \quad \text{éq. 54}$$

Bien sûr ces conséquences sont également valables lorsqu'on considère  $\chi^2$ . Il faut aussi faire remarquer que  $\beta$  ou  $\chi^2$  n'ont de sens en microscopie que localement dans les limites du volume d'excitation.

Cependant comme les fibrilles sont souvent trop minces et trop serrées pour être résolues (comme dans la cornée), ces travaux nécessitent de travailler à l'échelle supérieure de la fibre (ou lamelle) où on s'accorde généralement à dire (comme l'illustre la figure 3.9 (d)) que toutes les fibrilles la constituant y sont alignées parallèlement le long de l'axe de longueur de la fibre et uniformément (Y. Chang *et al.*, 2009). Expérimentalement plusieurs travaux de polarimétrie (Y. Chang *et al.*, 2010b, Odin *et al.*, 2008, Stoller *et al.*, 2002b, Williams *et al.*, 2005) ont donc été menés pour voir comment se comportait l'irradiance totale en SH (ou des deux composantes de polarisation du champ de SH) en fonction de l'angle de  $E_1$  avec la fibre (ou fibrille). Ces mesures permettent de remonter aux éléments du tenseur  $\beta$ . En vérité, on ne mesure généralement pas directement les valeurs absolues  $\beta_{ijk}$  mais des rapports entre ceux-ci, en l'occurrence pour le collagène le rapport de deux seuls éléments indépendants.

Pour le collagène, le rapport  $\rho$  des deux éléments, varie dans une fourchette de valeurs [-3 ; 3] (Odin *et al.*, 2008). Cette variation de  $\rho$  est importante car elle peut être une signature de changement du collagène révélatrice de vieillissement ou de pathologies.

Un autre fait fondamental à propos du collagène fibrillaire est que les fibrilles seraient différentes suivant le tissu. En effet, il a été montré que malgré des variations du diamètre d'une fibrille, pouvant être par ex. dues à l'âge, la fibrille a un rapport pratiquement constant et proche de un entre l'émission avant et arrière de la SH. Or, nous avons précédemment vu que ce rapport devrait changer suivant que l'épaisseur est plus ou moins grande comparativement à la longueur d'onde de la SH. En prouvant que d'autres contributions non linéaire étaient à exclure pour expliquer une augmentation du signal de surface de la fibrille, les travaux sur ce sujet ont démontré que la fibrille est un « bâton » plein pour la cornée (Han *et al.*, 2005) et un cylindre dont seul la coquille (Williams *et al.*, 2005) émettrait la SH pour la sclère ou le collagène du tendon. Fu *et al.* (2007) ont trouvé un résultat similaire pour d'autres fibres (fibres astrogliales). Cette réalité peut même être observée directement pour peu que l'on image en SH avec une ouverture numérique très forte (1.3) (les fibrilles du tendon ont un diamètre plus important de quelques centaines de nm).

Enfin, signalons que parmi les autres collagènes fibrillaires le II est celui qui génère le plus après le I. Seuls ces deux collagènes fibrillaires donnent un signal véritablement exploitable en imagerie (Su *et al.*, 2010).

Enfin, il faut signaler l'intérêt applicatif de l'étude du collagène dans le cadre biomédical. Dans cet objectif, bon nombre de travaux se sont concentrés sur les mesures de polarisation pour révéler les distributions différentes de direction des fibres. Ces distributions peuvent ainsi être utilisées afin de distinguer des fibres de nature différente comme le collagène avec la fibre musculaire, les deux émettant SH (Psilodimitrakopoulos *et al.*, 2009). Par ailleurs, ces expériences peuvent révéler des désordres structuraux du collagène propres à certaines pathologies (ex. fibrose du poumon (Pena *et al.*, 2007)) ou traumatismes (ex. affectations des vertèbres (Reiser *et al.*, 2007)).

Outre la propriété exceptionnelle du collagène fibrillaire en GSH, il faut également faire remarquer que le collagène est susceptible d'autofluorescence proche de rayonnement du Ti:Sa mais cette dernière n'est pas autant exploitée que sa GSH (Zoumi *et al.*, 2002).

### **3.4.5 Microscopie GSH en ophtalmologie cornéenne**

Le collagène fibrillaire que nous avons décrit en détail est un composant essentiel de la cornée par la couche la plus épaisse qui la compose : le stroma. Ce volume prédominant au sein de l'organe qui nous intéresse justifie que la microscopie de SH ait été largement exploitée pour observer la cornée. Cependant comme nous l'avons vu au chapitre 2.1.2, l'anatomie de la cornée connue par les méthodes classiques *in vitro* de microscopie présente d'autres couches dont le rôle est tout aussi important que le stroma. Nous aborderons dans la partie résultat, les recours qu'ont explorés les autres équipes de recherche pour imager les couches cornéennes dépourvues de collagène émettant la SH pour introduire l'intérêt que nous avons trouvé à utiliser la GTH comme complément de la GSH.

Au moment où le projet de doctorat a été initialisé deux grandes tendances prévalaient :

- 1) une exploitation du lien étroit qu'entretient la GSH avec la polarimétrie par un effort particulier d'observation du stroma,
- 2) d'autre part, une complexification des technologies pour déboucher sur une solution presque complète d'imagerie GSH (IGSH) et de thérapie laser pour l'ophtalmologie.

Le second point concerne les études d'IGSH appliquée à l'observation des phénomènes impliqués dans la chirurgie réfractive avec microkératome « optique ». Nous avons déjà introduits le sujet en chapitre 2.1.4 mais nous l'aborderons à nouveau avec le chapitre de résultat sur les coupes intrastromales (voir le chap. 8). Voyons donc ici pourquoi la GSH est un outil intéressant pour comprendre le collagène stromal.

### **La GSH comme outil pour comprendre le collagène stromal**

Dans la cornée, la seule molécule qui soit susceptible de générer de la SH est le collagène. Les autres protéines présentes dans les cellules n'ont pas de susceptibilité non linéaire  $\chi^2$  comparable (Zipfel *et al.*, 2003a). Cependant comme nous l'avons vu précédemment seul le collagène fibrillaire est susceptible de générer la SH.

Où se trouve-t-il ? Les types qui correspondent à du collagène fibrillaires sont : I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII. De toutes les couches cornéennes, seul le stroma possède un tel collagène en présentant les types I, III, V avec une prépondérance nette du type I (68 % de la masse sèche de la cornée (Meek *et al.*, 2001a)). Le stroma présente également des collagènes globulaires (VI, XII, XIII et XIV).

Comme nous l'avons évoqué au chapitre 2.1.2 2), la membrane de Bowman, présente chez l'humain, n'est pas, contrairement à la membrane de Descemet, une couche anatomique différenciée et constitue une sous structure du stroma. Ainsi sa composition en collagène fibrillaire lui donne aussi la possibilité d'être observée. Cependant de par sa structure désorganisée et dense en collagène, révélée en microscopie électronique (Komai *et al.*, 1991), elle est plus près macroscopiquement d'un matériau amorphe et son signal de SH homogène est plus faible que dans le stroma en même temps que son diagramme de rayonnement est plus équilibré entre l'avant et l'arrière (Morishige *et al.*, 2009).

En revanche, la membrane de Descemet est produite par l'endothélium et sa nature est donc tout autre : le collagène qui la compose est de type IV et VIII, un collagène qui est donc *a priori* incapable de GSH.

Ainsi la seconde harmonique n'est en mesure de couvrir, en terme d'observation, par cette distribution du collagène non centrosymétrique, que le stroma et la membrane de Bowman.

## Qu'est-ce que l'imagerie de GSH a permis d'apprendre sur le stroma ?

La GSH n'a pas découvert de nouveaux objets ou structures qui n'aient été déjà connus par d'autres méthodes (microscopie électronique, diffraction X ...) (Morishige *et al.*, 2006). Cependant la force de l'IGSH, comme pour la l'IGTH, est de fournir une très bonne résolution spatiale permettant une tomographie optique et de nombreuses informations qui sinon, seraient justement distribués entre ces différentes méthodes. Enfin comme nous le savons ces deux méthodes ne demandent aucune préparation et sont non invasives. Le fait, entre autres, de ne pas avoir à effectuer des biopsies pour analyser le tissu permet de plus facilement suivre une structure sur de grandes échelles car l'alignement des échantillons prélevés peut se révéler délicat (Morishige *et al.*, 2006). L'IGSH, contrairement aux méthodes « classiques » permet aussi des observations *en face* ce qui offre un intérêt pour observer le réseau de collagène parallèlement à la surface cornéenne. Voyons quelles ont été les grandes étapes de ces travaux.

La réalisation du doublement de fréquence dans la cornée remonte aux années 60-80 mais les premières images réalisées dans ce même organe avec un microscope de GSH sont bien plus récentes, i.e. dans les années 2000. Ce décalage, valable plus généralement pour l'imagerie biomédicale par générations d'harmoniques, s'explique en partie par le développement technologique (lasers impulsionnels, microscope à balayage). Ainsi, en 2002 l'équipe de recherche Yeh *et al.* (2002) présenta les premières images en GSH de la cornée. Le laser utilisé était un oscillateur Ti:Sa dont l'émission pour l'excitation se situe autour de 800 nm. Ces travaux permirent déjà de vérifier que les lamelles de collagène étaient principalement parallèles à la surface de la cornée. Cette même étude montra également que des zones de SH plus faibles peuvent trahir la présence de kératocytes confirmés par autofluorescence 2 photons (2P) (voir aussi le chap. 6.1). Dans cette même étude, il fut confirmé que la GSH du collagène stromal était sensible à l'angle qu'il fait avec le champ exciteur polarisé linéairement : une image *en face* a une certaine profondeur dans le stroma ne révèle pas les mêmes lamelles en faisant tourner la polarisation du champ exciteur. En fait il est connu, avant même l'utilisation de l'IGSH, que les lamelles de collagène n'ont pas la même organisation (Nishida, 2005, Svaldenienė *et al.*, 2003) suivant la profondeur dans le stroma : dans le stroma antérieur, donc près de l'épithélium, les lamelles sont plus ondulées et entremêlées, avec une ramification des lamelles. Au contraire, au fur et à mesure que l'on s'enfonce dans le stroma (vers le côté postérieur de la cornée), les lamelles s'alignent davantage parallèlement à la surface de la cornée pour former la construction



alternée orthogonale que nous avons précédemment décrite. C'est cette organisation différente suivant la profondeur dans la cornée qui expliquerait les forces qui la soutiennent et donc sa forme (Bron, 2001, L. J. Muller *et al.*, 2001).

Des travaux d'IGSH sur la cornée, par Morishige *et al.* (Morishige *et al.*, 2006), ont maintenant montré, même si ceux-ci ont été réalisés avec des blocs de cornée fixés dans le paraformaldéhyde, cette organisation. On a pu aussi observer chez l'homme, les lamelles dites transverses, celles-ci n'étant pas présentes chez tous les mammifères. Ces lamelles s'ancrent dans la membrane de Bowman et descendent obliquement dans le stroma jusqu'à plus de 100  $\mu\text{m}$ . Ces lamelles auraient une importance pour limiter l'oedématisation de la cornée notamment induite par la dystrophie de Fuchs. Cette même équipe de recherche (Morishige *et al.*, 2007) a montré que la maladie du kératocône affectait justement la partie antérieure de la cornée en faisant apparaître un manque ou un raccourcissement de ces lamelles d'entrelacement et transverses, laissant principalement place à une organisation uniforme de lamelles arrangées orthogonalement. Le kératocône provoque également une rupture de la membrane de Bowman visible en IGSH. Auparavant la méthode qui permettait d'imager directement cette organisation était la microscopie électronique mais celle-ci, en plus d'être invasive, ne pouvait pas permettre d'observation en profondeur. L'IGSH le permet facilement lorsqu'on construit une coupe transversale, par sa haute résolution spatiale (même axiale) et son contraste sur les fibres de collagène.

À cause des considérations théoriques que nous avons évoquées plus haut (voir les chap. 3.3.3 2) et 3.4.1), il est légitime de s'attendre à ce que les observations ne soient pas les mêmes en épi-détection et en transmission. Les lamelles de collagène stromales sont intéressantes à ce sujet, et leur image en transmission offre un contraste différent (Han *et al.*, 2005, Morishige *et al.*, 2009) de celui en épi-détection : la transmission permet de révéler davantage l'aspect fibrillaire des lamelles, lamelles qui peuvent d'ailleurs être nombreuses dans un même champ d'observation<sup>12</sup>. Les raisons de cette différence restent encore floues (Campagnola *et al.*, 2011) mais dans d'autres tissus, en l'occurrence le tendon, cette différence d'aspect est reliée à la rétrodiffusion plus ou moins importante suivant l'épaisseur de l'échantillon (Légaré *et al.*, 2007). Pour des applications

12 : les images de travaux d'IGSH en transmission montrent souvent de nombreuses structures fibrillaires. Il ne faut cependant pas oublier que ces fibres apparentes sont forcément des lamelles vu les dimensions connues des fibrilles (chap. 3.4.3). Par ailleurs la résolution axiale des lamelles de collagène peut être due à un espace réel entre elles, mais la figure 3.9 les présente, dans cette zone, accolées, et dans ce cas, elles ne pourraient être résolues que par polarisation.

cliniques ce défaut relatif pourrait cependant être compensé par les jeux de polarisation de la fondamentale ou même son angle d'incidence (Morishige *et al.*, 2006).

### 3.5 Conclusion

Nous avons vu tout l'intérêt de l'IGSH pour apporter, à l'échelle microscopique, l'information que les méthodes «classique » ne peuvent apporter séparément. Cette force de l'IGSH s'appuie notamment sur le collagène dont les propriétés chimiques permettent de justifier la qualité du signal de SH. Nous avons également vu que la SH est un signal riche de par sa caractéristique cohérente et que son émission dépend grandement des conditions de mise en faisceau et de structure de l'échantillon. Tous ces points justifient d'ailleurs que l'expérience acquise sur l'IGSH de la cornée depuis plus de deux décennies, permettent à cette méthode de remplacer progressivement les imageries conventionnelles pour les études cliniques.

La GTH partage justement de nombreuses caractéristiques avec la GSH tout en ayant un jeu de contraste fort différent et nous allons voir dans le chapitre suivant ce que la TH est susceptible de révéler en microscopie biologique et comment elle trouve un intérêt particulier d'application pour l'imagerie ophtalmique cornéenne.

## 4 THEORIE ET ETAT DE L'ART EN MICROSCOPIE GTH

Dans ce chapitre nous allons décrire la théorie autour de la microscopie de GTH. Le plan suit donc celui développé dans le chapitre de la GSH, cependant de nombreux concepts importants, comme l'accord de phase ont déjà été développés et n'ont pas besoin d'être réexpliqués autant en détail ici. Comme nous l'avons vu pour la GSH, le signal de GTH est lui aussi très variable en fonction de la géométrie de l'échantillon de fait de la nature cohérente de ces phénomènes. Une géométrie particulière est cependant relativement facile à décrire théoriquement : il s'agit d'une interface plane séparant deux milieux différant soit par leur indice de réfraction ou leur susceptibilité non linéaire d'ordre trois. Nous verrons quelle est alors l'expression du signal de GTH dans cette situation, situation que l'on peut par ailleurs retrouver dans la cornée puisque celle-ci est organisée, comme nous le savons, sous forme de strates. Enfin, nous verrons à la fin de ce chapitre quelle recherche a déjà été faite sur les applications de l'imagerie par TH en biologie et comment sur la base de ces travaux nous avons estimé que cette méthode pouvait également avoir son intérêt pour l'observation de la cornée.

### 4.1 Phénomènes d'optique non linéaire du troisième ordre

La première observation du phénomène de GTH eut lieu dans la calcite (Terhune *et al.*, 1962). L'expérience qui fut réalisée sous faisceau laser focalisé (limite paraxiale) fut doublement intéressante car elle offrit, après la première expérience de GSH de Franken *et al.* (1961) dans le quartz cristallin, donc non centrosymétrique, l'occasion d'observer la GSH dans un matériau isotrope, la calcite, sur les interfaces du matériau donnant ainsi lieu à la recherche sur la GSH de surfaces. Mais cette même expérience de Terhune *et al.* (1962) permit également d'observer, toujours sous les mêmes conditions de focalisation, la GTH dans le cristal de calcite polarisé par un champ électrique constant le rendant ainsi uniaxe négatif. Il est alors possible de réaliser l'accord de phase pour un certain angle d'incidence. La GTH aux interfaces ne fut pas identifiée dans cet article mais Ward *et al.* (1969) en sondant différents gaz sous faisceau, également focalisé, put la réaliser sur l'interface de la cellule contenant le gaz. En effet Bjorklund *et al.* (1975) donnèrent peu de temps après les conditions de désaccord de phase sur différents

phénomènes de troisième ordre, dont la GTH, ceci nous rappelant ce que nous avons déjà vu en GSH en chapitre 3.3 et plus précisément sur l'équation 46 avec la nécessité d'un désaccord de phase positif pour les faisceaux focalisés. Ainsi ces travaux fondamentaux donnent déjà le cadre quant aux conditions de la GTH et montrent les similitudes avec la GSH.

La GTH étant un phénomène du troisième ordre, les grandeurs associées à la polarisation du matériau à considérer dans ce cas, sont donc respectivement le tenseur  $\gamma$  (hyperpolarisabilité d'ordre 2) pour l'échelle moléculaire et le tenseur  $\chi^{(3)}$  (susceptibilité non-linéaire d'ordre 3) à l'échelle macroscopique. On a alors :

$$\boldsymbol{\mu} = \boldsymbol{\mu}_0 + \boldsymbol{\alpha} : \mathbf{E} + \frac{1}{2} \boldsymbol{\beta} : \mathbf{E}\mathbf{E} + \frac{1}{6} \boldsymbol{\gamma} : \mathbf{E}\mathbf{E}\mathbf{E} + \dots, \quad \text{éq. 55}$$

$$\mathbf{P} = \mathbf{P}_0 + \varepsilon_0 (\boldsymbol{\chi}^{(1)} : \mathbf{E} + \boldsymbol{\chi}^{(2)} : \mathbf{E}\mathbf{E} + \boldsymbol{\chi}^{(3)} : \mathbf{E}\mathbf{E}\mathbf{E} + \dots). \quad \text{éq. 56}$$

Cette fois-ci, dans un phénomène du troisième ordre, quatre ondes interviennent (mélange à quatre ondes). Dans le cas de GTH ce mélange à quatre ondes est dégénéré puisque les trois faisceaux excitateurs sont de même fréquence. La polarisation du troisième ordre, par une combinaison linéaire des différents champs excitateurs, mène ici à un éventail très large de phénomènes possibles puisque 44 combinaisons des fréquences sont possibles. Il est inutile de tous les décrire mais la planche (fig. 4.1) en présente quelques un importants dans le cadre de la microscopie non linéaire.

Suivant la même logique que pour la description des phénomènes de deuxième ordre, en considérant un seul champ excitateur :  $\mathbf{E} = E_0 \cos(\omega t)$  et en ne considérant que la polarisation du troisième ordre, en scalaire, il vient après linéarisation :

$$P^3(t) = \varepsilon_0 \chi^{(3)} \cdot \left( \frac{1}{4} E_0^3 \cos(3\omega t) + \frac{3}{4} E_0^2 \cos(\omega t) \right), \quad \text{éq. 57}$$

Cette expression fait déjà apparaître la GTH (en  $3\omega$ ) et il faut également remarquer le terme

$$\varepsilon_0 \chi^{(3)} \cdot \left( \frac{3}{4} E_0^2 \cos(\omega t) \right).$$

Etant de même fréquence que la fondamentale, ce terme se rajoute au terme linéaire si bien qu'il vient :

$$P_{\omega}(t) = \epsilon_0(\chi^{(1)} + \frac{3}{4}\chi^{(3)}E_0^2).E_0 \cos(\omega t) .$$

Comme pour la susceptibilité linéaire  $\chi^{(1)}$ ,  $\chi^{(3)}$  a un terme résonnant et non-résonnant correspondant respectivement aux parties réelle et imaginaire. Ainsi,  $\chi^{(3)}$  associé à  $\chi^{(1)}$  modifie l'indice de réfraction (terme non résonnant) et change aussi bien la phase temporelle que spatiale de la pulsation d'excitation à  $\omega$ . C'est l'effet Kerr optique. Mais par son terme résonnant,  $\chi^{(3)}$  donne lieu à l'absorption/fluorescence deux photons qui même si elle est associée à  $\chi^{(3)}$  est, comme le montre cette équation fonction de l'intensité d'excitation au carré (Boyd, 2008, Itoh *et al.*, 2009). Par ailleurs, il est possible comme en fluorescence un photon de définir une section efficace (Boyd, 2008, Pena, 2006) :

$$\sigma_2 = \frac{4\pi^2 \hbar \omega^2}{n^2 c^2} Im(\gamma) , \quad \text{éq. 58}$$

où  $\hbar$  est le quantum d'action,  $n$  l'indice de réfraction du milieu et  $Im(\gamma)$  la partie imaginaire de l'hyperpolarisabilité d'ordre 2. L'irradiance en F2P est alors :

$$I_{F2P} = \frac{1}{2} N \eta \sigma_2 I^2 . \quad \text{éq. 59}$$

où  $N$  est le nombre de molécules fluorescentes dans le volume focal,  $\eta$  le rendement quantique de F2P et  $I$  l'irradiance de la fondamentale.

Nous reviendrons plus loin, dans la partie résultat, sur ce thème de la fluorescence deux photons qui a été largement exploitée dans le domaine de la microscopie non linéaire.

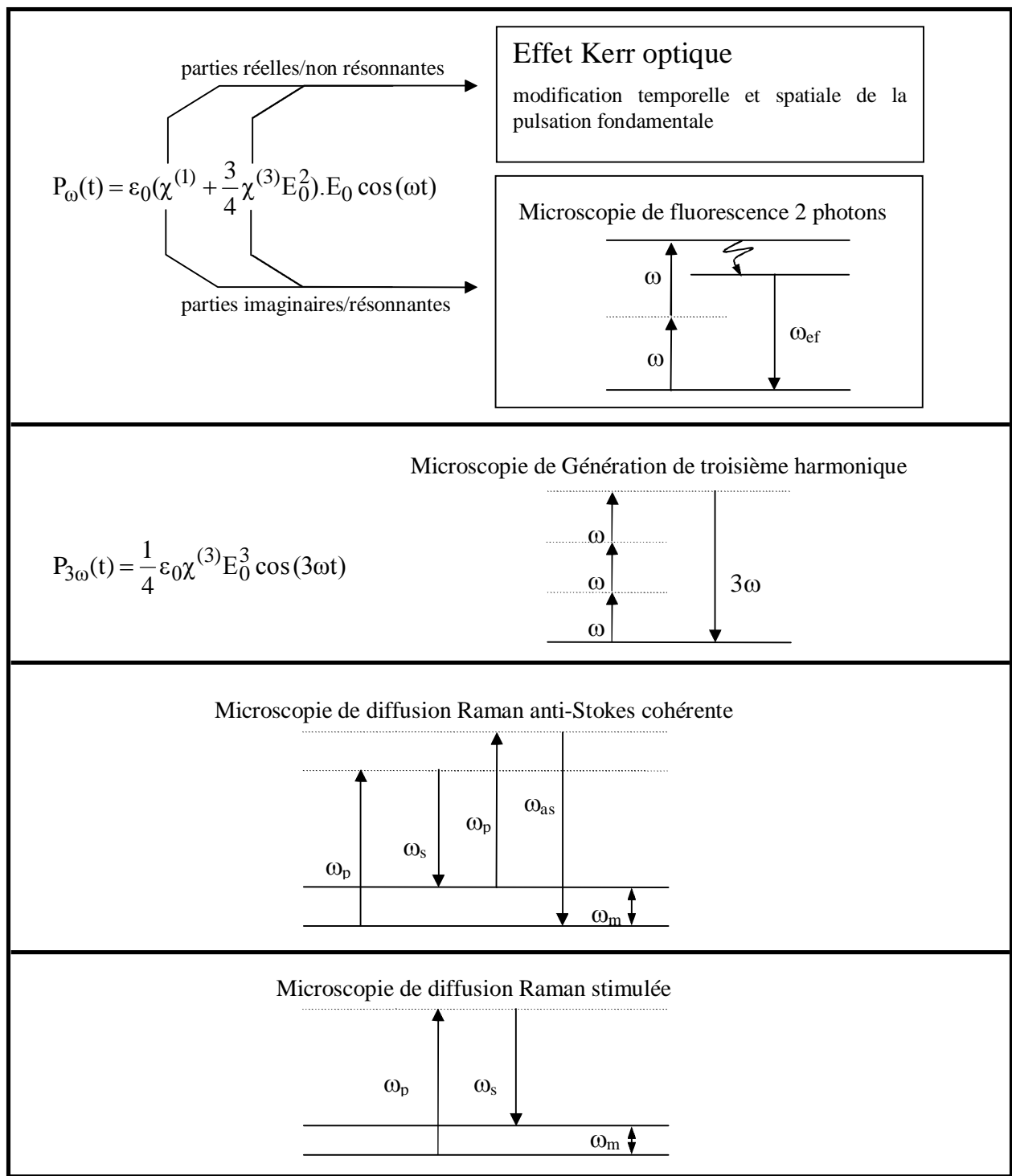
Deux autres phénomènes actuellement exploités en microscopie non linéaires sont la diffusion Raman anti-Stokes cohérente (« Coherent anti-Stokes Raman Scattering », CARS en anglais) et la diffusion Raman stimulée (« Stimulated Raman Scattering », SRS en anglais). Tous les deux s'appuient sur la diffusion Raman mais à la différence de celle-ci, les deux phénomènes non linéaires sont cohérents et nécessitent deux sources d'excitation (OPO, oscillateur) pour sonder la vibration des liaisons chimiques d'intérêt ( $\omega_m$  sur la figure 4.1). L'avantage principal de ces méthodes est d'offrir une dimension spectrométrique à la microscopie non linéaire. Cependant, dans les faits, ces phénomènes restent principalement sensibles à certaines molécules comme les lipides (Le *et al.*, 2010). En CARS, un nouveau signal est créé alors qu'en SRS, il faut mesurer une variation sur l'intensité des deux lasers d'excitation. La microscopie SRS (Saar *et al.*, 2010)

offre l'avantage, sur celle de CARS, de ne pas être sensible au bruit de fond provenant du solvant (eau) : dans la mesure où CARS est un phénomène paramétrique donc sans dissipation, il est moins spécifique que la SRS sur les vibrations moléculaires Raman.

Le phénomène de GTH suit exactement la même logique que nous avons décrite à propos de la GSH. En particulier, le phénomène de GTH n'est possible qu'en considérant un ensemble ordonné de molécules sinon le triplement de fréquence se réalise par la diffusion hyper-rayleigh (Kim *et al.*, 2003, Murzina *et al.*, 2008).

De la même façon que pour la GSH, en dehors des cristaux anisotropes (Miyata, 2010), il est impossible de réaliser l'accord de phase pour la GTH. Comme en GSH, la GTH ne peut donc, dans un milieu homogène isotrope et de dispersion normale, ne se réaliser que sur une longueur de cohérence fonction de la dispersion et de la focalisation.

En GSH, mis à part les valeurs de  $\chi^2$ , les géométries possibles pour la réalisation du signal de SH en microscopie passent, comme conséquence de l'équation 46, par une inhomogénéité du  $\chi^2$  (le stroma l'offre justement par ses lamelles) ou par des interfaces « dopées » de dipôles (expériences sur les membranes cellulaires). En GTH nous allons voir que ces inhomogénéités optiques requises, peuvent soit tenir à  $n$  ou à  $\chi^3$ . Ainsi le tissu biologique offre également un terrain particulièrement propice au contraste de GTH.



**Figure 4.1** Phénomènes d'optique non linéaire du troisième ordre exploités en microscopie

$\omega$  : fréquence fondamentale ;  $\omega_{ef}$  : fréquence d'émission de fluorescence ;  $\omega_p$  : fréquence pompe ;  $\omega_s$  : fréquence Stokes ;  $\omega_{as}$  : fréquence anti-Stokes ;  $\omega_m$  : fréquence de vibration moléculaire.

## 4.2 Génération de troisième harmonique sur une interface

Comme nous l'avons déjà vu en fin de chapitre 3.1, les interfaces jouent, par le fait qu'elles brisent les symétries des matériaux, un rôle important dans la GSH. En GTH, le problème de la centrosymétrie ne se pose pas, la GTH étant liée à un terme impair de la polarisation (démonstration chapitre 3.1) mais il a été montré rapidement par l'expérience que les interfaces pouvaient générer un signal conséquent de TH, pouvant même rivaliser par sa simplicité, avec les méthodes d'accord de phase dans les cristaux anisotropes (Tsang, 1995). C'est plus tard que Barad *et al.* (1997) donneront une explication théorique plus précise à cette nécessité d'une brisure de symétrie par l'interface pour le phénomène de GTH.

Étudions donc plus précisément et dans nos conditions, ce cas particulier de TH générée sur une interface séparant deux milieux d'indices de réfraction ou de susceptibilité non linéaire d'ordre trois différents. Ce développement permet d'établir l'irradiance totale cumulant les contributions de part et d'autres de l'interface et de voir l'importance des caractéristiques optiques ( $n$  et  $\chi^3$ ) sur le signal de TH.

Géométriquement, l'hypothèse est celle d'une interface plane supposée normale à l'axe optique et séparant les deux milieux semi-infini isotropes et homogènes du diélectrique. Cette interface plane est donc perpendiculaire à la direction de propagation  $z$  de l'onde excitatrice supposée gaussienne (fig. 4.2).

Par ailleurs dans ce calcul, les hypothèses suivantes sont posées pour rester dans le même cadre théorique que celui que nous avons développé en GSH (voir le chap. 3.3.1) :

- a) la TH n'est due qu'à la susceptibilité d'ordre 3 : elle ne découle pas d'ordres supérieurs,
- b) les deux milieux étant supposés isotropes, les calculs peuvent se faire en scalaire,
- c) le laser excitateur (fondamentale) est gaussien avant le condenseur et n'est pas diffracté par la pupille arrière de celui-ci,
- d) la fondamentale est également décrite, après le condenseur, par une gaussienne à polarisation rectiligne,
- e) seule l'émission vers l'avant est considérée (nous ne nous intéressons donc pas à la GTH de surface). Cette émission est suffisamment proche de l'axe optique pour supposer que la TH soit également de forme gaussienne,



f) enfin, la fondamentale est supposée suffisamment focalisée pour que, même si la dispersion existe, sa contribution soit négligée (voir plus loin éq. 62). Cette situation est représentée par la figure 3.7 (a).

La solution gaussienne que nous avons posée pour la GSH est aussi possible dans le cas de la GTH<sup>13</sup>. Le raisonnement reste donc le même pour la définition de la dépendance en z de l'amplitude de la TH si bien que l'amplitude totale de TH s'écrit finalement

$$A_3(x, y, z) = \frac{i(3\omega)\chi^{(3)}A_{01}^3}{2n_3\omega c} \frac{1}{\left(1 + \frac{2iz}{b_3}\right)} e^{\frac{-3(x^2+y^2)}{w_0^2\left(1 + \frac{2iz}{b_3}\right)}} J_3(\Delta k, z_0, z) , \quad \text{éq. 60}$$

où

$$E_3(x, y, z, t) = A_3(x, y, z) e^{i(k_3 z - 3\omega t)} .$$

Donc supposé monochromatique.

Donc de la même façon que pour la GSH, il vient :

$$b_3 = b ,$$

$$\text{et } w_{0_3} = \frac{w_{0_1}}{\sqrt{3}} ,$$

où  $w_0$  est le col minimum de la fondamentale et  $b$ , son paramètre confocal.

$$b = \frac{2\pi w_0^2}{\lambda} \text{ et } \lambda = \frac{2\pi c}{n_\omega \omega} ,$$

où  $n_\omega$  est l'indice du milieu à  $\omega$ .

De la même façon que pour la GSH (voir le chap. 3.3.2 éq. 34), la résolution latérale est facile à définir avec ici  $N = 3$  si bien qu'elle vaut :

13 : Encore maintenant (Chang *et al.*, 2010) le modèle gaussien, proposé par Boyd (1968) et repris par Barad *et al.* (1997) en microscopie, de la génération de troisième (ou seconde) harmonique continue à être adopté et donne des résultats similaires aux calculs numériques effectués dans le cadre de la théorie par résolution avec la fonction de Green.

$$\delta r_{\text{GTH}} = \frac{0.52 \cdot \lambda}{\text{ON}(\sqrt{3})} .$$

éq. 61

En revanche, pour la résolution axiale nous allons justement voir maintenant ce qu'elle vaut en développant le modèle gaussien de l'harmonique avec une focalisation prédominante sur la dispersion (cas (a) de la figure 3.7).

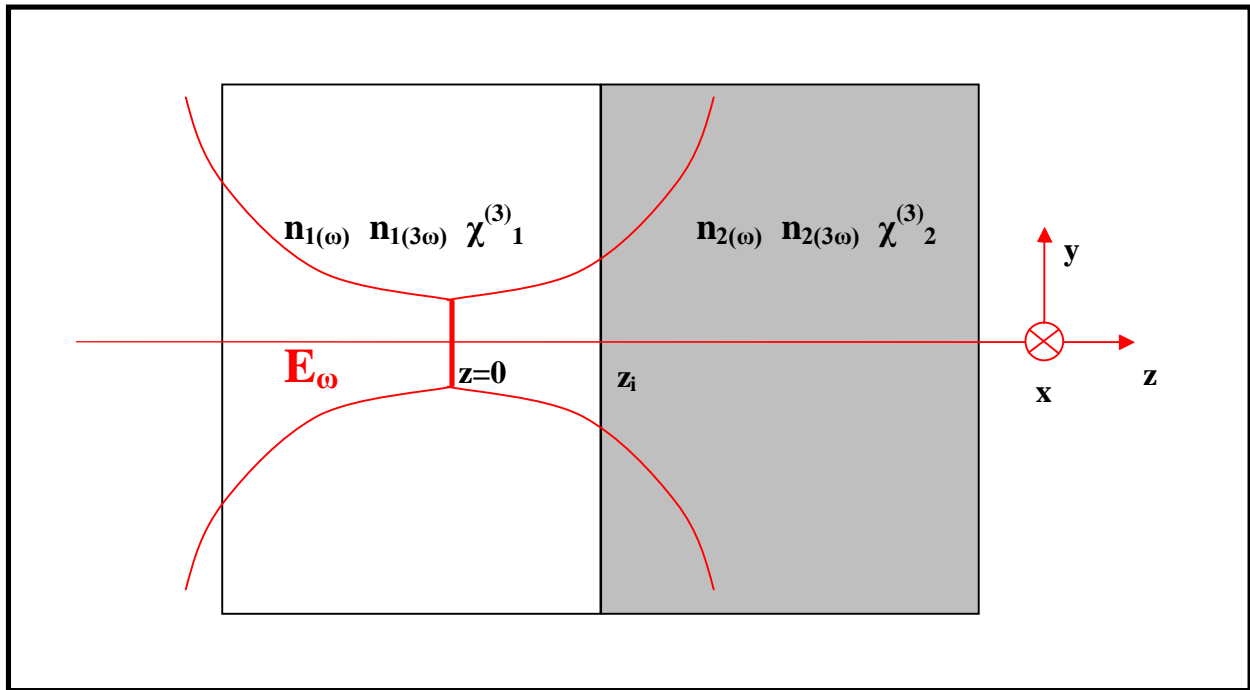


Figure 4.2 Géométrie de l'échantillon à l'interface pour la modélisation de la GTH

$E_\omega$  a son col minimum en  $z=0$ ,  $z$  étant l'axe de propagation. L'interface séparant les deux milieux est perpendiculaire à  $z$  et sa position est en  $z_i$ . Les milieux sont caractérisés dans le cas général, par leur indice de réfraction  $n_{1 \text{ ou } 2}$  à  $\omega$  ou  $3\omega$  et par leur susceptibilité d'ordre 3 :  $\chi^{(3)}_{1 \text{ ou } 2}$ .

Par ailleurs  $J_3$  vaut cette fois :

$$J_3(\Delta k, z_0, z) = \int_{z_0}^z \frac{e^{i\Delta k \cdot z'}}{\left(1 + \frac{2iz'}{b}\right)^2} dz' , \quad \text{éq. 62}$$

où,

$$\Delta k = 3k_1 - k_3 .$$

Comme nous l'avons déjà dit à l'occasion du chapitre 3.3.3 en équation 39, cette intégrale n'est pas résoluble analytiquement. Cependant il est possible de la considérer comme le produit des deux fonctions :

$$f(z') = \frac{1}{\left(1 + \frac{2iz'}{b}\right)^2} .$$

$f(z')$  représente la phase associée à la focalisation

et

$$g(z') = e^{i\Delta k \cdot z'} .$$

$g(z')$  représente le désaccord de phase de la fondamentale et l'harmonique

C'est ici que nous faisons intervenir l'hypothèse f) énoncée plus haut : si la dispersion est négligeable devant la focalisation alors la périodicité de  $g(z')$  (longueur de cohérence  $l_c$ ) tend vers l'infini :  $g(z')$  est supposée constante et vaut 1. Cette approximation est valable dans notre cas puisque justement nous avons travaillé à une  $ON = 0.9$  ce qui implique que  $f(z')$  varie sur une échelle d'environ  $2 \mu\text{m}$ , la longueur confocale, lorsque la longueur de cohérence dans l'eau est d'environ  $20 \mu\text{m}$  pour une fondamentale de  $1064 \text{ nm}$  (Débarre *et al.*, 2007a). La suite du développement mathématique menant à l'intensité totale est mise en annexe B.

L'équation 65 à la fin de cette annexe B, exprimant l'intensité de GTH dans ces hypothèses optiques et géométriques, montre que si l'un des deux milieux est du vide, sa susceptibilité d'ordre trois  $\chi^{(3)}$  étant nulle, il ne reste plus que le terme 1 ou le terme 2 et le terme d'interférence résultant des produits croisés entre les deux milieux est lui aussi annulé. Dans ce cas, il est facile

de remarquer combien l'interface, par le biais de la variable  $\zeta_{1ou2}^i$  contenant  $z_i$ , est nécessaire pour générer le signal : lorsque celle-ci s'éloigne à l'infini, comme ce serait le cas dans un matériau homogène, l'irradiance de TH tend bien vers zéro. Par ailleurs, pour la position de l'interface fixée, le signal de TH décroît comme l'inverse au carré de  $z$  (variable  $\zeta_{1ou2}$ ).

L'irradiance totale au niveau du col et pour l'interface à la position du col ( $I_{T_{w,itw}}$ ) ( $r, \zeta_{1ou2}$  et  $\zeta_{1ou2}^i = 0$ ) a pour expression d'après l'équation 65 :

$$I_{T_{w,itw}} = \left( \frac{1}{2} n_{2(3\omega)} \varepsilon_0 c \right) \cdot \left[ \left( t_{1/2}^{3\omega} \frac{3w_0^2 \omega^2 n_{1(\omega)}}{4n_{1(3\omega)} c^2} \chi_1^{(3)} A_{0_1}^3 \right)^2 + \left( t_{1/2}^{3\omega} \frac{3w_0^2 \omega^2 n_{2(\omega)}}{4n_{2(3\omega)} c^2} \chi_2^{(3)} A_{0_1}^3 \right)^2 - \left( 2 \left( t_{1/2}^{3\omega} \right)^2 \frac{3w_0^2 \omega^2 n_{1(\omega)}}{4n_{1(3\omega)} c^2} \chi_1^{(3)} \frac{3w_0^2 \omega^2 n_{2(\omega)}}{4n_{2(3\omega)} c^2} \chi_2^{(3)} A_{0_1}^6 \right) \right],$$

ou encore :

$$I_{T_{w,itw}} = \left( \frac{1}{2} n_{2(3\omega)} \varepsilon_0 c \right) \cdot \left( t_{1/2}^{3\omega} \frac{3w_0^2 \omega^2}{4c^2} A_{0_1}^3 \right)^2 \cdot \left[ \frac{n_{1(\omega)}}{n_{1(3\omega)}} \chi_1^{(3)} - \frac{n_{2(\omega)}}{n_{2(3\omega)}} \chi_2^{(3)} \right]^2. \quad \text{éq. 66}$$

Ainsi l'irradiance en transmission est dépendante sur les caractéristiques du matériau de la différence au carré des termes  $\frac{n_{1,2(\omega)}}{n_{1,2(3\omega)}} \chi_{1,2}^{(3)}$  et aussi de  $\left( t_{1/2}^{3\omega} \right)^2 = \left( \frac{2n_1}{n_1 + n_2} \right)^2$ .

En particulier, si les deux milieux ont le même indice de réfraction, l'irradiance n'est fonction que de la différence au carré des  $\chi^3$ .

Ainsi ce développement mathématique montre que l'interface, ou plus largement une inhomogénéité optique, est nécessaire pour générer le signal de TH avec un faisceau focalisé :

même dans le cas général il y a cette dépendance en  $\frac{1}{1 + \left( \zeta_1^i \right)^2}$  sur les trois termes. Ainsi, le signal

de TH n'est pas généré dans un milieu homogène isotrope. D'ailleurs même si l'accord de phase

réduit est validé, i.e.  $\Delta k = 3k_1 - k_3 = 0$  la TH ne peut pas être générée sous faisceau focalisé : nous avons fait l'hypothèse que la dispersion était négligeable devant la focalisation mais nous aurions aussi pu dire que nous ne prenions pas en compte le terme  $\exp(i\Delta k.z')$  de l'équation 62 en imaginant un cristal permettant  $\Delta k = 0$ . Enfin, et ceci quel que soit la situation, plus le désaccord de phase est négatif, en fonction de la direction de propagation de la fondamentale, et moins le signal est fort : dans notre cas d'interface entre deux milieux diélectriques homogènes et isotropes, le désaccord de phase réduit est déjà négatif mais il est minimum pour une émission dirigée vers l'avant.

Seule une onde parfaitement plane permettrait cette génération en bulk sous cette condition de  $\Delta k = 0$ .

Ainsi pour pouvoir générer la TH en bulk avec un faisceau gaussien, donc avec focalisation, il faut comme nous l'avons déjà introduit avec le chapitre de SH avoir un désaccord de phase positif si nous considérons l'accord de phase réduit ou, formulé autrement, annuler l'accord de phase incluant le vecteur de Gouy. Cette situation est possible avec l'utilisation adéquate d'un cristal uniaxe ayant une forte biréfringence comme la calcite (Oron *et al.*, 2003).

### Résolution axiale

Pour la déterminer, nous pouvons considérer le cas simple où l'une des susceptibilités est nulle.

Si  $\chi_2^{(3)}$  est nul, alors il reste :

$$I_{TH} = \frac{1}{2} n_{2(3\omega)} \epsilon_0 c \cdot \left( t_{1/2}^{3\omega} \frac{3w_0^2 \omega^2 n_{1(\omega)}}{4n_{1(3\omega)} c^2} \chi_1^{(3)} A_{0i}^3 \frac{1}{(1 + (\zeta_1^i)^2)} \frac{1}{(1 + (\zeta_1)^2)} e^{\frac{-2r^2}{w_0^2 (1 + \zeta_1^2)}} \right).$$

Pour faire une mesure de la résolution axiale il faut faire un balayage suivant  $z_i$ . Ainsi pour  $z$  et  $r$

fixés, le signal est fonction de  $\frac{1}{1 + (\zeta_1^i)^2}$  qui est une fonction lorentzienne de caractéristique

largeur à mi-hauteur  $b$ .

Ainsi la résolution axiale pour la TH dans le modèle gaussien, avec  $\Delta kb \ll 1$ , vaut théoriquement le paramètre confocal. Exprimée en fonction de l'ouverture numérique ( $ON = n_{im} \sin \alpha$ ) elle est (voir le chap. 3.3.2 2) :

$$\delta z_{TH} = \frac{0.76 \cdot \lambda_{ex}}{n_{im} (1 - \cos(\alpha))} .$$

Pour conclure cette partie théorique, rappelons que la géométrie que nous décrivons ici est très simple (interface entre deux milieux homogènes isotropes) et que les considérations que nous avons déjà évoquées en GSH (voir les chap. 3.3.3 et 3.4.1 « Émission en arrière des harmoniques ») restent évidemment valables dans le cadre de la théorie de la GTH sur l'expression du désaccord de phase : influence de la mise en forme du faisceau (Carrasco *et al.*, 2006, Olivier *et al.*, 2008), possibilité d'émission directe vers l'arrière en fonction de la taille de l'échantillon ou de sa périodicité spatiale relativement à la longueur focale (C.-F. Chang *et al.*, 2010a, Débarre *et al.*, 2007b, Débarre *et al.*, 2005). Les dimensions sur lesquelles est générée l'harmonique (compromis entre  $b$  et  $l_c$ ) et donc la résolution, sont donc fonction de ces caractéristiques.

### 4.3 Application de la microscopie de GTH à la biomédecine

#### 4.3.1 Une microscopie particulièrement adaptée aux tissus frais

La GTH possède les mêmes avantages que la GSH endogène et c'est naturellement que la microscopie de GTH s'est inscrite dans le prolongement des travaux en microscopie non linéaire cohérente. Ainsi l'imagerie de GTH (IGTH) :

- est une méthode relativement simple : elle s'appuie sur la microscopie laser mais ne nécessite pas de composant supplémentaire comme en microscopie confocale (filtres spatiaux, disque de Nipkow...), elle ne nécessite qu'un oscillateur lorsque d'autres méthodes demandent des sources plus complexes (OPO pour CARS et SRS) ;
- ne nécessite pas de marqueur. Le contraste de l'IGTH est donc endogène, ce qui limite les problèmes physiologiques posés par l'introduction du fluorophores et parfois de sa molécule porteuse (immunofluorescence) ;

- est une interaction élastique et n'implique donc pas, sous un certain seuil d'irradiance, les problèmes posés par l'absorption : photoblanchiment, phototoxicité, photodommages...

Nous reviendrons plus en détail sur ce point dans le chapitre 5.2.2 6) « dommages laser potentiels sur l'échantillon » mais c'est aussi pour cette même raison que les observations en microscopie de génération d'harmoniques peuvent être plus longues contrairement à celle réalisées en microscopie confocale.

Ainsi l'IGTH :

- a une certaine liberté sur la longueur d'excitation, n'en étant que peu dépendante ;
- permet l'excitation dans l'IR et donc une plus grande pénétration que dans le visible ;
- offre une haute résolution spatiale naturellement (sans système confocal) assurant une observation 3D facilitée jusqu'à l'échelle cellulaire ;
- repose sur un signal cohérent et sensible à la polarisation de la fondamentale permettant de sonder les orientations des structures de l'échantillon sondé (Chu *et al.*, 2004, Oron *et al.*, 2003).

Cependant, contrairement à l'IGSH avec le collagène fibrillaire, l'IGTH ne requiert pas de molécule particulière pour donner un signal.

En IGTH, les seules conditions sur le matériau sont celles des inhomogénéités optiques en ( $\chi^{(3)}$  et/ou  $n$ ). Ce mécanisme de contraste n'empêche pas que certaines molécules donnent un contraste plus fort comme les lipides qui justement, ont un couple  $\chi^{(3)}$  et  $n$ , bien différent de celui de l'eau (Débarre *et al.*, 2006).

C'est donc naturellement que l'IGTH s'est invitée dans les méthodes d'imagerie en biologie. En effet les tissus biologiques présentent un défi de contraste : les cellules sont bien souvent transparentes par leur composition principale en eau et leur inhomogénéité tient justement bien plus à des variations de caractéristiques optiques de réfraction que d'absorption. Par ailleurs les lipides qui sont présents dans les membranes cellulaires (M. Muller *et al.*, 1998, Squier *et al.*, 1998) permettent de révéler par la GTH facilement les contours exacts de la cellule même si le signal peut aussi révéler les inhomogénéités intracellulaires (Barzda *et al.*, 2005, Hsieh *et al.*, 2008, Yelin *et al.*, 1999). En revanche les fluorophores endogènes (voir le chap. 6.1) ne sont présents qu'à l'intérieur de la cellule et ne sont donc pas toujours aussi fiables

morphologiquement. Des méthodes d'observation existent déjà pour imager des tissus frais et nous avons eu l'occasion d'en parler déjà un peu plus tôt dans le chapitre consacré aux méthodes cliniques utilisées en ophtalmologie cornéenne. Cependant comme nous l'avons vu précédemment dans la théorie de la GTH, l'irradiance de la GTH s'appuie sur l'indice de réfraction mais également sur la susceptibilité non linéaire d'ordre 3 et c'est justement cette particularité qui offre un grand intérêt à cette méthode, lui offrant un jeu de contraste supplémentaire par rapport à l'imagerie exploitant l'optique linéaire.

Les articles fondateurs de l'IGTH ont justement porté sur des études avec un objet à imager, immergé dans un milieu ayant un indice de réfraction très proche de lui (Barad *et al.*, 1997, M. Muller *et al.*, 1998). L'objet en question était une lamelle de verre présentée perpendiculairement à l'axe optique et immergée dans une huile pour microscope. Les deux matériaux ont alors le même indice de réfraction à la troisième décimale (1.516) (Barad *et al.*, 1997) et suivent la même tendance de dispersion (Cargile, 2012). Ainsi l'interface huile-verre parvient à générer car les deux matériaux ont en fait une susceptibilité non linéaire d'ordre 3 différente. L'IGTH s'appuie sur cette caractéristique supplémentaire du matériau mais une autre différence avec les méthodes de contraste de phase en optique linéaire tient aussi au fait que la seule interface suffise en microscopie de GTH alors que les microscopies linéaires fondent leur signal sur la différence de phase accumulée entre les deux milieux (M. Muller *et al.*, 1998).

C'est à partir de ce constat que cette microscopie de GTH était particulièrement adaptée à l'observation des matériaux transparents, que des recherches se sont penchées sur les applications de l'IGTH à la biologie. Les premiers travaux associés à cet effort ont été réalisés sur des coupes fraîches de feuille et permettaient de voir les cellules végétales et leurs chloroplastes (M. Muller *et al.*, 1998) ou d'autres organelles de dimensions sub-microniques pour d'autres cellules (Barzda *et al.*, 2005, Hsieh *et al.*, 2008, Yelin *et al.*, 1999). Dans le chapitre de résultat d'IGSH/IGTH comme outil d'observation anatomique de la cornée (voir le chap. 6.1) nous verrons par ailleurs pourquoi la GTH offre une alternative intéressante à la microscopie F2P pour notre application.

Rapidement à partir des années 2000 les applications biomédicales ont donc commencé à se diversifier pour explorer l'imagerie cellulaire en général dans différents tissus. Parmi ces applications, nous pouvons citer l'IGTH sur la peau (Tai *et al.*, 2005, Tsai *et al.*, 2006), les muscles (Chu *et al.*, 2004, Rehberg *et al.*, 2011), les globules rouges (Millard *et al.*, 1999).



Egalement de nombreux travaux ont exploré l'embryologie dans la mesure où la GTH offrait, par sa sensibilité à la diffusion réduite dans l'IR et sa haute résolution spatiale, la possibilité d'observer l'organisation et la dynamique cellulaire sur la totalité d'un embryon animal (Chu *et al.*, 2003, Débarre *et al.*, 2006, Tserevelakis *et al.*, 2010, Tserevelakis *et al.*, 2011). C'est aussi à l'occasion de ces études que l'innocuité de la GTH a pu être vérifiée en suivant le développement de l'embryon.

A présent la microscopie GTH s'immisce même en neuroscience pour palier au manque de résolution spatiales des imageries traditionnelles d'IRM (imagerie par résonance magnétique) et scintigraphie (Farrar *et al.*, 2011). Par ailleurs, la sensibilité de la GTH aux lipides en fait un outil de choix pour la détection des variations de myéline dans les maladies neurodégénératives (Farrar *et al.*, 2011).

#### **4.3.2 Microscopie GTH en ophtalmologie**

Enfin, la cornée n'avait pas été imagée en microscopie GTH avant nous mais plus généralement l'IGSH et l'IGTH avaient été couplées pour imager la rétine chez un embryon (Sun *et al.*, 2004). Par ailleurs, la GTH donne un fort signal sur l'élastine et permet, dans la sclère, d'observer sa prolifération pathologique (élastose) au sein du réseau de collagène qui, lui, est révélé par la GSH (Sun *et al.*, 2007).

Cependant, le collagène fibrillaire avait déjà été observé dans d'autres tissus (McConnell, 2007, Tai *et al.*, 2005) par l'IGTH et ces travaux précédents étaient également porteurs d'intérêt pour ce que ce signal pouvait révéler dans le stroma cornéen, en plus des couches cellulaires.

#### 4.4 Conclusion

Ainsi, comme nous le verrons avec le chapitre 6 de résultat sur l'anatomie de la cornée, cet organe offre un terrain particulièrement propice à l'imagerie de GTH, puisque justement son tissu est particulièrement transparent tout en étant structuré sous forme de couches impliquant de nombreuses interfaces optiques. Par ailleurs, la structure complexe protéique de la cornée qui est composée de subtils changements du collagène que ce soit au sein d'une même couche comme dans le stroma ou entre différentes couches (stroma et membrane de Descemet) peut en plus, de la composante cellulaire, être *a priori* décodée par l'IGTH. Comme nous le verrons aussi sur les résultats de chirurgie cornéenne (voir le chap. 8), la combinaison IGSH et IF2P ne permettrait pas non plus de mettre en évidence la coupe intrastromale lamellaire comme peut le faire l'IGTH.

## 5 OBJECTIFS ET METHODOLOGIES

Dans ce chapitre nous allons développer toute l'instrumentation associée au microscope qui a été conçu dans le cadre du doctorat du laser femtoseconde au système d'acquisition et de traitement des images de génération d'harmoniques. C'est aussi dans ce chapitre que nous aborderons la question des dommages laser possibles pour ce type d'imagerie non linéaire cohérent. Nous vérifierons justement que nous avons toujours travaillé dans cette marge de sécurité. Nous présenterons aussi des expériences nous ayant permis de vérifier que la résolution spatiale en IGTH obtenue concordait avec celle prévue par notre modèle théorique décrit dans le chapitre 4.

### 5.1 Méthodologie, objectifs et démarche

Méthodologiquement l'instrument devait répondre aux trois axes de recherche qui sont présentés dans les résultats plus loin dans le mémoire : imagerie pour l'anatomie, imagerie pour la chirurgie et imagerie pour les greffes cornéennes/tissu reconstruit. Pour décrire l'anatomie de la cornée ou faire l'imagerie des incisions chirurgicales, sur le plan macroscopique, il fallait pouvoir balayer sans restriction de distance, les échantillons utilisés. En effet ceux-ci pouvaient présenter une très grande variabilité quant à leur épaisseur et si certains étaient plus conventionnels sur le plan de l'observation microscopique (tissu reconstruit en boîte de Petri) d'autres ont requis un montage qui n'aurait pas pu être réalisé facilement dans un microscope commercial biologique. Le jeu des deux balayages optiques ou échantillons décrit plus loin, nous a permis d'explorer ces différentes échelles et d'approcher des conditions expérimentales proches de l'*in vivo* qui représente le but ultime en génie biomédical. Le balayage échantillon a permis d'acquérir des images transversales de la cornée sur de grandes distances. Le balayage optique s'est révélé particulièrement intéressant lorsque nous avons voulu explorer plus en détail la structure de la cornée reconstruite. Cette problématique de la variabilité des épaisseurs d'échantillons nous a également amené à penser des solutions particulières pour la détection en transmission.

Par ailleurs, l'un des grands enjeux de cette imagerie non linéaire de la cornée était de savoir si nous pouvions réaliser l'épi-détection avec des niveaux de signal en SH ou TH qui nous permettent de voir les mêmes structures cornéennes qu'en transmission où le signal est plus fort.

Cette question est cruciale dès lors que le projet implique des ambitions cliniques en imagerie médicale optiques comme nous avons déjà eu l'occasion d'en parler à l'occasion du passage « concept d'épi-détection » dans le chapitre 2.2.1. Notre montage et les expériences que nous avons menées ont montré que rien ne s'opposait fondamentalement à ce que cette détection soit réalisable et le passage à une instrumentation clinique serait donc concevable moyennant une optimisation de la détection pour permettre un plus grand rapport signal sur bruit.

Enfin, nous n'étions pas particulièrement intéressés à réaliser des expériences résolues en polarisation car nous ne tenions pas spécialement à explorer la structure fine du stroma cornéen. Cependant cette recherche est comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, très active et il serait intéressant d'implémenter sur notre système les composants associés, pour approfondir plus spécifiquement les problématiques qu'offre cette couche cornéenne.

## **5.2 Description du microscope et de son instrumentation associée**

Les trois planches sur les pages suivantes donnent la vue d'ensemble du montage expérimental. Ainsi celui-ci peut être décomposé en trois grandes parties qui sont :

- la source laser,
- le microscope lui-même,
- l'électronique et l'informatique pour réaliser la détection, l'acquisition et le traitement des images.

Dans ce chapitre nous décrirons donc successivement ces différentes composantes dans l'ordre logique depuis la source jusqu'à la production des images de microscopie d'harmoniques. Nous expliquerons aussi la raison des choix associés à ce matériel opto-électronique et développerons lorsqu'il y a eu lieu de le faire sa caractérisation.

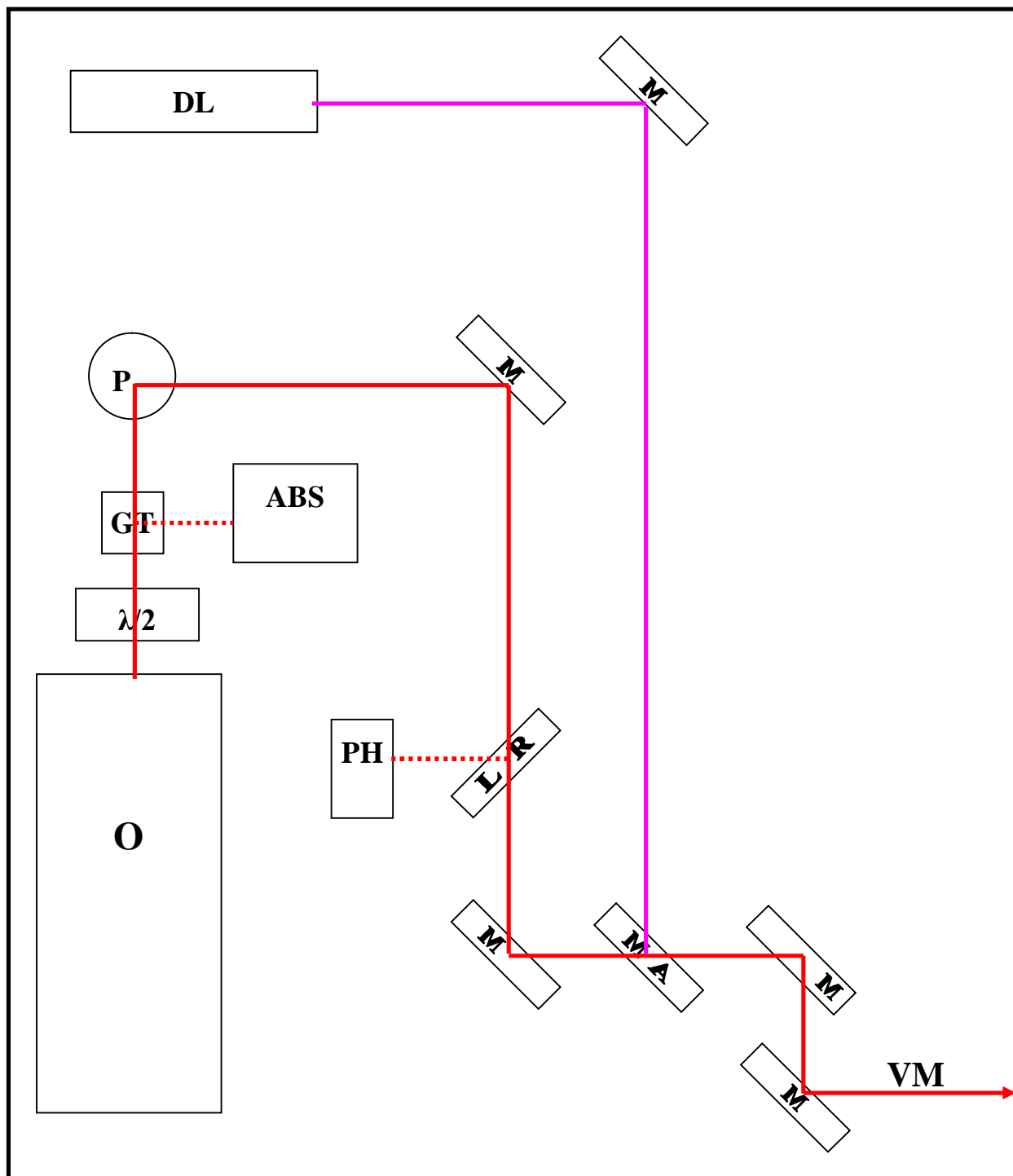


Figure 5.1 Source laser et alignement (vue d'au-dessus)

O : oscillateur YbKGW ; DL : diode laser ; GT : polariseur Glan-Taylor ; ABS : absorbeur du faisceau restant du GT ; P : périscope ; M : miroirs ; L R : lame réfléchissante amovible pour contrôler le train d'impulsion sur

photodiode ; PH : photodiode ; M A : miroir amovible pour l'alignement avec la DL ; VM : vers le microscope.

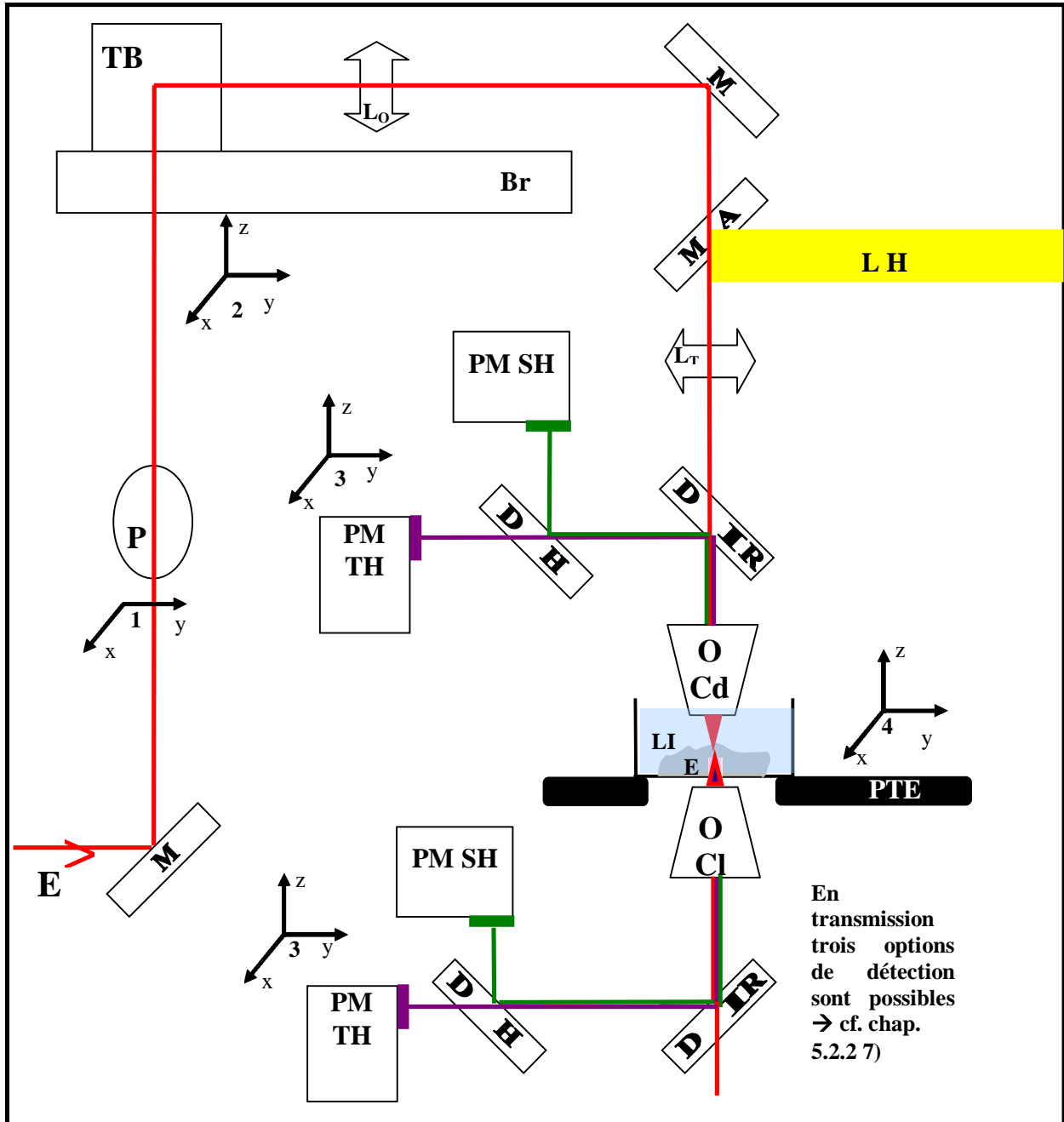
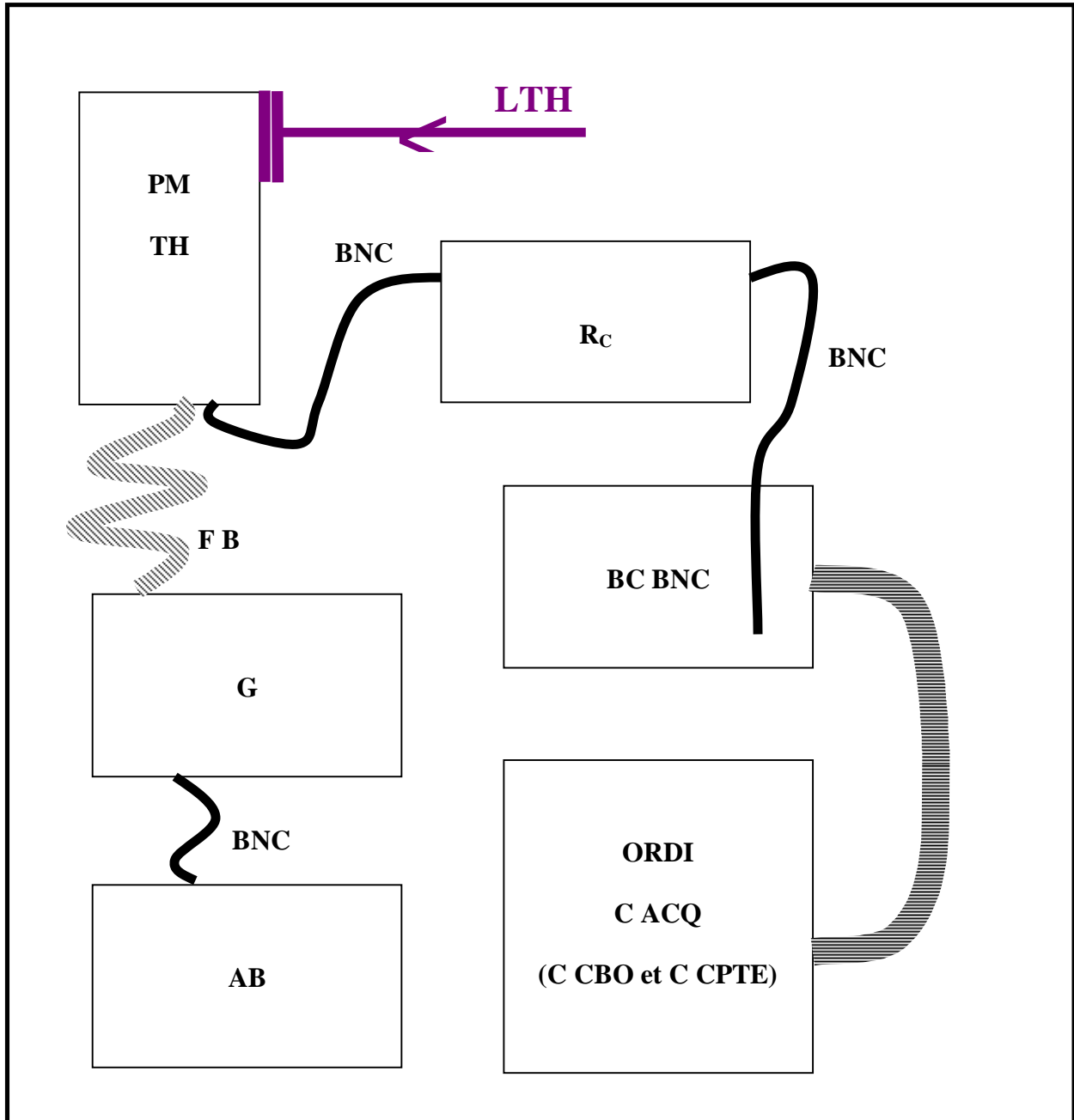


Figure 5.2 Microscope (vu de profil)

E : entrée du faisceau excitateur ; M : miroirs ; P : périscope ; TB : Tête de Balayage ; Br : Breadboard ; L<sub>0</sub> : lentille oculaire ; M A : miroir amovible pour éclairage par lampe halogène (LH) ; L<sub>T</sub> : lentille de tube ; D : miroirs dichroïques entre harmoniques (H) et harmoniques et IR (IR) ; PM : photomultiplicateurs pour SH ou TH ; O Cd : objectif condenseur ; LI : liquide d'immersion ; E : échantillon ; O Cl : objectif collecteur ; PTE : platines de

translation pour l'échantillon. Les repères x,y,z (identifiés par un chiffre) indiquent une translation possible manuelle ou automatique. Pour les PMs, le même système de translation les porte en transmission et épi-détection.



**Figure 5.3** Détection et acquisition

LTH : lumière TH déjà en partie filtrée par le dichroïque pour les deux harmoniques. PM : photomultiplicateur avec deux filtres passe-bande collés sur sa fenêtre pour filtrer complètement la TH ; A B : alimentation du PM blindée ; BNC : câbles BNC ; G : boîtier de réglage du gain blindé pour le PM ; F B : fils pour le contrôle du gain du PM entourés d'un blindage torsadé ;  $R_c$  : résistance de charge (1 ou 10 M $\Omega$ ) ; BC BNC : boîtier de connexion BNC pour

les différents canaux de détection ; ORDI et C ACQ : ordinateur et carte d'acquisition. Par ailleurs C CBO et C PTE sont respectivement les cartes de contrôle pour le balayage optique et pour les platines de translation de l'échantillon.

### 5.2.1 Source laser

#### 1) Choix de la source :

Principalement un laser ayant pour application la microscopie non linéaire doit avoir deux caractéristiques :

- impulsions courtes  $\rightarrow$  régime femtoseconde,
- longueur d'onde dans le proche IR.

Par rapport au premier point, nous avons vu dans la théorie de la génération d'harmoniques que le signal est en  $1/\tau$  pour la SH et en  $1/\tau^2$  pour la TH. Par ailleurs travailler avec un oscillateur à taux de répétition élevé, pour une valeur de puissance moyenne fixée, permet d'avoir des impulsions qui chacune, sont de faible énergie et ne risquent pas de tomber dans les phénomènes recherchés de coupe laser. La condition d'avoir une irradiance élevée de la fondamentale pour générer les harmoniques facilement est donc bien remplie avec les impulsions femtosecondes et en même temps la puissance moyenne de la fondamentale peut rester relativement basse pour ne pas endommager l'échantillon.

Sur le second point, l'intérêt pour le proche IR s'explique pour deux raisons. La première est liée à la diffusion : quel que soit le modèle considéré (diffusion de Mie ou Rayleigh), la diffusion devient moins conséquente pour de plus longues longueurs d'onde. Or ceci est appréciable en microscopie, car si la diffusion est limitée alors la fondamentale peut continuer à être focalisée à des profondeurs plus importantes tout en conservant sa puissance et sa qualité qu'elle avait en surface de l'échantillon (Ntziachristos, 2010). Le focus en reste d'autant meilleur (son élargissement est limité) et permet de conserver une bonne résolution spatiale.

Le second intérêt à travailler dans le proche IR tient au fait qu'au-dessus de 700 nm et jusqu'à 1300 nm, l'absorption de l'eau est minimale : c'est ce qui est appelé la « fenêtre de transparence ». Au-dessus de 1300 nm des bandes d'absorptions de l'eau sont excitées et peuvent causer des échauffements locaux du tissu (Campagnola, 2008), ce qui majore l'IR exploitable. Comme les milieux biologiques sont justement constitués principalement d'eau, travailler dans cette région est un bénéfice appréciable. Cependant, travailler à 800 nm, comme peut l'offrir un oscillateur



Ti:Sa est dur si l'imagerie doit exploiter la TH, dans la mesure où celle-ci est générée dans ce cas à environ 266 nm (UV-C) : les tissus sondés autant que les optiques, si celles-ci ne sont pas traitées spécifiquement pour cet UV lointain, absorbent beaucoup et laissent au final peu de signal à détecter. En biologie cet UV-C est par ailleurs fortement toxique même si les harmoniques sont émises à des puissances très faibles. Par ailleurs, la diffusion est forcément très importante à de telles longueurs d'onde. Enfin, comme nous le verrons plus loin dans la discussion sur les dommages laser (voir le chap. 5.2.2 6)), ceux-ci viennent aussi du fait que des fluorophores endogènes sont susceptibles d'absorber en deux photons dans un IR trop proche (justement celui du Ti:Sa) et donc d'induire une phototoxicité.

Le laser que nous avons donc choisi définitivement pour nos études est l'oscillateur t-pulse, commercialisé par la société Amplitude Système (France), et est décrit ci-après.

## **2) Oscillateur t-pulse :**

L'oscillateur t-pulse est basé sur un milieu de gain Yb:KGW. La matrice est le cristal de tungstate de potassium et de gadolinium ( $\text{KGd}(\text{WO}_4)_2$  ou KGW). Le dopant est l'ion Ytterbium faisant partie de la famille des terres rares. Sa largeur spectrale de fluorescence autour de 1030 nm est suffisamment large pour lui permettre d'amplifier des impulsions brèves dont fs. Son spectre d'absorption autour de 980 nm et sa section efficace conséquente lui permet d'être pompé efficacement par un laser diode. La faible différence entre la longueur d'onde de pompe et celle de l'émission laser permet d'expliquer la faible déperdition thermique dans le cristal. La figure 5.4 présente le diagramme de Jablonsky de l'Ytterbium. La figure 5.5 présente les principaux composants de l'oscillateur.

Parmi eux, il faut remarquer :

- le miroir SESAM (SEmiconductor Saturable Absorber Mirror) : ce miroir semi-conducteur à absorbant saturable est le composant qui permet d'assurer la création des impulsions ultrabrèves fs. Ce miroir non linéaire a un coefficient de réflexion qui augmente avec l'irradiance incidente. Par ailleurs, le rayonnement laser doit concilier la gamme spectrale permise par le gain du cristal dopé avec les modes longitudinaux permis par la cavité du laser. Le miroir SESAM va sélectionner, par son principe de réflexion non linéaire, que les modes les plus intenses au détriment des autres. Il réalise le blocage de modes de façon passive. Rapidement, le laser atteint un état d'équilibre où une seule

impulsion de très grande intensité et de courte durée circule dans la cavité laser. A chaque aller-retour, lors de sa réflexion sur le coupleur de sortie, une partie de cette impulsion est extraite et constitue le rayonnement émis, qui est donc constitué d'un train d'impulsions, séparées temporellement par la durée d'un aller-retour dans la cavité ;

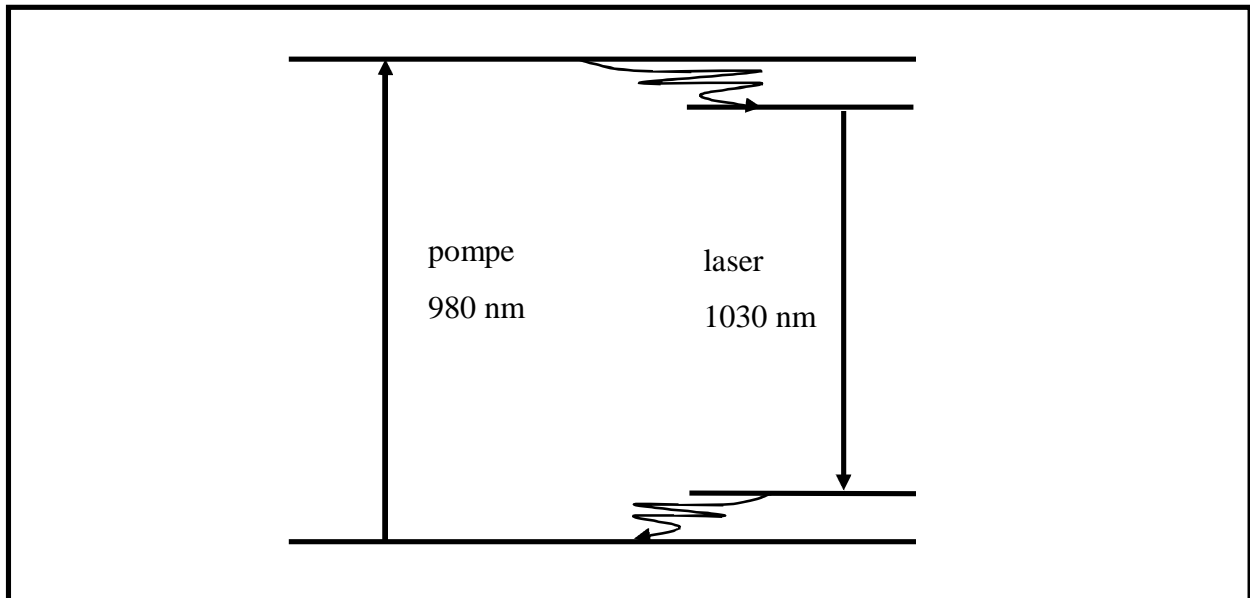
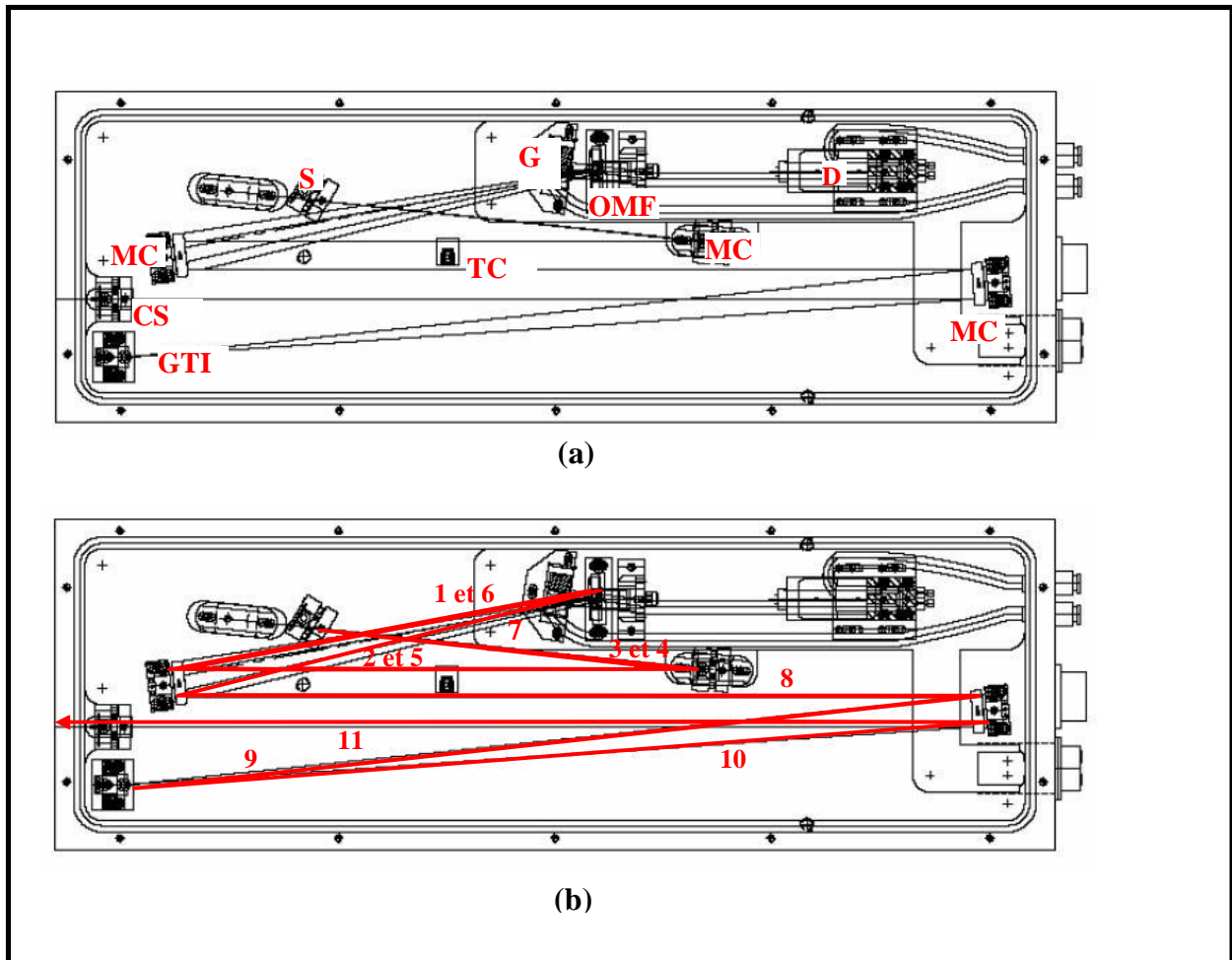


Figure 5.4 Diagramme de Jablonsky du dopant Ytterbium

- les miroirs GTI (Gires Tournois Interferometer) : ils servent à compenser la dispersion positive induite par le cristal non linéaire, celle-ci pouvant élargir les impulsions. De tels miroirs pourraient être aussi utilisés pour précompenser les optiques entre le laser et l'échantillon, cependant cet équipement n'est pas aussi absolument nécessaire que si nous voulions exploiter des impulsions autour de 50 fs (ou moins) qui seraient bien plus influencées par le phénomène (W. Wang et al., 2010). La conséquence est comme nous l'avons mentionné plus haut, que nous aurons moins de signal et qu'il faudra donc compenser un peu en augmentant la puissance moyenne.



**Figure 5.5 Oscillateur t-pulse**

(a) description des composants du laser t-pulse (b) tracé du faisceau laser depuis le milieu de gain jusqu'au coupleur de sortie, les chiffres indiquant l'ordre de parcours.

D : diode laser ; OMF : optiques de mise en forme du laser diode pour focalisation sur le milieu de gain ; G : milieu de gain ; S : miroir SESAM ; MC : miroirs concaves ; TC : thermocouple (mesure température dans l'oscillateur) ; GTI : miroir ; CS : coupleur de sortie.

Le Tableau 1 ci-après résume les caractéristiques du t-pulse

<b>CARACTÉRISTIQUE</b>	<b>VALEUR</b>
<b>Puissance moyenne</b>	<b>2 W</b>
<b>Taux de répétition</b>	<b>50 MHz</b>
<b>Durée de pulsation</b>	<b>200 fs</b>
<b>Largeur spectrale</b>	<b>5.6 nm</b>
<b>Longueur d'onde centrale</b>	<b>1030 nm</b>
<b>Taille de faisceau</b>	<b>≈1.2 mm</b> après 30 cm de propagation depuis la fenêtre de sortie de l'oscillateur

**Tableau 1** Caractéristiques optiques de l'oscillateur t-pulse

Ces données du constructeur ont aussi été vérifiées expérimentalement, que ce soit :

- par le puissancemètre (Gentec, Québec, Canada) pour la puissance totale mais aussi à différents autres endroits du montage : après le polariseur Glan-Taylor jusqu'à la mesure sous l'objectif condenseur,
- par une photodiode connectée à l'oscilloscope (Tektronix TDS 1012B, Beaverton, OR) pour le train d'impulsion,
- par un spectromètre (Ocean Optics Inc., Dunedin, FL) pour les caractéristiques spectrales,
- par la méthode de mesure au hacheur pour la mesure de dimension du faisceau.

### **3) Composants sur le banc optique**

Les différents miroirs de réflexion (par opposition aux miroirs dichroïques utilisés dans le microscope) dessinés sur la figure 5.1 étaient des miroirs métalliques or ou argent du fournisseur Thorlabs (Newton, NJ) dont la courbe de réflexion est particulièrement adaptée pour le proche IR. La combinaison d'une lame  $\lambda/2$  et d'un polariseur Glan-Taylor (Thorlabs) est le moyen le plus souvent utilisé pour faire varier la puissance du laser excitateur tout en permettant une résistance aux dégâts que le laser peut justement occasionner en sortie directe.

## 5.2.2 Microscope

### Vue d'ensemble

D'une façon générale le microscope a été pensé pour une visée ophtalmologique. C'est cette perspective qui a fixé la géométrie du montage et explique par exemple que le microscope soit droit plutôt qu'inversé pour accueillir des animaux. Pour la même raison, le périscope sur la figure 5.2 et la tête de balayage sont tous les deux fixés sur des platines de translation (repères 1 et 2) pour permettre un déplacement de l'objectif au-dessus d'un œil tout en conservant l'alignement laser : les optiques principales du microscope peuvent ainsi être déplacées tout en conservant le centrage du laser d'excitation dans les miroirs et les lentilles. Il a été également décidé dès le début du doctorat, de travailler avec une structure complètement modulable plutôt qu'avec un microscope commercial (souvent de microscopie deux photons) auquel nous aurions dû apporter des modifications nécessaires pour l'adapter à l'imagerie d'harmoniques. Cette structure permet par ex. d'être complètement libre sur l'objectif condenseur et sur la façon de détecter les signaux. Ainsi toute la structure opto-mécanique verticale représentée sur la figure 5.2 a été achetée au fournisseur Afoptical (Fremont, CA) ou chez Thorlabs pour bénéficier de cette modularité.

Enfin un point critique a été le balayage : en effet comme la microscopie de génération d'harmonique est une microscopie laser, la constitution d'image nécessite obligatoirement un balayage du point focal à travers l'échantillon. Il en résulte deux façons de procéder :

- soit le balayage est effectué par le déplacement de l'échantillon librement suivant les trois directions de l'espace : deux platines de translation assurent le déplacement horizontal tandis qu'un micromètre motorisé est actionné pour déplacer l'échantillon verticalement, le long de l'axe optique (qui sera donc dans la suite pris comme l'axe z). Dans ce cas le

faisceau reste fixe le long de l'axe optique au-dessus de l'échantillon. C'est le balayage échantillon ;

- soit le balayage est effectué par le faisceau laser suivant les directions orthogonales à l'axe optique (donc suivant x,y) pour réaliser les observations *en face* (par opposition aux observations transversales qui contiennent l'axe optique et l'un des deux autres). Le seul axe restant pour déplacer l'échantillon est alors le long de l'axe optique. C'est le balayage optique.

L'avantage du balayage échantillon est que sa mise en œuvre est relativement simple par rapport au balayage optique puisque ce dernier demande justement l'implémentation supplémentaire de la tête de balayage avec un alignement optique plus délicat. Par ailleurs réaliser une image par balayage échantillon permet de choisir complètement librement les dimensions du champ d'observation : l'image pourra tout aussi bien être carrée que rectangulaire mais surtout elle ne sera pas limitée dans n'importe quelle direction. Ce balayage se compare à celui effectué en TCO avec les A-scan et les B-scan et nous avons vu combien il était important de pouvoir imager la cornée fraîche de profil (anatomie, pathologie, chirurgie). Nous y reviendrons dans les chapitres de résultats. C'est également par le balayage échantillon que nous pouvons aussi acquérir des profils de signal de SH et TH le long de l'épaisseur de la cornée. Ces profils à une dimension (1D) qui s'acquièrent très rapidement permettent d'évaluer tout de suite l'épaisseur de la cornée et les signaux le long de cette longueur avant de lancer des acquisitions d'images dans les couches d'intérêt de la cornée.

Le balayage optique impose un champ d'observation maximal (voir plus bas sur le système afocal et l'annexe A sur les calculs optiques) et il faut alors mettre les images côte à côte, horizontalement ou verticalement, pour agrandir l'observation. Cependant le balayage optique est habituellement préféré car il permet de réaliser des observations *en face* plus rapidement que par le balayage échantillon, les miroirs galvanométriques ayant généralement des performances dynamiques plus poussées que les platines de translation. Cependant ces performances de vitesse restent tributaires de l'acquisition comme nous le verrons par la suite.

Voyons maintenant plus dans le détail les différents éléments du montage de microscope.

Tout le montage schématisé en figure 5.2 est placé sous une boîte de contreplaqué peinte en noire (les signaux d'intérêt étant dans le visible et le proche UV) spécialement conçue pour isoler

le microscope de toute lumière parasite de l'éclairage du laboratoire. Des rideaux noirs permettent à l'utilisateur d'accéder facilement au montage. Ainsi le montage présenté en figure 5.2 mais aussi la chaîne d'acquisition représentée dans la figure 5.3 sont placés sous cette boîte de dimension  $L = 120$  cm,  $l = 90$  cm et  $h = 90$  cm. Un seul petit trou est percé dans le contreplaqué pour permettre l'arrivée du faisceau excitateur (position E fig. 5.2). Ainsi depuis cette position on rencontre successivement :

### **1) Miroir et périscope**

Le périscope en cette position permet au faisceau d'être dirigé vers un trou percé dans le « breadboard » de la tête de balayage. Au-dessus de ce trou, la tête de balayage est centrée de telle façon que le faisceau parvienne toujours au centre des deux miroirs galvanométriques. Comme il a été dit précédemment le montage permettrait de déplacer l'objectif condenseur au-dessus d'un œil, en reliant le condenseur non pas à la structure verticale fixe mais au « breadboard » qui peut être translaté. L'idée est que le miroir du périscope doit être tourné vers la direction dans laquelle le mouvement de translation est effectué et déplacé simultanément d'autant que le « breadboard » est déplacé. Comme cette translation serait de tout au plus 1 cm au vu des 2 m (voir l'annexe A) qui séparent l'oscillateur de la tête de balayage, ceci n'aurait aucun impact pour le système afocal d'adaptation de faisceau pour l'objectif condenseur (voir plus loin). Pour une translation du « breadboard » suivant  $z$  (images transversales ou pile d'images *en face*) cette condition est toujours réalisée mais pour un déplacement suivant  $x$  ou  $y$ , le miroir du périscope doit être tourné d'exactement  $90^\circ$  pour passer d'une direction horizontale à l'autre et suivre le mouvement du « breadboard ».

Dans les expériences que nous avons menées nous avons cependant laissé attaché l'objectif à la structure verticale car les protocoles ne nécessitaient pas ces déplacements (l'échantillon étant petit et translatable).

### **2) Tête de balayage**

La tête de balayage, avec ses deux miroirs tournant autour d'un axe (miroirs galvanométriques), est indispensable pour réaliser le balayage optique de l'échantillon *en face*, i.e. les observations suivant le plan perpendiculaire à l'axe optique de l'objectif condenseur. Le modèle utilisé dans notre montage est le XLR8-10 de Nutfield Technology Inc. (Windham, NH). C'est une boîte métallique contenant :

- les deux miroirs galvanométriques argent chacun de 10 mm d'ouverture utile,
- les cartes de servo-amplificateur pour chacun des deux miroirs,
- une carte d'interface digital/analogique.

Dans l'ordinateur, une carte de contrôle de la tête de balayage pour bus PCI est insérée. Cette carte de contrôle vient avec une bibliothèque DLL pour Windows XP. Les fonctions de la DLL peuvent être appelées par LABVIEW 8.2 ((National Instruments, Austin, TX) pour opérer les mouvements désirés (voir le chap. 5.2.2 10) b) sur l'intégration). Cette tête de balayage a été achetée sans optique intégré pour que nous puissions réaliser notre propre système afocal nécessaire pour notre application (voir chapitre suivant).

### 3) Système afocal

Celui-ci est constitué de deux lentilles convergentes hémisphériques (notées  $L_T$  et  $L_O$  sur la figure 5.2). Dans un microscope optique plein champ « conventionnel », la fonction de ces deux lentilles serait davantage à voir sous l'aspect formation de l'image de l'échantillon par l'objectif de collection : il faut une lentille de tube ( $L_T$ ) pour un objectif corrigé à l'infini et il faut un oculaire ( $L_O$ ) pour agrandir en image à l'infini, cette image faite après la lentille de tube. L'œil utiliserait cette dernière image pour la focaliser sur la rétine. Dans notre cas, la démarche est différente car l'objectif d'intérêt est l'objectif condenseur et ce même système afocal joue ici les deux fonctions suivantes (nous reviendrons sur la question de l'objectif collecteur dans le chapitre 5.2.2 7) sur les échantillons et la collection optique) :

La première est de jouer le rôle d'élargisseur de faisceau pour adapter la taille du faisceau entre ce qu'elle est après la tête de balayage et ce qu'elle doit être au niveau de l'objectif condenseur (i.e. de la taille de la pupille arrière de ce dernier). Pour cette raison le système est afocal puisque d'un faisceau collimaté, les deux lentilles doivent donner un autre faisceau collimaté. Par ailleurs, en microscopie optique, la théorie (Murphy, 2001) impose que pour profiter pleinement de la résolution spatiale qu'offre l'ouverture numérique de l'objectif, il faut illuminer pleinement la pupille arrière. Ce qui revient, en microscopie laser, à ce que le col minimal du faisceau laser coïncide avec cette pupille arrière.

La seconde fonction est propre à l'utilisation du balayage optique et non échantillon. Elle consiste à imager le point d'incidence du laser sur le premier miroir galvanométrique (point qui est donc immobile) sur la pupille arrière de l'objectif condenseur. Cette condition assure que le



faisceau laser ne bougera pas autour de sa position centrée lors du déplacement des miroirs galvanométriques sur la pupille, et permettra ainsi d'avoir une puissance constante sous l'objectif (ainsi que la résolution spatiale). L'annexe en fin de thèse présente le calcul qui a permis de choisir les deux lentilles convergentes du balayage optique.

#### **4) Miroirs dichroïques, filtres passe-bande**

Les filtres utilisés dans le montage sont de deux natures : d'une part les miroirs dichroïques permettent de séparer les différentes lumières entre elles (fondamentale, seconde et troisième harmonique), d'autre part les filtres passe-bande assurent que les détecteurs ne reçoivent que la lumière de seconde ou de troisième harmonique en éliminant les deux autres signaux et la lumière parasite environnante. Les harmoniques sont donc centrées sur  $(1030 \text{ nm})/2$  soit 515 nm et  $(1030 \text{ nm})/3$  soit 343 nm respectivement pour la SH et la TH. Par ailleurs, les largeurs à mi-hauteur supposant une enveloppe gaussienne pour la pulsation, sont de  $(5.6 \text{ nm})/\sqrt{2} = 4.0 \text{ nm}$  pour la SH et  $(5.6 \text{ nm})/\sqrt{3} = 3.2 \text{ nm}$  pour la TH (Campagnola, 2008).

Certaines équipes de recherche peuvent rajouter un filtre passe-bas pour éliminer l'IR de la fondamentale mais si les filtres passe-bande ont une densité optique suffisante en dehors de leur fenêtre de transmission, ils suffisent. Par ailleurs, nous cherchions dans le montage la plus grande compacité, i.e. tenter de minimiser au maximum la distance séparant l'échantillon du détecteur. En épi-détection cette question est particulièrement importante car les signaux sont déjà faibles et assurer cette condition nous a permis de récupérer encore davantage de lumière qui même si elle provient du foyer, peut diverger par la diffusion que l'échantillon a impliquée. Ainsi l'objectif condenseur (et collecteur en épi-détection), et les deux miroirs dichroïque (D H et D IR en fig. 5.2) sont vissés sur une même pièce opto-mécanique (sorte de boule à différentes ouvertures) et la distance entre la pupille arrière de l'objectif et la fenêtre d'un des deux photomultiplicateurs n'excédait pas 8 cm. Ainsi, sur le montage ces différents filtres sont :

- le miroir dichroïque pour la séparation IR et harmoniques : avant l'objectif condenseur, sa fonction est de transmettre l'IR du laser oscillateur et de réfléchir les harmoniques qui sont dans le visible quand celles-ci sont épi-détectées. C'est par définition un miroir froid mais de meilleure qualité optique (planéité et qualité de surface) que la normale, les miroirs froids étant généralement destinés aux applications d'éclairage plutôt que d'imagerie. En transmission, il est possible de mettre le même miroir dichroïque sous

l'objectif collecteur comme l'illustre la figure 5.2, mais encore une fois les filtres passe-bande suffisent pour filtrer l'IR. Les caractéristiques spectrales de ce miroir dichroïque, modèle 565drxr w/ar Chroma Technology Corp. (Rockingham, VT, US) sont les suivantes : la longueur d'onde de coupure est 565 nm, il réfléchit au minimum 90 % entre 330 nm et 547 nm et transmet au minimum 80 % entre 600 nm et 1100 nm ;

- miroir dichroïque pour séparation des harmoniques : tout de suite après le miroir dichroïque précédent, un second miroir dichroïque est placé pour séparer les deux harmoniques. Les caractéristiques spectrales de ce miroir dichroïque, modèle 435dcsp Omega Optical (Brattleboro, VT, US) sont les suivantes : la longueur d'onde de coupure est 435 nm, il transmet plus de 80 % pour 330 nm et réfléchit plus de 90 % pour 515 nm ;
- filtre passe-bande pour détecteur : ils permettent donc la détection exclusive des signaux d'intérêt. Pour la détection de la seconde harmonique, les caractéristiques spectrales de ce filtre, modèle 515bp30 Omega Optical (Brattleboro, VT, US) sont les suivantes : la longueur d'onde centrale est 515 nm, la largeur à mi-hauteur est 30 nm, la transmission à 515 nm est 74 % et la densité optique en dehors de la zone de transmission (UV-1150 nm) est au minimum de 4. Ainsi pour assurer une coupure efficace de toute lumière non désirée, nous avons fixé deux de ces filtres directement sur la fenêtre du photomultiplicateur (PM).

Pour la détection de la troisième harmonique, les caractéristiques spectrales de ce filtre, modèle xf1001 Omega Optical (Brattleboro, VT, US) sont les suivantes : la longueur d'onde centrale est 330 nm, la largeur à mi-hauteur est 80 nm, la transmission à 330 nm est 76 % et la densité optique en dehors de la zone de transmission (UV-1150 nm) est au minimum de 4. Pour assurer une coupure efficace de toute lumière non désirée, nous avons également fixé deux de ces filtres directement sur la fenêtre du PM.

## **5) Détection**

Enfin pour finir la description de cet appareillage de détection, décrivons succinctement le PM (fig. 5.3), détecteur qui s'avère indispensable lorsqu'il est question d'enregistrer les signaux d'harmoniques qui sont de l'ordre du nW. Dans le montage nous avons deux mêmes PMs de modèle H9305-04 de Hamamatsu (Hamamatsu, Japon) que nous disposons suivant le mode de collection désiré (voir le chap. 5.2.2 7) échantillon et collection optique). Dans la figure 5.2, les

PMs sont ainsi représentés soit tous les deux en transmission, soit tous les deux en épi-détection mais certaines expériences ont aussi nécessité d'en mettre un en transmission et l'autre en épi-détection. Ces PMs dont l'usage est typiquement conseillé pour la microscopie non linéaire, ont l'avantage d'être compacts, avec dans leur boîtier la source haute tension pour les dynodes, et cette taille permet de les disposer relativement facilement dans le montage. Nous avons aussi choisi ces PMs car ils ont une sensibilité pratiquement constante entre 300 et 600 nm de quelques dizaines de  $\text{mA.W}^{-1}$  sur la photocathode, plage spectrale justement nécessaire pour les deux harmoniques. Cette même sensibilité est par ailleurs très amortie dans l'IR, diminuant ainsi la détection de la fondamentale. Par ailleurs, ce modèle en particulier, a un courant d'obscurité très faible typiquement de 0.1 nA, ce qui assure un S/B appréciable pour les signaux d'harmoniques les plus faibles.

Enfin pour régler le gain du PM un petit montage analogique extérieur (fig. 5.3) avec un potentiomètre utilisant un voltage de référence du PM est monté dans une boîte en aluminium pour assurer un blindage contre les interférences électromagnétiques. Dans ce même esprit de contrer tout bruit environnant une alimentation a été spécialement conçue : elle utilise une puce LM317, régulateur linéaire de tension, alimentée par deux piles. Par un potentiomètre, il est possible de fixer exactement la tension pour l'alimentation des PMs et cette source de tension est particulièrement stable et a une durée de vie sur plusieurs mois.

## **6) Objectif condenseur**

L'objectif condenseur est une pièce maîtresse en microscopie laser : autant en collection il n'est pas absolument nécessaire de créer une image point du point focal dans l'échantillon par une optique convergente (voir le chap. 5.2.2 7) échantillon et collection optique), autant le laser d'excitation doit être correctement focalisé pour obtenir un éclairage optimal (i.e. plan) de l'échantillon. Par ailleurs la question des aberrations chromatiques se pose également puisqu'en épi-détection le même objectif qui focalise l'IR exciteur doit collecter en microscopie non linéaire, depuis le même point, du visible (SH) et du proche UV (TH).

Pour choisir notre objectif condenseur nous n'avons pas de contrainte opto-mécanique particulière, en particulier en ce qui a trait à la longueur focale de celui-ci puisque la modularité de notre microscope laisse toute liberté pour l'agencement des optiques. Ainsi nous avons acquis l'objectif LUMPLFL (Olympus, Tokyo, Japon) de grandissement (G) 60X (si

combiné avec la lentille de tube du standard Olympus  $f = 180$  mm), d'ouverture numérique (ON) 0.9 à immersion à eau et de distance de travail (D.T.) 2 mm. Cet objectif offre le meilleur compromis pour les spécifications qui nous importent :

- il transmet et est donc corrigé de façon optimale entre 340 et 1100 nm ;
- il permet d'avoir une forte ON pour atteindre une résolution spatiale qui permette l'observation fine des cellules. Une telle ON forte permet, par ailleurs, de générer les harmoniques tout en limitant la puissance moyenne de l'excitation sur l'échantillon. Avec cette ON de 0.9 et grâce à l'immersion à eau, une D.T. importante reste possible pour l'exploration du tissu en profondeur. Celle-ci permet de couvrir allègrement l'épaisseur de la cornée porcine et *a fortiori* celle humaine. Ainsi d'autres équipes de recherche (Morishige *et al.*, 2006) ont travaillé à une ON de 1.3 pour chercher davantage de détail structural, mais cet effort doit être payé par une D.T. qui ne permet alors, que d'observer un côté de la cornée. Par ailleurs, cette puissance optique requiert une immersion à huile, ce qui pose d'autres problèmes avec un tissu qui est composé principalement d'eau ;
- il permet tous les types de microscopie (universel), ce qui est nécessaire car en microscopie d'harmoniques, la microscopie à champ clair est la base : il ne faut pas par ex. d'anneau d'occultation dans l'objectif comme la microscopie à contraste de phase en demande. Il ne faut pas non plus que l'objectif modifie la polarisation du champ électrique de la fondamentale ou de celui des harmoniques. Enfin cet objectif ne nécessite pas de lamelle pour couvrir l'échantillon (lamelle couvre-objet) car étant à immersion à eau son application première est physiologique, ce qui en fait une optique parfaitement adaptée pour l'observation des tissus frais voire en situation *in-vivo*.

### Dommmages laser potentiels sur l'échantillon :

Puisque l'objectif condenseur est le dernier élément optique que le faisceau excitateur rencontre avant d'interagir avec l'échantillon, cette section est l'occasion de discuter des photodommages que ce faisceau IR pourrait occasionner. En effet, même si nous n'avons pas exploré cette question expérimentalement, le sujet étant très complexe de par les multiples processus et degrés de photodommages, nous nous devons de savoir quelle était la plage de sécurité généralement admise dans la littérature scientifique. Pour qu'il y ait photodommage il faut nécessairement qu'il y ait absorption de la lumière par le tissu (Débarre, 2006, Itoh *et al.*, 2009, König, 2008, Vogel *et al.*, 2003), i.e. dépôt d'énergie. Cette absorption photonique est alors le siège possible de différentes voies de photodommages biologiques : l'absorption linéaire<sup>14</sup> peut donner lieu à un échauffement ou à une photochimie toxique pour la cellule : les UV énergétiques sont particulièrement néfastes pour les noyaux cellulaires<sup>15</sup>. Comme nous l'avons dit précédemment le laser à gain Yb:KGW opérant à 1030 nm élimine le risque d'absorption de l'eau et donc son échauffement que nous aurions au-delà de 1300 nm. Par définition, la génération d'harmonique n'est pas un phénomène impliquant l'absorption comme c'est le cas en fluorescence, et les risques photochimiques et d'échauffement sont écartés par ce phénomène. Cependant un risque d'absorption multiphotonique sur les espèces endogènes est à considérer et pour l'éviter il faut donc que la longueur d'onde de l'excitation ne corresponde pas à l'absorption d'une espèce chimique endogène. Ainsi, le laser Ti:Sa peut poser ces problèmes car justement entre 700 et 900 nm, il est possible d'exciter plusieurs fluorophores métaboliques (voir le chap. 6.1) et même le collagène I (Débarre *et al.*, 2006, Hovhannisyan *et al.*, 2008, Zipfel *et al.*, 2003b). En revanche, un IR plus lointain au-dessus de 1000 nm permet d'éviter ces risques de fluorescence à deux photons (Barzda *et al.*, 2005).

En fait le seul risque qui reste à considérer est celui du claquage optique (voir le chap. 2.1.4 2)), car en augmentant l'irradiance pour essayer d'avoir plus de signal d'harmonique, on atteint obligatoirement le seuil. Si nous calculons justement l'irradiance crête que l'échantillon subit au foyer de notre objectif condenseur, nous obtenons, dans le cadre d'une description gaussienne du faisceau après le condenseur :

14 : la microscopie non linéaire offre l'avantage d'un foyer d'émission plus petit que celui du microscope confocal 1P : c'est le foyer image au niveau du détecteur qui est filtré pas le diaphragme mais dans l'échantillon il suit la dépendance linéaire, ce qui implique que les photodommages peuvent s'étendre bien au-delà du foyer.

15 : l'UV généré par la TH reste proche (343nm) mais surtout la puissance en jeu est très faible (nW) et ainsi n'implique pas les risques qu'il y a en fluorescence 1P où il faut justement excité dans un UV plus lointain et à plus forte irradiance.

Soit avec une surface de faisceau de  $\pi.\omega_r^2$

$$I = \frac{P_{\text{moy}}}{\text{Cad}.\tau.\pi.\omega_r^2} . \quad \text{éq. 27}$$

où pour le laser excitateur :

$I$  est son irradiance ;  $P_{\text{moy}}$ , sa puissance moyenne ;  $\text{Cad}$ , la cadence laser,  $\tau$ , la durée d'impulsion et  $\omega_r$  le rayon du faisceau de focalisation qui s'écrit comme nous l'avons vu précédemment à l'occasion de la question de la résolution latérale :

$$\omega_r = \frac{0.52 \times \lambda_{\text{ex}}}{\text{ON}} ,$$

où  $\lambda_{\text{ex}}$  est la longueur d'onde du laser excitateur (fondamentale à 1030 nm) ;  $\text{ON}$ , l'ouverture numérique du condenseur.

Soit l'application numérique suivante sachant que nous n'avons jamais excéder plus de 100 mW de puissance moyenne sous l'objectif condenseur Olympus.

$$I = \frac{1.00 \cdot 10^{-1}}{5.00 \cdot 10^7 \times 2.00 \cdot 10^{-13} \cdot \pi \cdot \left( \frac{0.52 \times 1.03 \cdot 10^{-6}}{0.9} \right)^2} ,$$

soit  $8.99 \cdot 10^{15} \text{ W.m}^{-2}$  ou  $0.89 \text{ TW.cm}^{-2}$  .

Or d'après les travaux d'imagerie d'harmonique qui ont été menés sur la viabilité en embryologie, cet ordre de grandeur est tout à fait tolérable pour l'échantillon vivant sous cet IR au-delà de 1000 nm (Débarre *et al.*, 2006) et permet même une observation sur plusieurs heures d'affilé. Dans une autre étude, Squirrel *et al.* (1999) vont dans le même sens de cette observation puisqu'avec des conditions très proches des nôtres, la seule chose qui limite leur puissance moyenne d'excitation sur l'échantillon est la présence des fluorophores que l'équipe a volontairement injectés pour le marquage des mitochondries.

## 7) Échantillon et collection optique

La question de la collection en transmission est intimement liée dans nos expériences, à l'échantillon que nous observons. En revanche, l'épi-détection est toujours réalisée par la même configuration du microscope. L'échantillon peut donc se présenter sous les trois formes suivantes :

- a) un objet épais et complètement opaque qui ne permet alors que l'épi-détection,
- b) un objet de 7-8 mm d'épaisseur,
- c) un objet de moins d'1 mm d'épaisseur.

Avant de passer en revue ces différentes situations expérimentales de microscopie, détaillons les échantillons biologiques que nous avons utilisés et leur protocole de préparation. Le cas particulier de la cornée reconstruite est développé dans le chapitre de résultat correspondant.

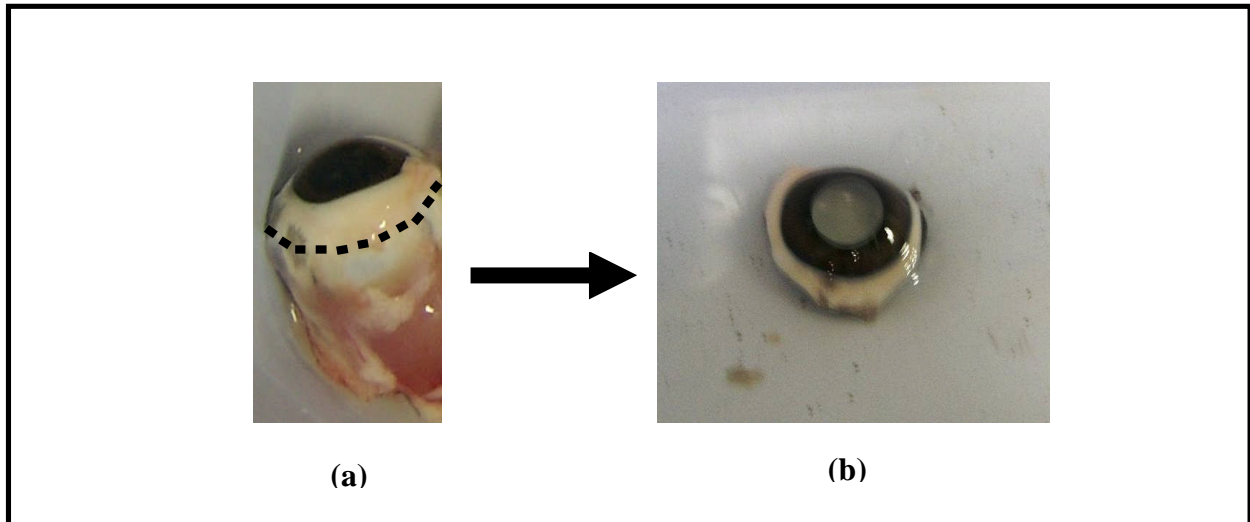
Les yeux de porc sont obtenus d'un abattoir dans les 6 heures qui suivent leur mort. Ils sont conservés en chambre humide à 4°C jusqu'à l'expérience. Une chambre humide est un flacon où l'œil est placé au fond sur une gaze humidifiée de solution physiologique équilibrée, ce flacon étant fermé hermétiquement. Cette conservation assure une fraîcheur pour être au plus près de la situation *in vivo* et permet de limiter l'oedémisation du tissu. En particulier, aucun de nos résultats ne présente d'observation d'échantillon (cornée native ou reconstruite) fixée par immersion dans le paraformaldéhyde. Les observations sur un échantillon pouvaient durer 2-3 heures en comptant les interruptions nécessaires expérimentales et nous utilisons un échantillon qu'une seule fois par expérience de microscopie.

Ces yeux peuvent être présentés de trois façons différentes pour le microscope, correspondantes au trois cas mentionnés plus haut :

- a) il est possible de conserver le globe entier, auquel cas la collection des harmoniques générées dans la cornée est réalisée en épi-détection ;
- b) il est possible de ne conserver que le segment antérieur : cornée et cristallin restent alors rattachés par l'iris et la sclérotique (fig. 2.2 (a), 5.6 (b) et 5.7 (a)). Cette préparation offre l'avantage de présenter la cornée avec sa courbure naturelle tout en permettant une détection en transmission ;

- c) enfin la cornée peut être complètement isolée, auquel cas seul un petit cadre de sclérotique est conservé autour, et l'iris est détaché. Cette dernière préparation offre les deux possibilités de collection des signaux en transmission et en épi-détection.

Voyons à présent, comment le microscope est configuré suivant ces différents cas de figure.



**Figure 5.6** Segment antérieur

(a) globe oculaire. (b) segment antérieur après découpe le long des pointillés.

#### a) globe entier

Dans ce cas l'œil est monté dans un porte échantillon ne laissant dépasser que la cornée et possédant des « remparts » pour assurer l'immersion de la cornée dans le gel ophtalmique tout le long de l'expérience d'imagerie. Le gel ophtalmique est un gel couramment utilisé sur les instruments ophtalmiques cliniques : Tear-gel (Novartis, Basel, Suisse). Son indice de réfraction est  $n=1.339$  à  $20^{\circ}\text{C}$  sous une longueur d'onde de  $589\text{ nm}$  (pour l'eau sous les mêmes conditions, il vaut :  $n = 1.332$ ). Cet ensemble est placé directement sur les platines de translation de l'échantillon.

#### b) Segment antérieur

Le segment antérieur entier peut être déposé et maintenu sur une lame de microscope de silice fondue. Dans la mesure où l'échantillon est trop épais, dans ce cas, pour permettre à l'objectif de collection en transmission d'atteindre la cornée vu sa D.T., nous avons alors placé directement le



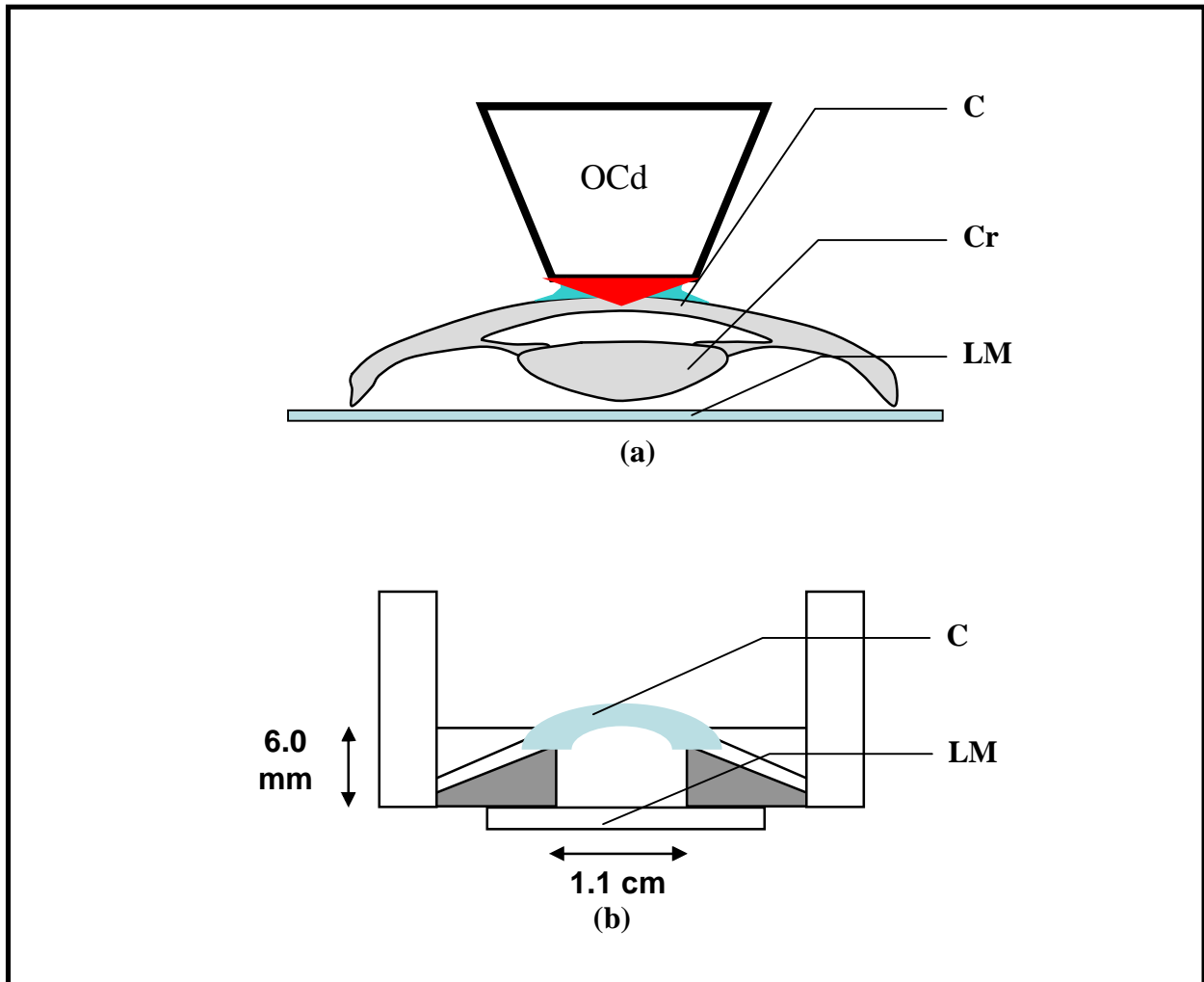
PM sous la lame de microscope. La distance séparant la cornée de la fenêtre du PM reste suffisamment courte pour que malgré la divergence du faisceau émis, il soit possible d'avoir un très bon niveau de signal, que nous avons même vérifié meilleur que dans une configuration conventionnelle de détection en transmission (avec objectif de collection) puisque dans ce dernier cas le faisceau subi différentes réflexions ou absorptions par les optiques qu'il croise. Dans cette situation, aucune optique de collection n'est placée pour faire l'image du foyer d'illumination et le segment antérieur lui-même n'assure pratiquement pas de fonction optique puisqu'il y a application du gel ophtalmique et que le foyer est sur la cornée. Cependant, l'imagerie reste possible puisque la microscopie laser permet, comme le ferait un sténopé, une bijection permanente entre les points parcourus pendant le balayage et le voltage que fournit à ce moment le photomultiplicateur.

Dans le même esprit nous avons également conçu un porte échantillon simulant une chambre antérieure lorsque seule la cornée est conservée (fig. 5.7 (b)). Par ex. certains microkératomes automatiques (voir le chap. 2.1.4. 1)) ne peuvent être utilisés que sur une cornée isolée. Or une telle cornée avec un capot, qui ne bénéficie plus de la pression de la chambre antérieure (cas du segment antérieur ou globe) est très difficile, expérimentalement, à observer avec un objectif condenseur à immersion eau, le fin capot tenant difficilement en place et se fripant. En plaçant cette cornée coupée dans ce porte échantillon qui maintient une pression sous la cornée, il est alors possible d'en faire l'observation en transmission. Par ailleurs, le cylindre creux sous la cornée est en aluminium et avantage la collection de l'harmonique vers le PM. La seule restriction à cette configuration est qu'il n'y a pas la possibilité de détecter les deux harmoniques simultanément en transmission.

### c) Cornée isolée

Dans ce cas, la cornée entourée d'un peu de sclérotique est déposée sur la lame de microscope avec l'épithélium tourné vers la lame de microscope : la légère courbure restante et le poids de l'ensemble permettent d'assurer un bon contact avec la lame de microscope (distance minimisée pour la D.T. de l'objectif collecteur) ainsi qu'une inertie permettant même l'imagerie par translation de l'échantillon. Cette configuration a été utilisée lorsque nous voulions nous concentrer sur l'imagerie des couches postérieures de la cornée avec la détection simultanée des

deux signaux en transmission afin d'avoir un signal plus fort. La cornée reconstruite dont l'épaisseur était d'une cinquantaine de microns rentre aussi dans ce même schéma de collection.



**Figure 5.7 Préparations expérimentales pour observer en transmission les cornées avec leur courbure**

(a) préparation avec le segment antérieur. (b) préparation pour cornée isolée avec chambre antérieure artificielle. La cornée est coincée par le pas de vis de la partie mobile en gris. La lame de microscope est collée sur cette partie mobile. Pour (a) et (b), le PM est approché et centré au plus près sous la lame de microscope.

OCd : Objectif condenseur ; C : Cornée ; Cr : Cristallin ; LM : Lame de microscope.

Dans ce cas de figure de détection des deux signaux en transmission, nous avons choisi l'objectif Plan NeoFluar de grandissement (G) 63X (si combiné avec la lentille de tube du standard Zeiss  $f=165$  mm), d'ouverture numérique (ON) 0.75 sec et de distance de travail (D.T.) 2 mm (Carl

Zeiss Microimaging, Jena, Allemagne) avec correcteur d'épaisseur réglable de lamelle couvre-objet. Cet objectif offre le meilleur compromis pour les spécifications qui nous importent :

- comme l'objectif condenseur, il transmet et est donc corrigé de façon optimale entre 340 et 1100 nm ;
- il permet d'avoir une forte ON tout en conservant une D.T. qui permette de réaliser la mise au point sur toutes les couches de la cornée isolée. Nous avons vu dans la partie théorique que le profil radiatif des harmoniques dépendait de différents facteurs (focalisation, structure de l'échantillon...). Cependant, si nous nous plaçons, comme nous l'avons développé dans les chapitre de théorie, dans l'hypothèse des faisceaux gaussiens pour les harmoniques générées, alors celles-ci ont une divergence divisée par  $\sqrt{2}$  pour la SH et par  $\sqrt{3}$  pour la TH par rapport à celle de la fondamentale, ce qui revient à avoir une ON d'au moins  $0.9/\sqrt{2}$  soit 0,64. Nous avons donc une certaine marge qui permet de collecter de façon optimale les signaux en transmission (puissance des signaux, résolution spatiale) ;
- enfin comme l'objectif condenseur celui-ci permet également tous les types de microscopie (universel).

## **8) Résolution spatiale**

Puisque nous venons de développer la question de la collection optique, intéressons-nous à présent à la question de la résolution spatiale du microscope GSH/GTH.

Comme nous l'avons vu en théorie, la résolution latérale ne pose pas de problème dans le type de microscopie que nous faisons : la forte ON employée et le phénomène même de génération d'harmoniques, permet facilement d'atteindre une résolution latérale de quelques centaines de nanomètres, résolution qui permet donc de facilement réaliser de l'imagerie cellulaire. En revanche, nous savons que la résolution axiale est une question plus délicate, d'autant plus que notre application sur la cornée demande justement à pouvoir résoudre axialement des structures pouvant être très fines. Nous aborderons donc ici la résolution axiale avec des mesures sur le signal de TH et dans un souci de simplification, nous nous contenterons de nous intéresser à sa caractérisation en transmission.

Rappelons tout d'abord la formule théorique de la résolution spatiale axiale pour la GTH à ON forte. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 4.2, la résolution axiale en TH sur une interface optique sous une forte ON, vaut théoriquement la longueur focale  $b$ , soit exprimée en fonction de l'ouverture numérique,  $ON = n_{im}\sin\alpha$  :

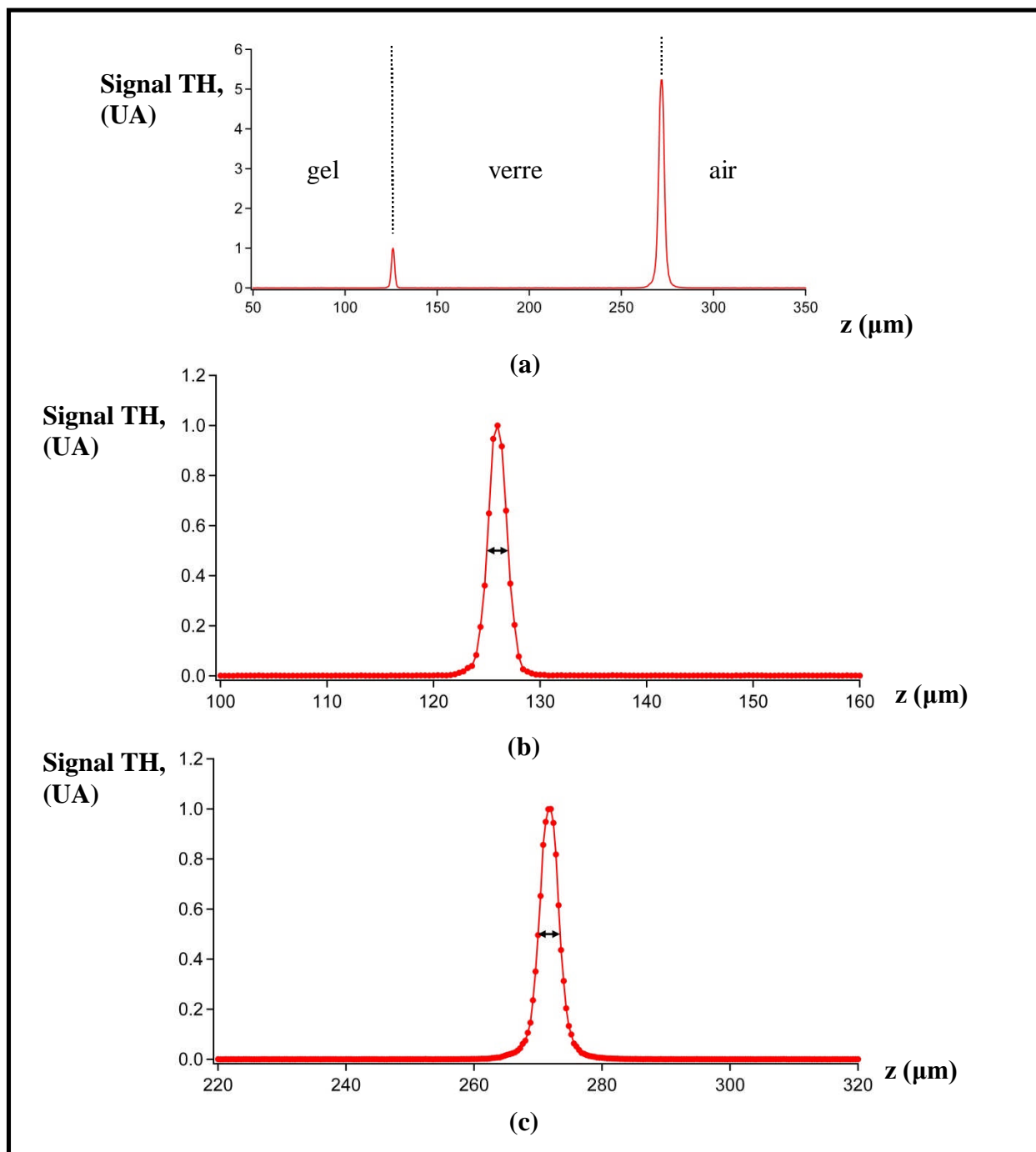
$$\delta z_{TH} = \frac{0.76 \times \lambda_{ex}}{n_{im}(1 - \cos(\alpha))} .$$

Dans ce qui suit, nous allons voir si les mesures expérimentales sont justement en accord avec cette valeur théorique. Une expérience qui est souvent menée à cette fin, est de réaliser le profil 1D le long de l'épaisseur d'une lame de verre, les interfaces de celle-ci offrant l'opportunité de mesurer de façon simple, cette résolution axiale.

Cependant cette mesure est effectuée sur un matériau inorganique et il est important de voir également ce que vaut cette résolution spécifiquement sur la cornée. Nous verrons donc ensuite la caractérisation de la résolution axiale de la TH dans ce cas.

#### a) Mesure de la résolution axiale de TH sur une lame de verre

Ainsi, l'échantillon est une lamelle couvre-objet de verre de silice. La TH est générée avec l'objectif Olympus avec immersion et est collectée en transmission avec l'objectif de collection sec Zeiss. La figure 5.8 (a) montre le graphique général montrant les deux interfaces de la lame. Nous remarquons tout de suite que les deux pics ont une différence notable d'intensité mais ceci s'explique simplement par le fait que les deux interfaces ne séparent pas les mêmes milieux dans les deux cas. Or l'interface postérieure étant entre deux milieux d'indice de réfraction plus différents (verre-air) que l'interface antérieure (gel-verre), il n'est pas étonnant que la seconde interface génère un signal plus fort. Les figures 5.8 (b) et 5.8 (c) agrandissent les deux pics.



**Figure 5.8** Mesure de la résolution axiale en TH sur lamelle couvre-objet

Objectif condenseur : objectif Olympus ON 0.9 avec immersion et collection en transmission avec l'objectif de collection sec Zeiss. (a) Profil axial 1D sur les deux interfaces. (b) pic de l'interface gel-verre avec largeur à mi-hauteur (double flèches). (c) pic de l'interface verre-air.

- Sur le pic de l'interface gel-verre

La largeur à mi-hauteur (LMH) mesurée sur cette figure vaut : 2.0  $\mu\text{m}$ . Sur trois mesures, nous trouvons une résolution axiale de  $2.1 \pm 0.1 \mu\text{m}$ . Vérifions si cette valeur est en accord avec le calcul théorique de la résolution de TH en fonction de l'ON :

$$\text{A.N. : } \delta z = \frac{0.76 \times 1.0}{1.3 \left( 1 - \cos \left( \sin^{-1} \left( \frac{0.9}{1.3} \right) \right) \right)} = 2.1 \mu\text{m} .$$

Ce qui est en accord avec la mesure.

- Sur le pic de l'interface verre-air

La largeur à mi-hauteur (LMH) mesurée sur cette figure vaut : 3.4  $\mu\text{m}$ . Sur trois mesures, nous obtenons une LMH de  $3.4 \pm 0.1 \mu\text{m}$ . Pour expliquer ce résultat d'élargissement de la résolution axiale par rapport à la mesure qui est faite en surface sur l'interface gel-verre, il faut prendre en compte la réfraction entre le gel (eau à la première décimale) et le verre. Ce qui implique que dans la formule théorique, le demi-angle associé à l'ON  $\sin^{-1} \left( \frac{0.9}{1.3} \right)$  doit être remplacé par celui induit par cette réfraction. En prenant l'indice du verre de silice de la lamelle à 1.5 à 1.0  $\mu\text{m}$  (Polyanskiy, 2012), l'expression de la résolution spatiale donne :

$$\delta z = \frac{0.76 \times 1.0}{1.3 \left( 1 - \cos \left( \sin^{-1} \left( \frac{0.9 \times 1.3}{1.3 \times 1.5} \right) \right) \right)} = 2.9 \mu\text{m} .$$

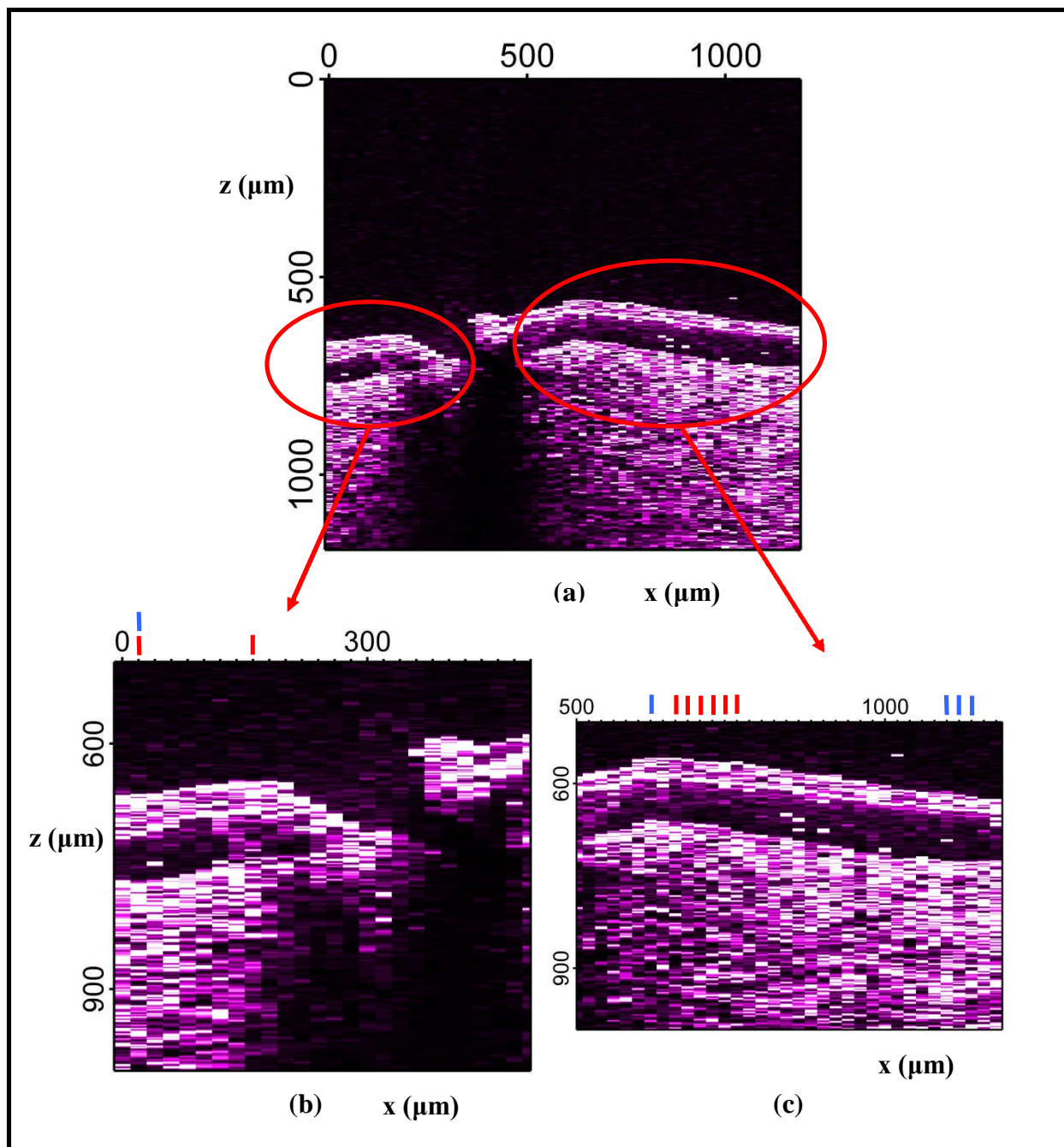
Il y a un écart entre cette valeur théorique et les mesures effectuées mais mis à part la réfraction, la résolution peut également être dégradée par la diffusion d'un matériau même si celui-ci est de bonne transparence. Les mesures que nous présentons maintenant sur la cornée apportent justement un éclairage supplémentaire sur ce point.

## b) Mesures de la résolution axiale de TH sur la cornée porcine

Il n'est pas évident que la résolution axiale que nous avons mesurée sur la lame de verre soit la même pour notre échantillon biologique. En effet dans le cas de la cornée, l'indice de réfraction du milieu d'immersion et celui de la cornée sont très proches ; nous ne savons pas comment dans ce matériau, également transparent, la diffusion influence la résolution ; et enfin est-ce que le fait de collecter l'harmonique sans objectif de collection a une conséquence sur cette caractéristique microscopique.

Par ailleurs, mesurer la résolution sur un échantillon biologique ne pose pas de problème s'il est possible de savoir par une autre méthode de plus haute résolution spatiale, en l'occurrence la microscopie électronique, que des détails ou des interfaces sont vraiment « abruptes ». Comme la microscopie électronique montre des transitions de matériau très courte à la surface de la cornée et entre l'épithélium et le stroma, à l'échelle du nm, ces objets peuvent être considérés comme des interfaces pour y faire les mesures de résolution. Par ailleurs, les pics de signal de TH qui y sont mesurés sont bien constitués de suffisamment de points pour ne pas être confondus avec du bruit.

Ainsi, nous avons pris deux séries de mesure à partir de l'image de la figure 5.9 qui est tirée de nos expériences d'imagerie sur la cornée incisée (voir le chap. 8). L'échantillonnage latéral y était de 20  $\mu\text{m}$  puisque l'observation était macroscopique (en l'occurrence pour suivre l'incision).



**Figure 5.9** Mesure de la résolution axiale en TH sur la cornée

Objectif condenseur : objectif Olympus ON 0.9 avec immersion et est collectée en transmission suivant le montage de la figure 5.7 pour collecter vers le PM. (a) vue d'ensemble de la cornée en IGTH. (b) et (c) sont des agrandissements de (a) pour montrer plus spécifiquement où les profils 1D ont été choisis : trait rouge pour la surface et trait bleu pour l'interface epithelium/stroma (en profondeur il était possible de prendre plusieurs mesures sur un même profil dans une limite de  $10 \mu\text{m}$  de l'interface).



Tous ces profils 1D ont été choisis sur des interfaces où l'inclinaison de celle-ci est très légère au vu du voisinage de telle façon que nous soyons proches de la même situation d'incidence qu'avec les mesures sur lame de verre. Ainsi :

- huit profils 1D sont extraits de l'image pour réaliser la mesure de la résolution axiale TH en surface de la cornée. Ces mesures sont équivalentes à celle de la première interface sur la lame de verre, puisque le faisceau excitateur n'est pas encore réfracté mais avec la différence que cette fois il n'y a pas d'objectif de collection mais le montage de la figure 5.7 ;
- huit profils 1D sont extraits de l'image pour réaliser la mesure de la résolution axiale TH à hauteur de l'interface épithélium/stroma. Cette position est choisie car l'entrée dans le stroma offre, comme nous l'avons toujours remarqué, un regain de signal pour la TH, ce qui permet de facilement suivre cette interface et cibler les endroits où elle est normale à l'axe optique. Par ailleurs cette profondeur reste toujours à peu près la même dans la cornée saine, autour de 0.12 mm contre  $\approx 0.18$  mm pour l'épaisseur de la lame de verre. Cependant ces mesures n'interrogent que la part d'influence potentielle de la diffusion sur la dégradation de la résolution axiale TH puisque la réfraction est négligeable entre l'extérieur et l'intérieur de la cornée, les deux milieux (gel/cellules) étant d'indice de réfraction très proche.

Sur les huit mesures de pic à l'interface gel/cornée, la résolution axiale TH obtenue est de :  $2.0 \pm 0.2$   $\mu\text{m}$  ce qui est en accord avec les mesures avec la lame de verre, prouvant ainsi qu'en collectant la lumière comme l'impose cet échantillon, la résolution reste garantie.

Sur les huit mesures de pic à l'interface épithélium/stroma, la résolution axiale TH obtenue est de :  $2.4 \pm 0.3$   $\mu\text{m}$ . Ainsi, alors que la réfraction entre l'extérieur et l'intérieur de la cornée est très faible avec l'utilisation du gel ophtalmique, la résolution axiale tend à augmenter légèrement par rapport à ce qu'elle est en surface, sans doute à cause d'une certaine inhomogénéité du tissu. Cet écart pourrait également expliquer la différence qu'il reste entre la valeur théorique sur la seconde interface de verre et la mesure expérimentale, justement de quelques centaines de nanomètres.

Ainsi pour résumer sur cette question de la résolution spatiale, les mesures que nous avons effectuées en TH en transmission sur des interfaces proches de l'orthogonalité avec l'axe optique,

interfaces qui se présentent à plusieurs reprises dans la cornée ne serait-ce que par les différentes couches anatomiques, donnent des résultats en adéquation avec ce que prévoit la théorie que nous avons développée autour de la GTH. Par ailleurs, la dégradation de cette résolution avec le sondage en profondeur se justifie en bonne partie par l'influence de phénomènes relevant de l'optique linéaire comme la réfraction ou la diffusion.

### c) Échantillonnage

Pour conclure sur cette question de la résolution, abordons en quelques lignes la question de l'échantillonnage. D'après le théorème de Nyquist-Shannon, la fréquence d'échantillonnage doit être au moins égale au double de la fréquence de ce que l'on veut observer. Ainsi, si nous voulons observer un objet d'une structure spatiale très fine avec les pleines capacités de résolution spatiale (axiale ou latérale) du microscope, il faut théoriquement échantillonner à la moitié de ces valeurs de résolution spatiale. Dans toutes les expériences que nous avons menées nous ne l'avons jamais fait. A ceci deux raisons :

- la première cohérente avec le Théorème de Nyquist-Shannon, est que justement nous n'avons pas besoin d'observer des détails si fins : lorsqu'il est question d'observer la cornée dans son ensemble comme dans la figure 5.9, il faut voir la forme de la cornée comme une onde spatiale de très faible fréquence (de l'ordre du mm) et échantillonner avec des pas latéraux de l'ordre de 60  $\mu\text{m}$  n'est pas en désaccord avec cet objectif d'observation. Pour ce qui est des cellules le but était principalement de visualiser les membranes cellulaires et le noyau et les échantillonnages dans ces expériences étaient suffisants pour révéler les interfaces sur une dizaine de points ;
- la deuxième était pratique car autant nous pouvons prendre autant de point que l'on veut sur l'axe d'acquisition (pour autant que cela ne contrarie pas l'électronique d'acquisition voir plus loin), autant augmenter le nombre de pas pour une même distance suivant l'autre axe doit se payer au prix d'une acquisition au final plus longue quel que soit le type de balayage (par échantillon ou optique).

## **9) platine de translation et micromètre automatique pour le déplacement de l'échantillon :**

Pour clore ce chapitre autour de l'échantillon, mentionnons le matériel permettant le déplacement de celui-ci.

Pour le déplacement vertical de l'échantillon (le long de l'axe optique), nous utilisons un micromètre automatique dont la pointe pousse une barre solidaire de la plaque portant les platines de translation sur lesquelles est fixé le porte échantillon. Ce micromètre qui a une distance de translation de 12.5 mm est le modèle MP20S 2phase-025 de la compagnie Micos GmbH (Eschbach, Allemagne).

Pour le déplacement horizontal, les deux platines de translation qui peuvent couvrir un déplacement de 26 mm sont du même modèle : MT-40 de la compagnie Micos GmbH.

Les deux platines et le micromètre sont commandés par une même carte de contrôle venant avec une bibliothèque DLL pour Windows XP. Les fonctions de la DLL sont encore appelées par LABVIEW 8.2 pour opérer les mouvements de translation désirés (voir le chapitre sur l'intégration en 5.2.2 10) b)).

## **10) Acquisition :**

Cette partie est schématisée en figure 5.3.

### **a) Électronique**

Le signal issu du PM est un courant. Cependant, que ce soit pour faire une mesure sur l'oscilloscope ou sur la carte d'acquisition, il faut convertir ce courant en tension. Nous avons exploré plusieurs solutions, mais la plus simple que nous ayons retenue a été de brancher sur le PM une simple résistance de charge. Comme les courants détectés restent tout de même faibles, tout en parvenant à se détacher du bruit de fond d'obscurité de la boîte noire, il est préférable de mettre une impédance entre 1 et 10 M $\Omega$  pour que les voltages obtenus occupent de façon optimale la plage dynamique de la carte d'acquisition. Bien sûr une telle valeur d'impédance, limite la vitesse d'acquisition de par la fréquence de coupure induite pour ne pas déformer le signal acquis, déformation qu'il est par ex. possible d'observer si à l'occasion de l'acquisition d'un signal de TH sur une interface, la vitesse de balayage à travers cette interface est trop grande. En utilisant une source de signal périodique et en y branchant cette impédance, cette fréquence de coupure vaut environ 300 Hz.

Cependant comme la performance de vitesse ne nous importait pas tant que ça dans les expériences que nous menions (nous n'avions pas besoin d'observer de phénomènes rapides), cette amplification linéaire du signal nous convenait. Ainsi au plus vite nous avons acquis des images à une vitesse de balayage de  $125 \mu\text{m.s}^{-1}$  comme par ex. pour le balayage optique si on prend en compte la résolution latérale théorique de TH comme période spatiale minimale à balayer ( $\approx 400 \text{ nm}$ ).

Une optimisation possible de la détection pourrait consister à utiliser un amplificateur à détection synchrone pour augmenter encore davantage le rapport signal sur bruit en prenant la cadence d'un hacheur optique sur le trajet de la fondamentale comme référence.

Enfin le voltage converti par la résistance de charge est porté par un câble BNC à un boîtier de connexion pour les deux PMs, boîtier de connexion qui assure également un bon blindage contre le bruit (BNC-2110, National Instruments, Austin, TX). Enfin ce boîtier est connecté à la carte d'acquisition (PCI-6122S, National Instruments, Austin, TX) qui offre, entre autres, l'avantage d'un échantillonnage simultané des signaux.

#### b) Intégration

Pour le pilotage des mouvements (platines de translation, micromètre, miroirs galvanométriques) et la synchronisation de ceux-ci avec l'acquisition nous avons utilisé LABVIEW 8.2, qui est un logiciel de référence pour les commandes et mesures depuis un ordinateur à l'aide d'un langage de programmation relativement simple puisque graphique. Ainsi comme dans les autres langages de programmation il y a la possibilité de créer différentes fonctions s'appelant les unes les autres, fonctions qui dans LABVIEW sont appelées « virtual instrument » (VI). Nous verrons en particulier comment le balayage échantillon a été conçu pour réaliser une acquisition d'un profil 1D.

### Interface utilisateur pour balayage échantillon

Les premières acquisitions que nous avons réalisées ont été celles utilisant le balayage échantillon dans la mesure où nous voulions d'abord imager macroscopiquement : cette échelle nous offrait des références simples pour évaluer notre imagerie :

- profil 1D pour l'épaisseur à comparer avec les mesures de pachymétrie et répartition des deux signaux sur les différentes couches. Les profils 1D ont toujours été réalisés avec le balayage échantillon puisque celui-ci donnait les positions et permettait le déplacement suivant z ;
- image 2D x,z (transversales) pour évaluer la courbe de la cornée.

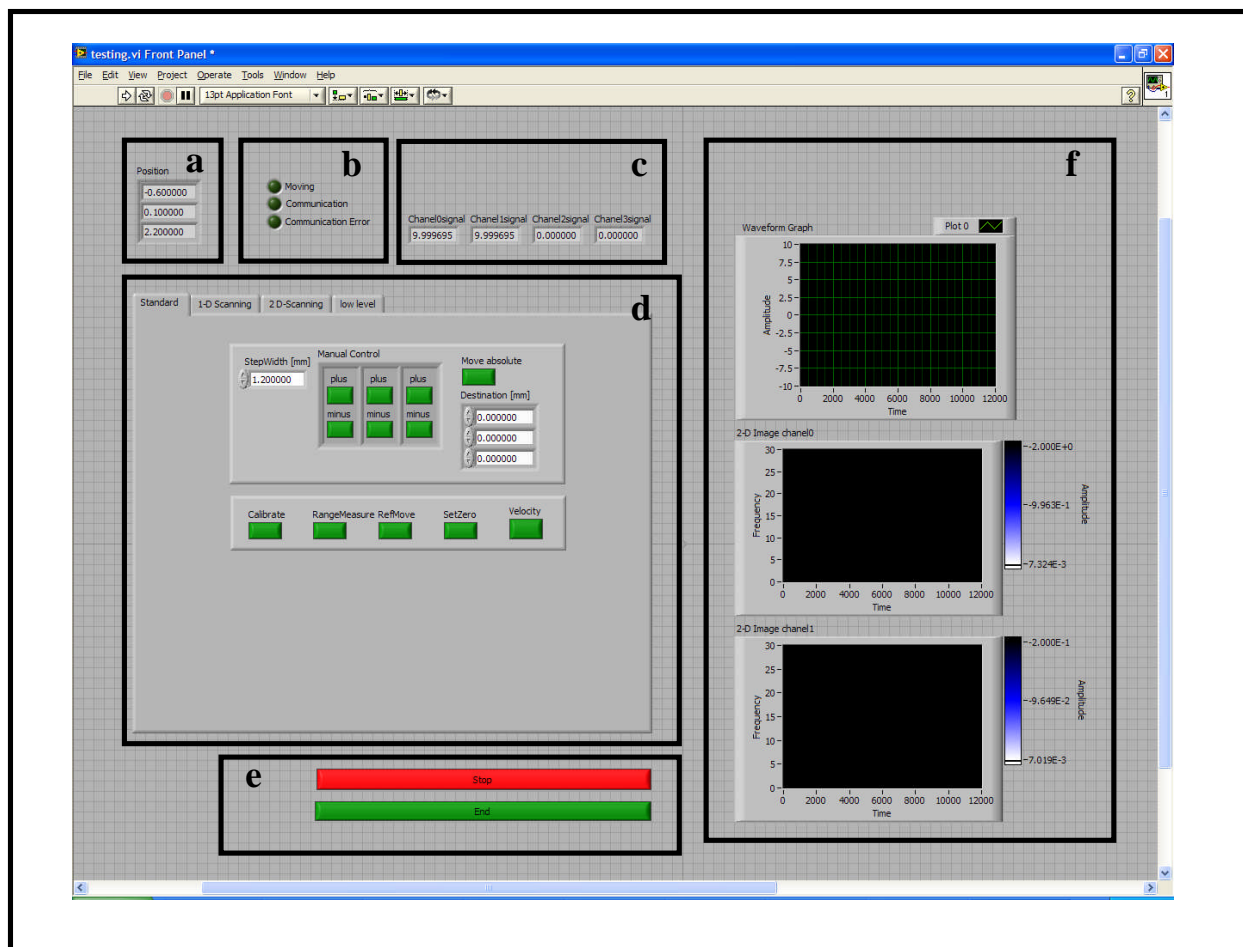
Comme le balayage échantillon permet des translations sur de grandes distances, ce balayage était particulièrement pertinent pour « découvrir » globalement la cornée

Ainsi le programme associé a été pensé de telle façon qu'il permette :

- un déplacement de l'échantillon sans acquisition juste pour pouvoir se positionner dans une zone d'intérêt ;
- une acquisition 1D le long d'un axe, donc le plus souvent le long de l'axe de la cornée ;
- une acquisition 2D qui pouvait combiner librement deux des trois axes même si typiquement le balayage échantillon était principalement utilisé dans ce cas pour des observations transversales.

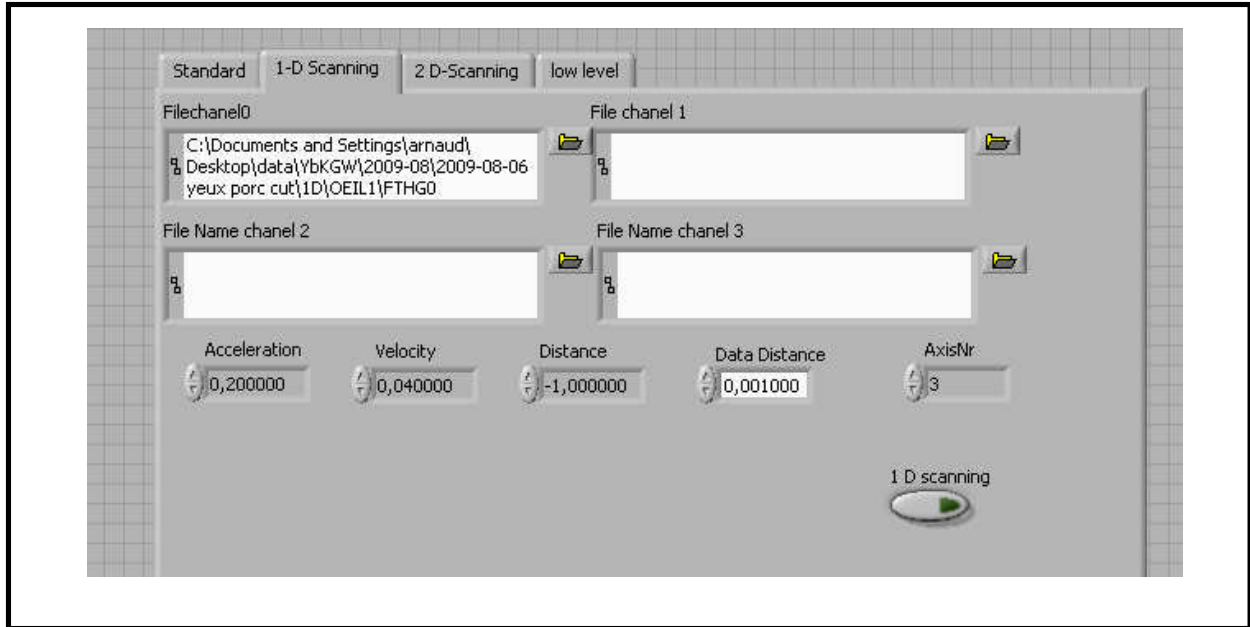
Les deux pages suivantes présentent d'une part l'environnement général et d'autre part l'acquisition 1D et les paramètres associés.

L'interface comporte ainsi des indicateurs de position, de voltage sur les différents canaux ainsi que des fenêtres graphiques pour contrôler tout de suite après l'expérience de mesure, la qualité de l'acquisition 1D ou 2D. Cependant les signaux sont définitivement traités (graphiques, images) avec un autre logiciel, en l'occurrence le logiciel Igor Pro 6.0.5.0 (wavemetrics, Lake Oswego, OR).



**Figure 5.10** Vue d'ensemble de l'interface LABVIEW pour le balayage échantillon

a : indicateurs de position ; b : indicateurs de connection ; c : indicateurs des voltages sur les différents canaux ; d : bloc de commande pour les déplacements, les acquisitions 1D et 2D ; e : commandes d'arrêt de l'expérience en cours ; f : graphes pour les acquisitions 1D et 2D.



**Figure 5.11**      **Détail de l'interface LABVIEW pour l'acquisition de profil 1D**

Le bloc d dans la figure 5.10, représente le tableau de commande que ce soit pour spécifier une position particulière avant le lancement d'une acquisition, lancer une acquisition 1D ou enfin 2D. La figure 5.11 présente justement le tableau de commandes pour un profil 1D. On y spécifie

- l'axe suivant lequel le profil doit être acquis (« AxisNr ») ;
- l'échantillonnage, i.e. le pas entre chaque mesure de voltage (« Data Distance ») en mm ;
- la distance (par exemple l'épaisseur de la cornée) sur laquelle l'acquisition doit être réalisée (« Distance ») en mm ;
- la vitesse à laquelle le balayage échantillon doit être effectué en (« Velocity »)  $\text{mm.s}^{-1}$ ,
- sur le balayage échantillon, l'accélération (en  $\text{mm.s}^{-2}$ ) devait être précisée. Elle était choisie de telle façon que la longueur d'accélération ou de freinage vaille quelques microns.

Ainsi l'acquisition est synchronisée au mouvement des platines via le programme.

En résumé l'algorithme pour l'acquisition 1D qui sert de base pour réaliser aussi les images peut se décomposer sous la forme suivante. LABVIEW offre un VI assistant d'acquisition pour interagir avec la carte d'acquisition. En particulier cet assistant a besoin des paramètres suivants : le nombre de points d'acquisition, la fréquence temporelle à laquelle ces points sont acquis et ce

qui déclenche l'acquisition. Ce même VI communique ensuite cette matrice de voltages qui est soit directement affiché par les graphiques proposés par LABVIEW soit enregistré dans des fichiers txt. pour une utilisation ultérieure. Ainsi pour une acquisition 1D, en spécifiant, comme illustré dans la figure 5.11 de l'interface utilisateur, ces quatre paramètres en plus de l'axe sur lequel le profil doit être effectué, il est possible de les combiner pour avoir les entrées nécessaires à l'assistant d'acquisition :

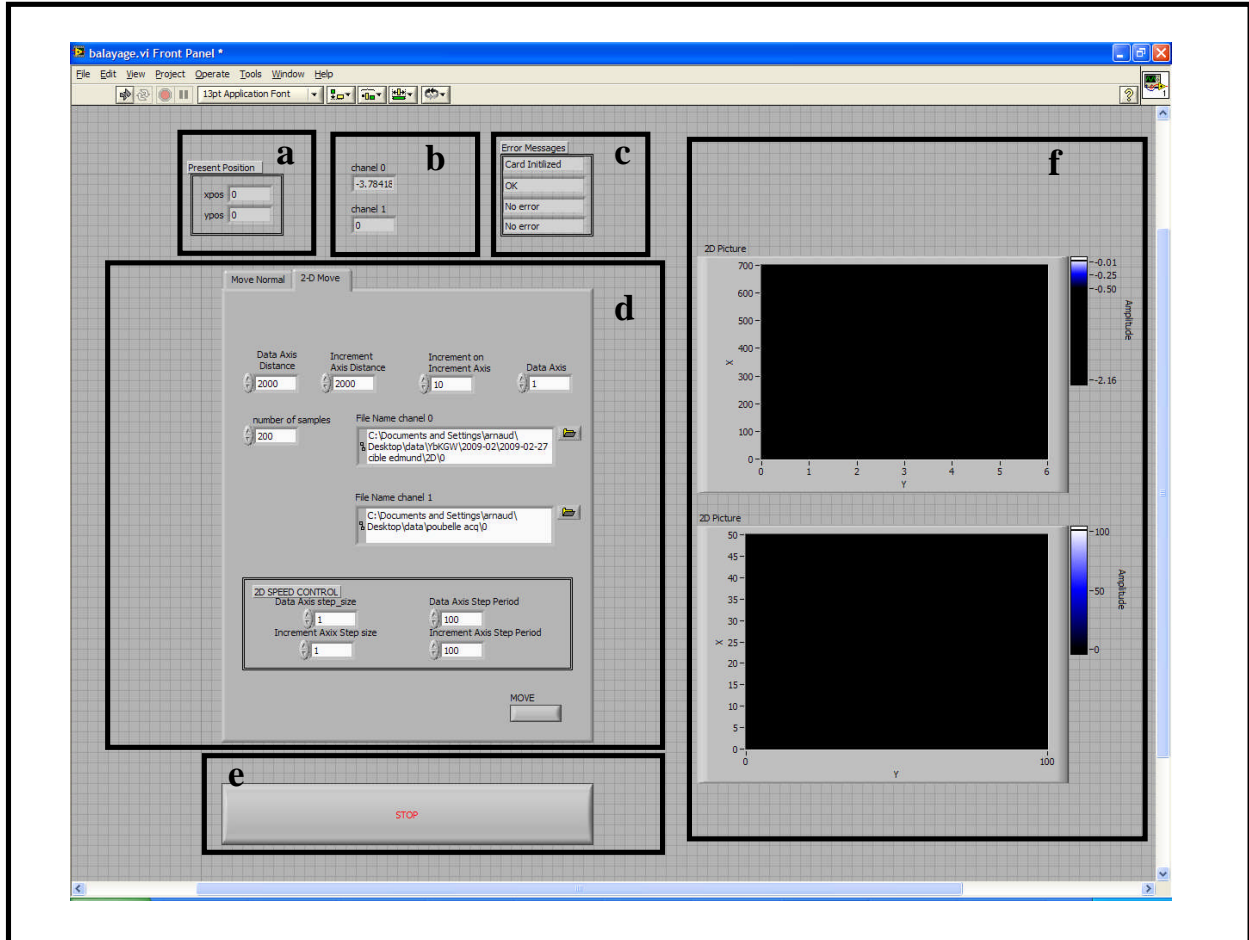
- le signal est acquis au moment où la vitesse spécifiée était atteinte et donc constante. Il est possible de calculer ce temps nécessaire et de le prendre comme entrée pour attendre le déclenchement de l'acquisition ;
- la valeur pour data distance divisée par celle de la vitesse donne la fréquence temporelle à laquelle les points doivent être acquis ;
- enfin en connaissant la distance sur laquelle la vitesse est constante, il vient la durée sur laquelle l'acquisition doit être faite et avec la fréquence d'acquisition que nous venons de mentionner il est possible de spécifier pour l'assistant d'acquisition le nombre de points total désiré sur le profil.

Ainsi pour réaliser une image il suffit d'utiliser cette même approche puisque l'acquisition n'est réalisée que sur un axe : aucun point de voltage n'est acquis sur la distance d'incrément séparant chaque ligne d'acquisition. Le balayage optique décrit plus bas présente justement l'interface utilisateur pour la réalisation des images dans ces expériences.



## Interface utilisateur pour balayage optique

Pour le balayage optique, la logique algorithmique est restée globalement la même avec le même cadre général illustré ci-dessous et un panneau de commande pour spécifier les paramètres pour le placement du faisceau et les acquisitions 2D.



**Figure 5.12** Vue d'ensemble de l'interface LABVIEW pour le balayage optique

a : indicateurs de position ; b : indicateurs des voltages sur les différents canaux ; c : indicateurs de connexion ; d : bloc de commande pour les déplacements et les acquisitions 2D (voir page suivante) ; e : commande d'arrêt de l'expérience en cours ; f : graphes pour les acquisitions 2D.

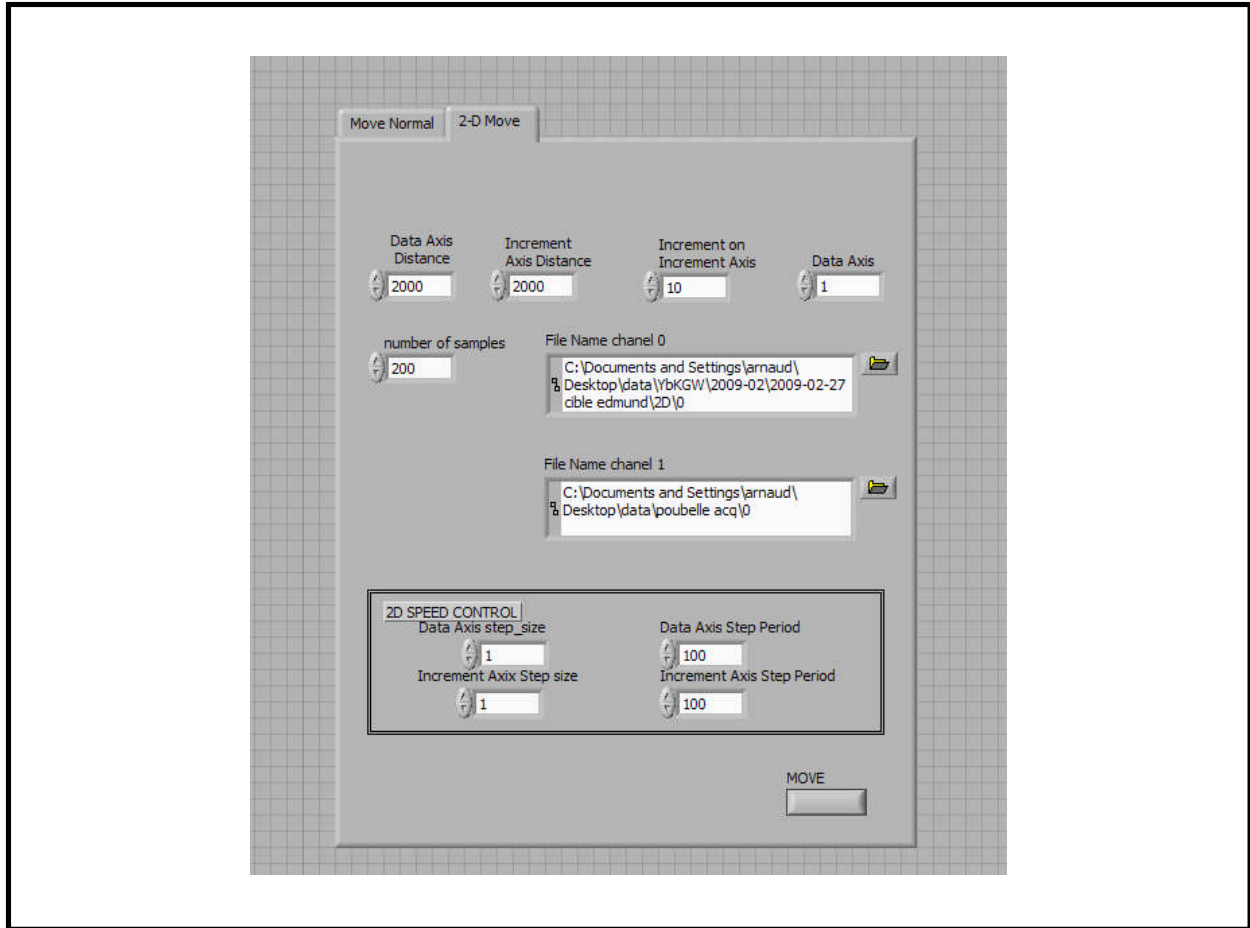


Figure 5.13 Détail de l'interface LABVIEW pour l'acquisition de profil 2D

Pour les acquisitions d'image, les commandes étaient donc les suivantes

- la distance sur laquelle l'acquisition doit être réalisée (« data axis distance ») est ici donnée en bits sachant que expérimentalement nous avons 4000 bits pour 48  $\mu\text{m}$  (voir l'annexe A) ;
- l'axe suivant lequel le profil doit être acquis (« data axis ») (dans la mesure où le balayage optique n'est à utiliser que pour des images *en face* l'axe n'est à choisir qu'entre x ou y (1 ou 2) et l'autre est par défaut celui d'incrément) ;
- l'échantillonnage est sur le « data axis » fixé par « number of samples » qui rapporté à la « data axis distance » permet d'avoir le pas d'échantillonnage. Sur l'axe d'incrément, il est défini en bits (« increment on increment axis »). Dans les images que nous avons

réalisées nous avons toujours fait le même échantillonnage suivant les deux directions, donc de 240 nm (voir expériences sur cornée reconstruite du chapitre7) ;

- Enfin la vitesse est donnée par les rapports de « step size » (pour l'un ou l'autre axe) en bits et « step period » en  $\mu\text{s}$ . Ainsi la vitesse à laquelle nous balayions l'échantillon suivant le « data axis » était de  $125 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Pour ce balayage, il n'y avait pas à paramétrer l'accélération si bien que dans l'algorithme, l'acquisition débutait dès la mise en mouvement du miroir contrôlant le balayage suivant le « data axis ».

### 5.3 Conclusion

Ce chapitre a été l'occasion de décrire les différents éléments de notre microscope et de justifier les choix autant méthodologiques que matériels que nous avons fait dans ce but d'imagerie cornéenne. Les résultats que nous allons présenter à présent vont offrir l'opportunité de mesurer les capacités de notre microscope pour ces applications ophtalmiques.



## 6 L'IGSH/IGTH COMME OUTIL D'OBSERVATION ANATOMIQUE DE LA CORNÉE

Lorsque nous avons commencé les expériences d'imagerie sur la cornée, ce qui nous importait particulièrement était de savoir si en plus du stroma que nous connaissions par la littérature pour être très bien imagé par la seconde harmonique, la troisième harmonique allait pouvoir révéler les couches restantes, i.e. l'épithélium, la membrane de Descemet et l'endothélium. Comme nous l'avons vu précédemment la membrane de Bowman n'est pas présente chez le porc mais serait bien observable par IGSH chez l'humain. Dans cette démarche d'imagerie anatomique, la référence est bien évidemment les clichés qui s'obtiennent en histologie où les différentes couches sont bien contrastées par le jeu des colorants utilisés (voir fig. 2.9 du chap. 2.2.1). Méthodologiquement il était donc particulièrement approprié d'acquérir des images de GSH/GTH transversalement pour avoir ce même repère d'observation. C'est pour cette raison que les acquisitions qui ont mené aux résultats présentés dans ce chapitre mais aussi dans la plupart des autres travaux que nous avons menés ultérieurement, ont été réalisées par déplacement des platines de translation x,y en plus bien évidemment du balayage z. Ainsi les images se construisaient en scannant z sur l'épaisseur désirée, généralement grande pour y observer plusieurs couches cornéennes, et l'incrémentation était opérée suivant x (ou y). Cependant ce protocole pouvait aussi convenir pour imager des zones plus restreintes (typiquement de  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ ) qui cadrerait davantage pour une imagerie cellulaire. Cette suffisance du balayage échantillon, malgré l'implication d'une certaine lenteur d'acquisition, a justifié que l'implémentation du balayage optique soit venue assez tardivement puisque mis à part les travaux sur la cornée artificielle, le besoin n'était pas crucial pour les applications qui nous intéressaient.

Cependant alors que la coupe histologique a la particularité de présenter l'échantillon à plat (une petite portion est prélevée sur la cornée pour la préparer à l'observation), l'imagerie *ex vivo* permise en microscopie d'harmonique permet de rajouter la dimension de la courbure si caractéristique de la cornée réelle et qui *a priori* peut poser certains défis d'observation. L'IGSH/IGSTH nous permettait donc aussi dès les premiers travaux de révéler la topographie de la cornée et nous offrir un but, en l'occurrence « dessiner » cette courbure, simple.

Avec ces travaux d'observation de la cornée intacte (Brocas *et al.*, 2008, Jay *et al.*, 2008), par opposition à celle artificielle ou celle opérée chirurgicalement, l'autre enjeu important fut également de se comparer à l'imagerie de fluorescence 2P. En effet, comme nous l'avons abordé succinctement dans le chapitre sur la microscopie de GSH sur la cornée (voir le chap. 3.4.5), cette fluorescence non-linéaire, avant nos travaux, était la méthode employée couramment comme complément de l'IGSH pour observer le reste de la cornée car l'IF2P peut aussi être utilisée en condition de tissu frais. Cependant la fluorescence 2P a quelques désavantages et ultimement laissait une ambiguïté dans l'imagerie transversale de la cornée. Décrivons ces problèmes associés à l'IF2P, comme introduction de l'intérêt de l'IGTH pour l'observation anatomique de la cornée.

## 6.1 Imagerie de fluorescence 2P dans la cornée

L'IF2P a naturellement été appliquée à l'observation de la cornée, étant la microscopie non linéaire la plus établie historiquement. Naturellement il est possible d'exploiter des fluorophores bien connus comme marqueurs de cellules pour révéler les autres couches cornéennes. Il est par exemple possible d'exploiter, avec le laser Ti:Sa, le marqueur Alexa qui révèle l'actine (surtout concentrée le long des membranes cellulaires (Wikipedia, 2012j)) et le marqueur Syto red qui révèle les noyaux cellulaires. Cependant dans ces travaux (Morishige *et al.*, 2006) il est encore nécessaire de faire une préparation lourde pour réaliser ces marquages et ceci va à l'encontre de l'objectif d'une méthode non invasive. D'autres problèmes liés au marquage en conditions physiologiques ont déjà été évoqués à l'occasion du chapitre 2.2.1.

Dans ce contexte, le signal de fluorescence qui reste donc intéressant à exploiter est l'autofluorescence. En effet, l'autofluorescence, qui habituellement est un bruit de fond<sup>16</sup> (Chu *et al.*, 2001) dont on cherche à se débarrasser au profit de l'émission des marqueurs qu'on a introduits, peut être ici un atout pour une possible imagerie clinique de la cornée. Quelques molécules endogènes connues peuvent justement fournir, dans la cornée, ce signal.

Voyons alors pourquoi il reste cependant intéressant d'explorer une autre méthode que l'IF2P en complément de l'IGSH pour l'observation de la cornée. En fluorescence, contrairement à la génération d'harmoniques, la source doit correspondre au spectre d'excitation des molécules qui

16 : en IGSH/IGTH, les harmoniques sont générées, dans notre cas, sous une excitation au-dessus de 1000nm, ce qui prévient de ce problème de bruit de fond en plus de celui de la phototoxicité (cf. chap. 5.2.2 6)).

sont exploitées. Quelles sont les molécules endogènes qui peuvent être exploitées dans la cornée ?

Les seules molécules présentes dans l'organe qui permettent la fluorescence 2P sont celles qui sont communes à toutes les cellules. En effet, les porphyrines, molécules bien connues pour posséder de bonnes émissions de fluorescence d'ailleurs utilisées comme fluorophores, sont exclues d'une exploitation pour l'imagerie 2P de la cornée : leur fonction est associée aux globules rouges et, comme nous l'avons dit au chapitre dédié à la cornée, la cornée saine n'est pas vascularisée. D'autres molécules naturelles qui peuvent aussi être exploitées en fluorescence endogène comme l'élastine ou la mélamine (Zipfel *et al.*, 2003a) ne sont pas présentes dans la cornée (Wikipedia, 2012c, Wikipedia, 2012h). Le collagène est lui aussi fluorescent avec une excitation 2P autour de 730 nm (Zoumi *et al.*, 2002) et il y a d'ailleurs le risque de son photoblanchiment en travaillant avec le Ti:Sa. Par ailleurs, l'actine qui est une protéine largement répandue dans les cellules, et fluorescente, est aussi rapidement à exclure de la microscopie non linéaire ayant son pic d'excitation en 1P à 290 nm, ce qui exclue une possibilité de 2P et même de 3P : les spectres d'excitation non linéaire sont quand même proche du multiple associé à l'ordre.

Ainsi les molécules pouvant être réellement exploitées, i.e. avec un oscillateur Ti:Sa ou de longueur d'onde supérieure, en microscopie cellulaire F2P sont des molécules métaboliques (Tromberg, 2008).

- la molécule nicotinamide adénine dinucléotide, NAD (et sous sa forme réduite NADH) et le composé très proche NADP (P pour phosphate) sont des coenzymes présents dans toutes les cellules permettant le transfert des électrons pendant les réactions d'oxydo-réductions du métabolisme de formation de l'adénosine triphosphate (ATP) ;
- les flavoprotéines et plus précisément l'espèce chimique flavine adénine dinucléotide, FAD (donnant par réduction FADH<sub>2</sub>) joue la même fonction que NAD et NADP (Wikipedia, 2012d).

Ces molécules sont localisées dans le cytosol. Elles sont aussi dans les mitochondries, de dimension autour du micron, elles-mêmes dispersées parmi le cytoplasme (en moyenne un millier par cellules (Wikipedia, 2012i)). Ainsi en exploitant le signal de ces molécules, on peut révéler le contenu de la cellule à l'exclusion de son noyau (Konig *et al.*, 2004).

Spectrométriquement, NAD(P)H et FAD ont pratiquement les mêmes spectres d'excitation en 2P : ils sont excités de façon optimale à 730 nm. Cependant FAD possède un second pic plus léger d'excitation à 900 nm. Au-delà (dès 1000 nm) aucune des deux molécules ne peut produire du 2P (Huang *et al.*, 2002). Ces caractéristiques font que le laser optimal pour exploiter cette fluorescence est le laser Ti:Sa dont nous avons déjà parlé dans la partie méthode (voir le chap. 5.2.1 1)).

Ainsi le grand avantage des imageries d'harmoniques consiste justement à ne pas être tributaire d'un spectre d'excitation. Ceci permet en particulier d'exploiter davantage le domaine infrarouge pour y bénéficier de la réduction de l'effet de diffusion dégradant les images de profondeur.

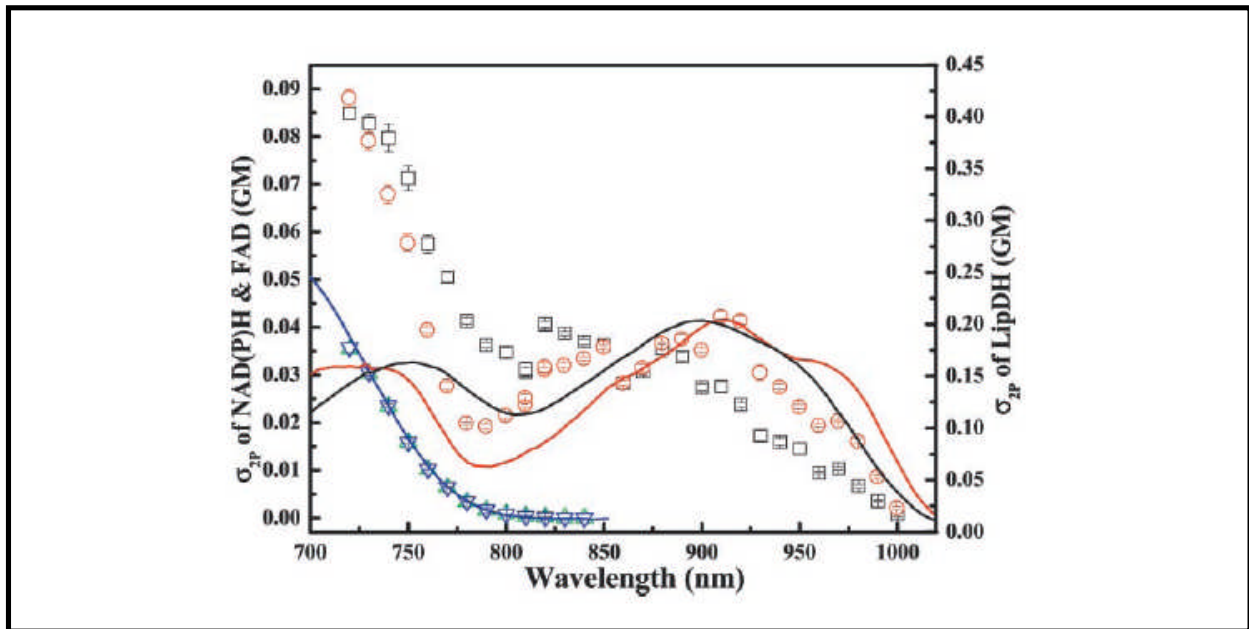


Figure 6.1 Spectrométrie des fluorophores endogènes métaboliques

Ce graphique présente plusieurs sections efficaces 2P en fonction de la longueur d'onde de la fondamentale. En particulier : NADH et NADPH correspondent respectivement aux triangles verts et bleus inversés. FAD est en carrés noirs. Les courbes d'absorption 1P pour NADH et FAD, doublées en longueur d'onde d'excitation, sont respectivement : ligne bleue et ligne noire. GM : unité Göppert-Mayer 1 GM= $10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s}/(\text{photon} \cdot \text{molécule})$

Cette figure est tirée de la source : (Huang *et al.*, 2002)



## **Qu'est-ce que la fluorescence 2P permet alors d'observer de la cornée ?**

Il faut reconnaître, qu'en dehors du collagène stromal, les constituants restants de la cornée sont principalement des cellules. Les fluorophores cités précédemment sont donc susceptibles de révéler : l'épithélium, les axones<sup>17</sup> des nerfs situés près de l'épithélium ou dans la couche de Bowman (voir le chap. 2.1.2 2), les fibroblastes/kératocytes qui peuvent avoir une forte activité métabolique lorsque qu'ils sont sollicités pour des cicatrifications, et enfin l'endothélium.

Ces couches cellulaires ou cellules isolées ont été imagées avec succès dans les travaux de recherche ayant combinés l'IGSH et l'IF2P (Lyubovitsky *et al.*, 2006, Steven *et al.*, 2008, Teng *et al.*, 2006, B. G. Wang *et al.*, 2008, Yeh *et al.*, 2002). Il faut, par ailleurs, mentionner que la reconnaissance et la localisation des cellules cornéennes sont grandement facilitées par cette anatomie relativement simple de la cornée en couches que les méthodes histologiques avaient éclaircie. L'épithélium et l'endothélium sont des couches cornéennes strictement cellulaires et l'endothélium est monocellulaire et bien séparé du reste de la cornée par la membrane de Descemet. Dans le stroma, les seules cellules sont des fibroblastes/kératocytes avec cette forme très caractéristique, allongée et excluant à cet endroit la présence de collagène. Dans la plupart des études d'imagerie non linéaire de la cornée, les équipes n'ont d'ailleurs pas corrélé leur imagerie non linéaire avec des méthodes classiques de microscopie tant ces repères géométriques et morphologiques sont solides pour permettre à eux seuls l'identification. Ainsi, Pour nos propres études IGSH/IGTH, nous aurons utilisé ces mêmes indices anatomiques pour identifier ces cellules.

Cependant, en consultant l'état de l'art de l'imagerie non linéaire IGSH/IF2P, nous avons constaté que certains points anatomiques demeuraient ambigus.

### **Le cas particulier de la membrane de Descemet**

En particulier nous observions dans la littérature en imagerie non linéaire que la membrane de Descemet ne pouvait pas être correctement identifiée et différenciée de l'endothélium. Plusieurs études réunissaient sous une même appellation ces deux couches postérieures.

En effet, malgré le fait que la membrane de Descemet contienne du collagène, nous savons que celui-ci, de par sa nature essentiellement globulaire n'est pas en mesure de générer la SH. C'est pour cette raison que sous le stroma, le seul signal qui pourrait être exploité serait justement la

17 : Même si ces axones ont dans leur cytoplasme les sources nécessaires au 2P, ils sont de très petit diamètre (non résolvable) et difficilement visibles de par leur dispersion au sein du tissu.

F2P. Si l'endothélium est bel et bien une couche essentiellement cellulaire, la membrane de Descemet, en revanche, est complètement dépourvue de cellules. Par exemple Teng *et al.* (2006) ne peuvent pas identifier clairement la membrane de Descemet de l'endothélium car le niveau de signal d'autofluorescence reste à peu près le même sur ces deux dernières couches cornéennes. Cette ambiguïté pose par ailleurs la question de savoir, dans ce cas, quelle est la source d'autofluorescence dans la membrane de Descemet alors que l'excitation est faite avec le même laser. Évidemment, on peut toujours finir par savoir à quel moment se fait l'entrée dans l'endothélium puisqu'à ce moment les formes typiques cellulaires apparaissent mais comme nous l'avons vu le contraste en coupe transversale est très important pour un ophtalmologiste et nous verrons que la troisième harmonique permet, sur cette question, un grand confort pour révéler les positions des couches. Nous pouvions donc espérer que l'IGTH, en jouant sur des principes de contraste très différents (interfaces/inhomogénéités) de ceux exploités en fluorescence, fournisse un nouvel éclairage macroscopique sur l'anatomie stratifiée de la cornée mais aussi une observation fine de chacune des couches. Le tableau 2 permet d'avoir une vue d'ensemble sur les différences théoriques entre la microscopie de F2P et celle de GTH sur la base de ce que nous avons dit sur les chapitres 4.3.1, 5.2.2 6) et ici.

## 6.2 Objectifs

Ainsi pour ces premiers travaux nous désirions savoir si le signal de TH couvrirait, pour un animal dont la cornée est connue pour être épaisse, toute l'épaisseur de l'organe et ceci jusqu'à la plus profonde (l'endothélium). Deux types d'imagerie étaient à réaliser. Une imagerie macroscopique permettant d'observer la cornée dans son ensemble comme peut l'offrir la TCO. Sur cette échelle nous voulions aussi vérifier si le microscope pouvait réaliser des mesures importantes comme la pachymétrie. Une imagerie de bonne qualité à l'échelle microscopique, que ce soit sur les cellules (épithélium, kératocytes) où plus particulièrement sur les fines couches postérieures où de nombreux enjeux chirurgicaux, nous intéressait également.

	Imagerie GTH	Imagerie F2P
marquage, source de signal	Ne requiert pas de marquage : les sources de signal sont des interfaces optiques entre milieux de $n$ ou $\chi^3$ différents.	Nécessite le plus souvent des fluorophores exogènes pour leur fort rendement quantique. En autofluorescence quelques molécules existent cependant. Dans la cornée l'IF2P est exploitée sur les molécules métaboliques.
toxicité	Processus élastique, sans absorption. Risque de dommages par dépassement du seuil d'ablation.	Processus impliquant l'absorption : risque de phototoxicité limitant la puissance d'excitation Risque d'interférence chimique dans le cas des fluorophores exogènes.
longueur d'excitation	Peu sensible.	Spectre d'excitation restreignant le type de laser.
pénétration dans le tissu	Très bonne puisque l'excitation est dans l'IR (généralement au-dessus de 1000 nm) et l'émission dans le visible ou le proche UV.	Très bonne puisque l'excitation est dans l'IR et l'émission dans le visible.
résolution spatiale	Très bonne : - centaine de nm transversalement - autour du $\mu\text{m}$ axialement.	Très bonne : - centaine de nm transversalement - autour du $\mu\text{m}$ axialement.
nature du signal émis	Cohérent : implique, en champ lointain, un diagramme de rayonnement anisotrope et dépendant de la mise en forme du faisceau et de l'échantillon. Signal presque instantané après l'excitation.	Incohérent : Implique, en champ lointain, un diagramme de rayonnement isotrope. Signal différé après l'excitation. Cette relaxation permet des études comme en FLIM <sup>18</sup> ou FRET <sup>18</sup> .
polarimétrie	Études intéressantes car basées sur le tenseur $\chi^3$	Études peu développées car l'IF2P est surtout exploitée pour l'imagerie cellulaire

**Tableau 2 : Comparaison des principales caractéristiques en microscopie sur les phénomènes de F2P et GTH**

Enfin nous devons vérifier dans le contexte du projet médical BioFemtoVision, qui réclamait une vision à long terme pour le clinique, si le signal de TH allait pouvoir être détecté en quantité non négligeable dans la configuration d'épi-détection. En effet, plusieurs démonstrations expérimentales de collection de SH en épi-détection avaient déjà été réalisées et nous savions que ce signal mieux connu allait poser moins de problème que celui de TH pour cette configuration de détection.

18 : FLIM : Fluorescence-lifetime imaging microscopy (Imagerie de fluorescence résolue en temps)

FRET : Förster resonance energy transfer (transfert d'énergie par résonance de type Förster)

## 6.3 Méthodes

Comme nous l'avons décrit dans la partie méthode (voir le chap. 5.2.2 7)), les yeux de porc dont ont été prélevés les segments antérieur (ou cornées) ont toujours été utilisés le jour même de l'abattage. Cette condition de fraîcheur respectée par le mode de conservation que nous utilisons en attendant l'expérience d'imagerie, nous a toujours importé pour être au plus près de la situation *in vivo*. Mis à part les résultats d'imagerie cellulaire sur les couches postérieures (voir les fig. 6.7, 6.8 et 6.9), l'échantillon était monté en segment antérieur sur lame de microscope avec un détecteur en transmission directement sous l'échantillon (voir la fig. 5.7 (a)) et l'autre en épi-détection. Tous les résultats présentés dans ce chapitre ont été obtenus par balayage échantillon. Cette configuration est donc celle représentée en figure 5.2 sans la tête de balayage. Nous avons également mesuré l'épaisseur de la cornée centrale avec un pachymètre à ultrason (SP-3000, CBD Tomey, Phoenix, AZ) puisque cette technologie est encore considérée comme la référence pour les mesures d'épaisseurs cornéennes.

## 6.4 Résultats et discussion

### 6.4.1 Étendue de la détection des signaux de SH et TH sur la cornée porcine

Nous avons déjà pu détecter la SH en utilisant un objectif sec en focalisation. Par sa simplicité d'usage (entre autres la tenue du ménisque de médium n'a pas à être surveillée surtout sur une surface courbe comme peut en offrir l'œil), ce fut donc, aussi avec cette optique, que nous avons d'abord essayé de détecter la TH. Le résultat de cette expérience qui fut menée avec l'objectif Zeiss sec ON (voir le chap. 5.2.2 7) c)) est présenté avec la figure 6.2. Ce graphe est un relevé des deux signaux suivant  $z$  (voir le chap. 5.2 fig. 5.2 pour les repères utilisés pour les scans). La SH est en épi-détection et la TH en transmission. Ce graphe qui a été acquis dans la partie antérieure de la cornée, a surtout pour intérêt de montrer que la TH, alors qu'elle devrait être avantagée dans cette configuration en transmission, n'est pas générée au-delà de la surface cornéenne où elle produit en revanche un très fort signal. La SH révèle quant à elle normalement le stroma. Son signal est infléchi d'une décroissance progressive avec la profondeur.

Ce résultat est en adéquation avec ce que nous avons vu dans la partie théorique et en particulier sur l'équation 66. En effet, de façon simple la cornée sépare à cet endroit l'air à l'extérieur et du

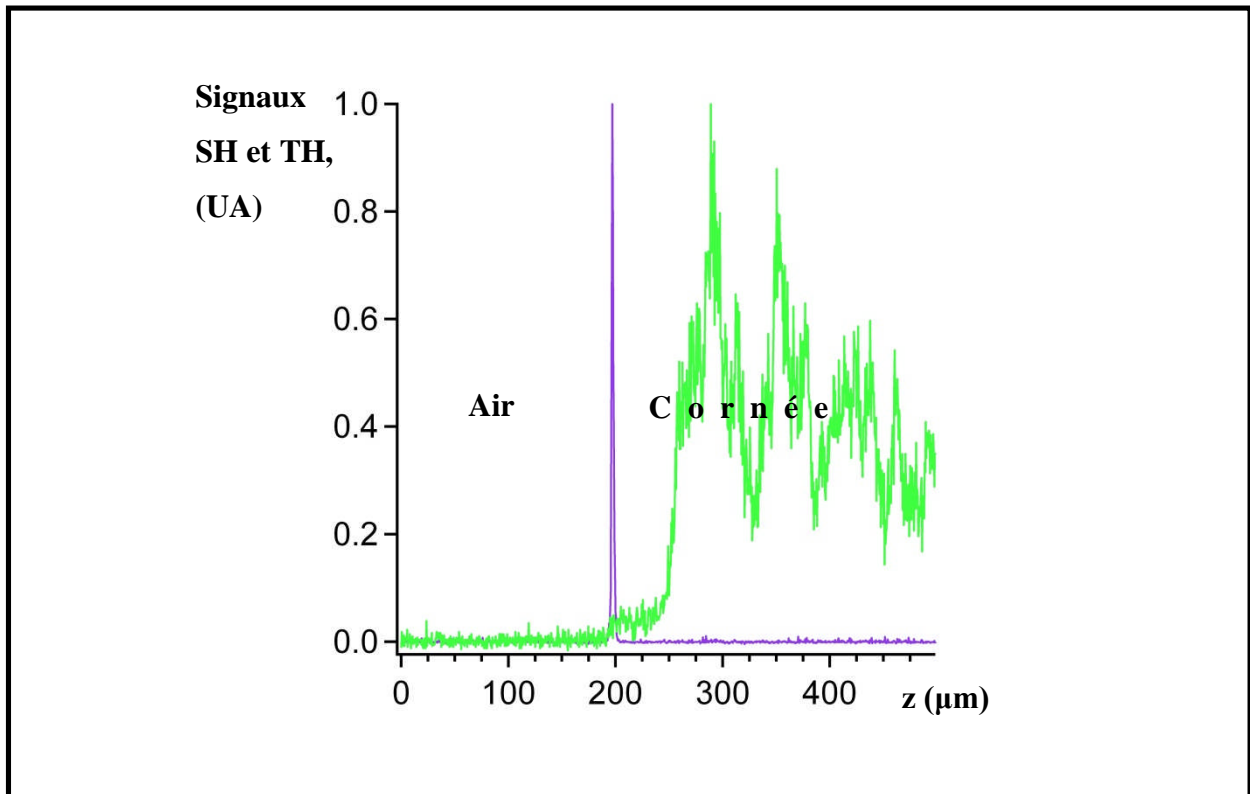
milieu biologique. Or, l'air a une dispersion très faible ainsi qu'une faible valeur de son  $\chi^3$  (Thalhammer *et al.*, 1983). Ces valeurs contrastent avec celles des milieux biologiques (Débarre *et al.*, 2006) et permettraient d'expliquer ce fort signal de TH pour ce type d'interface avec l'air. Cependant la raison pour laquelle le signal de TH à l'intérieur de l'échantillon est faible, est difficile à expliquer dans la mesure où il faut par ailleurs prendre en compte les phénomènes d'optiques linéaire : il se pourrait que la réflexion de Fresnel, importante dans ce cas, limite la puissance de la fondamentale pour sonder plus profondément. Il faudrait alors une puissance bien plus forte d'excitation pour parvenir à obtenir un signal ailleurs qu'à la surface avec des risques de dommages. Nous avons déjà parlé de ce problème à l'occasion du chapitre sur la microscopie spéculaire (voir le chap. 2.2.2 1) b)). Nous aurons l'occasion de revenir sur ces phénomènes dans le chapitre 8 sur les résultats de chirurgie de la cornée.

L'observation de la TH qui n'est pas possible au-delà de la surface cornéenne avec l'objectif sec, le devient lorsque nous avons justement répété la même expérience avec l'objectif à immersion à eau comme condenseur (fig. 6.3). Comme nous l'avons déjà évoqué dans le chapitre 5.2.2 7), le médium n'était pas exactement de l'eau mais un gel ophtalmique.

Les cellules ont un indice de réfraction bien plus près de celui de ce gel que de l'air (voir le chap. 2.1.2 3)). Un tel médium a donc avantage optiquement l'excitation et non la détection de l'émission, ces deux graphes étant acquis dans la même configuration de détection (TH en transmission). Le gel permet une meilleure transmission de la fondamentale puisque la réflexion sur la surface cornéenne est réduite par rapport au cas avec l'air. Or nous savons que la TH est plus sensible à la puissance excitatrice que la SH dans la mesure où le premier est du ressort du troisième ordre et l'autre du second. D'une façon plus subtile le médium gel réduit les aberrations optiques et la diffusion que la surface de la cornée, par sa rugosité, peut induire. Ces aberrations et problèmes de diffusion peuvent aussi handicaper l'excitation pour générer l'harmonique.

La figure 6.3 apporte la preuve de cette amélioration avec l'immersion, où les signaux détectés dans les mêmes conditions, SH en épi-détection et TH en transmission, couvrent cette fois-ci toute l'épaisseur de la cornée même si, pour les deux signaux, il y a encore une fois cette enveloppe de décroissance qui, en fait, est due plus à la diffusion (même pour une cornée saine) qu'à l'absorption (voir le chap. 2.1.2 3) et la fig. 2.4) (Meek *et al.*, 2003a). Nous pouvons déjà avoir par ce graphe, une première confirmation que la cornée est bien révélée dans son entièreté

puisque les épaisseurs mesurées depuis le graphe et celles obtenues par pachymétrie donnent des résultats très proches. En effet, si on calcule sur la figure 6.3, la distance entre le premier pic de TH (interface gel ophtalmique/cornée) et le dernier pic de TH (interface cornée/humeur aqueuse) on obtient  $953 \pm 4 \mu\text{m}$ . Or la pachymétrie donnait pour le même échantillon  $922 \pm 5 \mu\text{m}$ . Même si les valeurs ne sont pas exactement égales, ces épaisseurs concordent dans la mesure où il n'est pas évident de se placer au même endroit dans les deux cas : pour le pachymètre on utilise une sorte de stylet qu'on vient placer à la main au contact de la cornée.

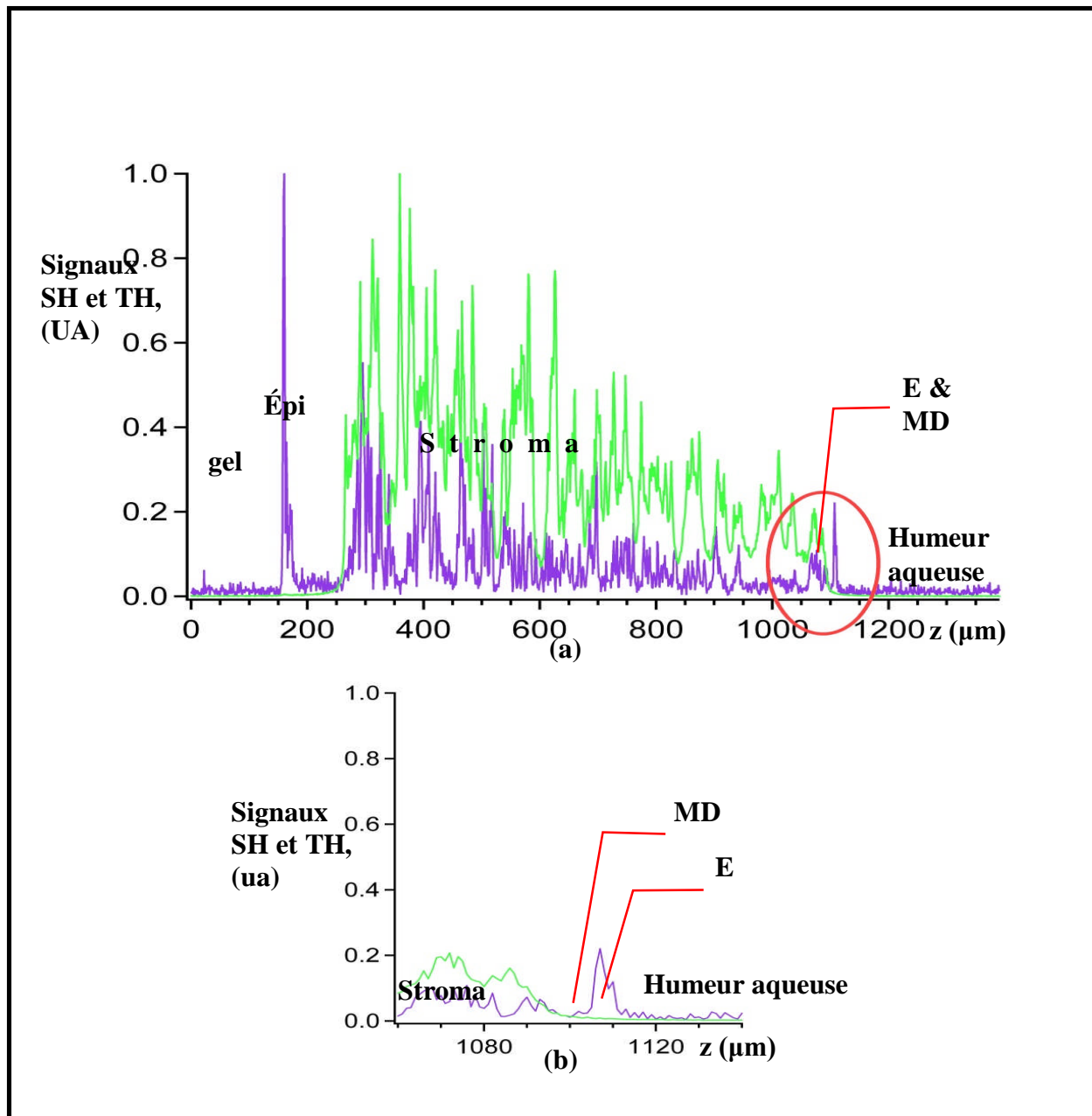


**Figure 6.2** Profil 1D SH/TH sur une cornée porcine fraîche avec un condensateur sec

Objectif Zeiss ON 0.75 sec suivant le montage de la figure 5.7 pour collecter en transmission vers le PM<sup>19</sup>.

SH (vert) en épi-détection et TH (violet) en transmission. Aucun signal de TH ne parvient à être détecté au-delà de la surface cornéenne.

<sup>19</sup> : sur les autres figures, je mentionne, comme ici, juste l'objectif condensateur mais si rien n'est dit sur la collection, c'est qu'elle est réalisée sans objectif collecteur directement avec le PM sous l'échantillon.



**Figure 6.3** Profil 1D SH/TH sur toute l'épaisseur d'une cornée porcine fraîche avec un condenseur à immersion à gel ophtalmique avec TH en transmission et SH en épi-détection

Objectif Olympus ON 0.9 avec immersion au gel ophtalmique. SH (vert) en épi-détection et TH (violet) en transmission. (a) contrairement au cas sec, la TH est détectée en transmission sur toute l'épaisseur de la cornée. (b) est un zoom du graphe (a) sur les couches postérieures de la cornée.

MD : membrane de Descemet ; E : endothelium ; Épi : épithelium.

Par ailleurs la pachymétrie était prise avant que l'œil ne soit séparé en segment antérieur (il était dur de la mesurer une fois l'opération effectuée) et il se peut que la chute de pression intraoculaire impliquée et une certaine oedémisation soit à l'origine d'une augmentation de l'épaisseur cornéenne (Keuch *et al.*, 1999, I. Sanchez *et al.*, 2011). De toute façon, la cornée et ses couches la composant, ne peuvent être complètement clarifiées que par l'acquisition des images transversales.

Avant cela, il était également important de voir ce qu'allait donner l'épi-détection de TH et la figure 6.4 présente la même acquisition suivant z avec cette configuration. Même s'il est difficile de se prononcer sur la part de contribution par les réflexions cornéennes, qui, on le sait, sont à l'origine des signaux détectés par exemple en TCO ou en microscopie spéculaire (images de Purkinje), l'important fut de vérifier que le signal de SH (voir la fig. 6.3) et ce qui était moins sûr celui TH (voir la fig. 6.4), pouvaient rester suffisamment forts pour qu'une application *in vivo* soit envisageable.

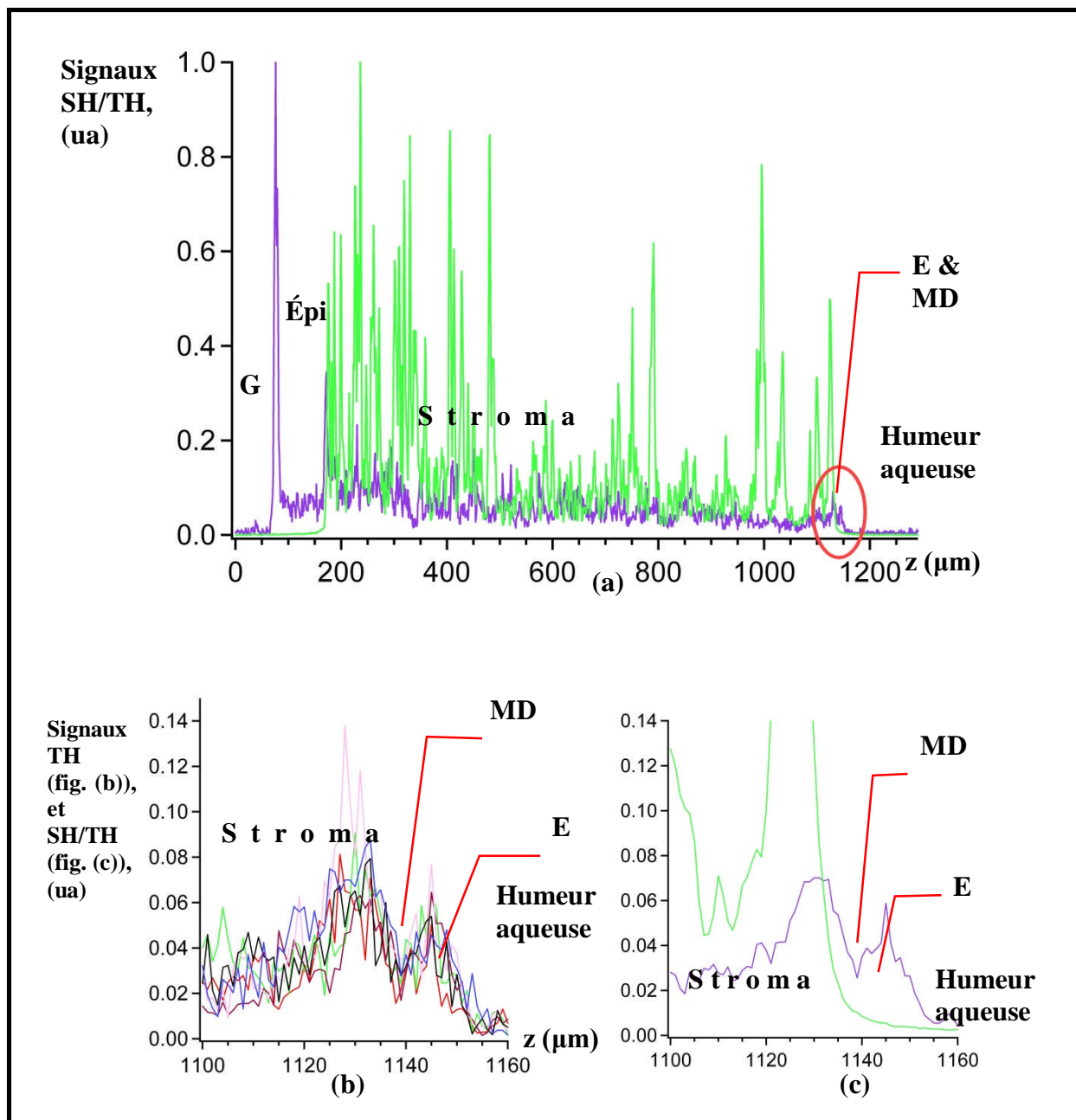
Cette condition vérifiée, nous pouvions commencer à faire des images. Les images présentées par la suite ont quand même été, la plupart du temps, acquises avec la TH en transmission car le signal était plus fort. Cependant comme nous l'avons discuté avant dans le chapitre concernant les méthodes, il aurait été possible d'augmenter le rapport S/B en faveur de la TH épi-détection si par exemple nous avions utilisé une amplification synchrone.

#### **6.4.2 IGSH/IGTH de la cornée porcine à l'échelle macroscopique**

Au début de nos travaux, les images que nous avons en référence sur des cornées fraîches étaient celles obtenues par TCO. Le modèle de TCO était le OCP930SR de Thorlabs. Ses champs axiaux et transversaux étaient fixés respectivement à 1.6 mm et 6.0 mm.

Les figures 6.5, qui ont été acquises sur des cornées porcines fraîches, ont donc ces dimensions. Le constructeur spécifiait dans l'air une résolution axiale autour de 6.2  $\mu\text{m}$  et latérale de 15  $\mu\text{m}$ . Mis à part le fait que le repliement de l'image soit un artéfact venant du produit, on distingue trois structures : la plus antérieure peut sans aucun doute être identifiée comme étant l'épithélium. Au plus profond, en revanche, il ne semble n'y avoir qu'une couche.





**Figure 6.4** Profil 1D SH/TH sur toute l'épaisseur d'une cornée porcine fraîche avec un condenseur à immersion à gel ophtalmique avec SH en transmission et TH en épi-détection

Objectif Olympus ON 0.9 avec immersion au gel ophtalmique. SH (vert) en transmission et TH (violet) en épi-détection. (a) la TH peut être épi-détectée sur toute l'épaisseur de la cornée. (b) est un zoom sur les couches postérieures de la cornée avec six profil juste de TH en épi-détection. (c) est le même zoom où les six courbes ont été moyennées (le signal SH en transmission est rajouté).

G : gel ; MD : membrane de Descemet ; E : endothelium ; Épi : épithelium

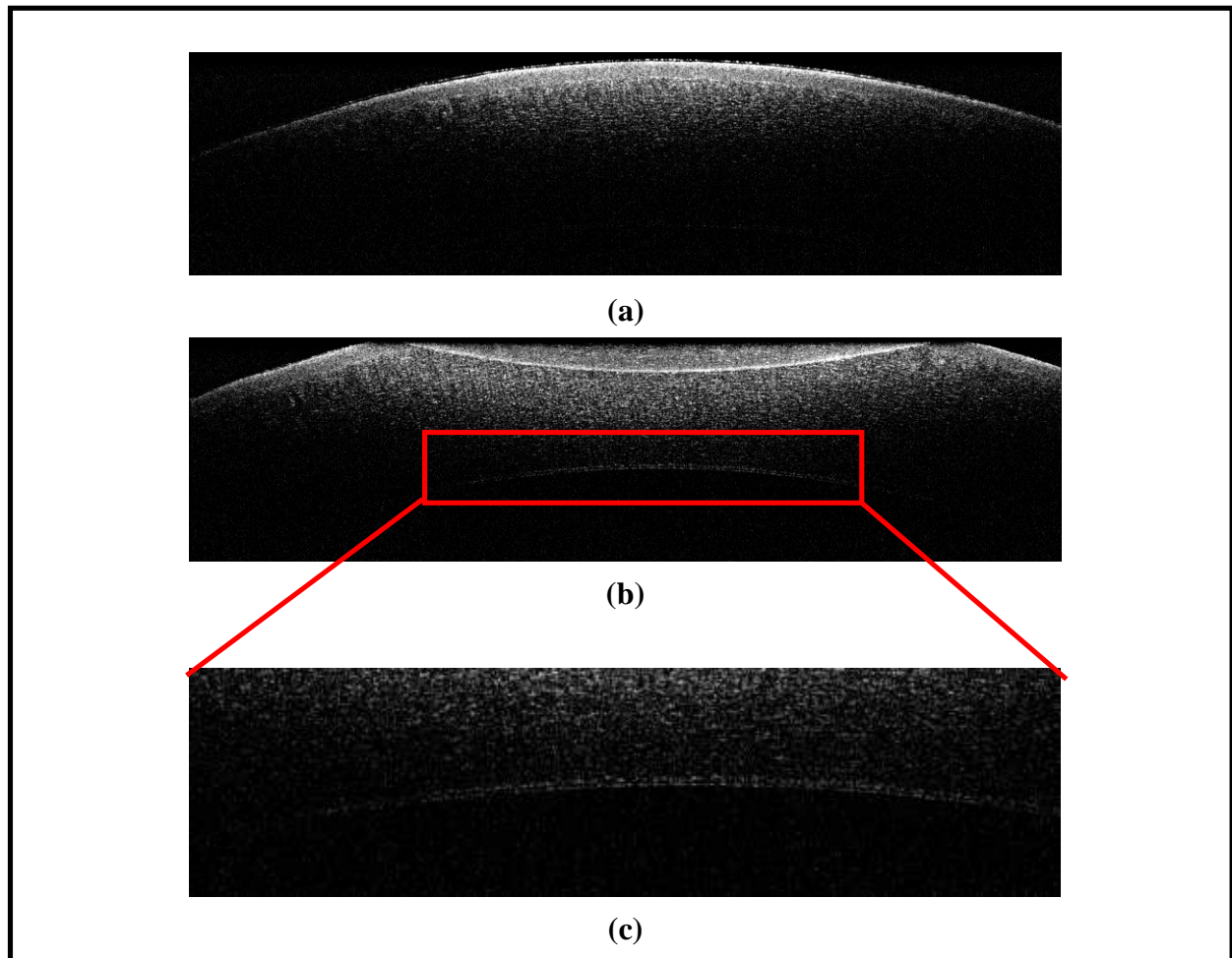
Sur la figure 6.6, nous voyons que l'IGSH/IGTH peut déjà fournir toutes les informations macroscopiques que la TCO donnerait. Notre méthode est donc, en particulier, en mesure de donner l'épaisseur de la cornée et sa topographie (i.e. son relief en surface). Enfin et surtout, l'IGSH/IGTH ayant une très bonne résolution axiale et un bon contraste, elle est en mesure de révéler les couches de la cornée. Par ailleurs, même si sur la figure présentée un choix délicat de saturation post-acquisition sur les signaux de SH/TH a été fait pour avoir un rendu d'image « lisible » entre les deux signaux, on verrait par un autre ajustement que le signal de TH n'est pas complètement éteint à l'intérieur de l'épithélium et peut donc y révéler des objets supplémentaires (cellules), ce que la TCO est difficilement capable de réaliser. Cependant, sur une acquisition comme celle-ci, il n'est pas possible de savoir exactement comment sont organisées les couches les plus profondes de la cornée et pour éclaircir ces régions délicates de l'organe nous allons voir, à présent, le résultat de nos investigations en cornée postérieure.

### **6.4.3 Observations des couches postérieures de la cornée**

Nous avons déjà expliqué pourquoi il était particulièrement important d'imager ces couches profondes aux fonctions capitales pour la santé de la cornée (voir le chap. 2.1.3). La discussion autour de l'observation des couches profondes par la TCO a déjà été engagée dans le chapitre 2.2.3. Même si sur ces figures TCO que nous avons nous-mêmes acquises en figure 6.5, le grossissement et probablement la résolution axiale ne sont pas suffisants pour être en mesure de pleinement évaluer la possibilité d'identification des couches postérieures, des travaux très récents (Akiba *et al.*, 2007, Shousha *et al.*, 2010) où la membrane de Descemet est particulièrement étudiée de par son importance comme indicatrice de maladie cornéenne, ne donnent pas pour autant, sur un fort grossissement, une identification claire des trois couches postérieures, alors même que la TCO conçue est justement de très haute résolution.

En effet dans l'article de Shousha *et al.* (Shousha *et al.*, 2010), sur la figure 1 de l'article, les trois couches (stroma, membrane de Descemet et endothélium) ne se distinguent vraiment que sur le patient porteur d'une dystrophie de Fuch's avancée. Le sujet contrôle, sain et jeune, ne présente pas deux pics d'intensité qui marqueraient la sortie du stroma et l'entrée dans l'endothélium (voir la fig. 1 et 2 dans l'article) et sur la figure 2 il est difficile de savoir à quelle distance correspond les 9  $\mu\text{m}$  mentionnés. Il semblerait qu'en revanche la vieillesse ou l'avancement de la maladie permette une meilleure identification des couches postérieures. Cependant la membrane de

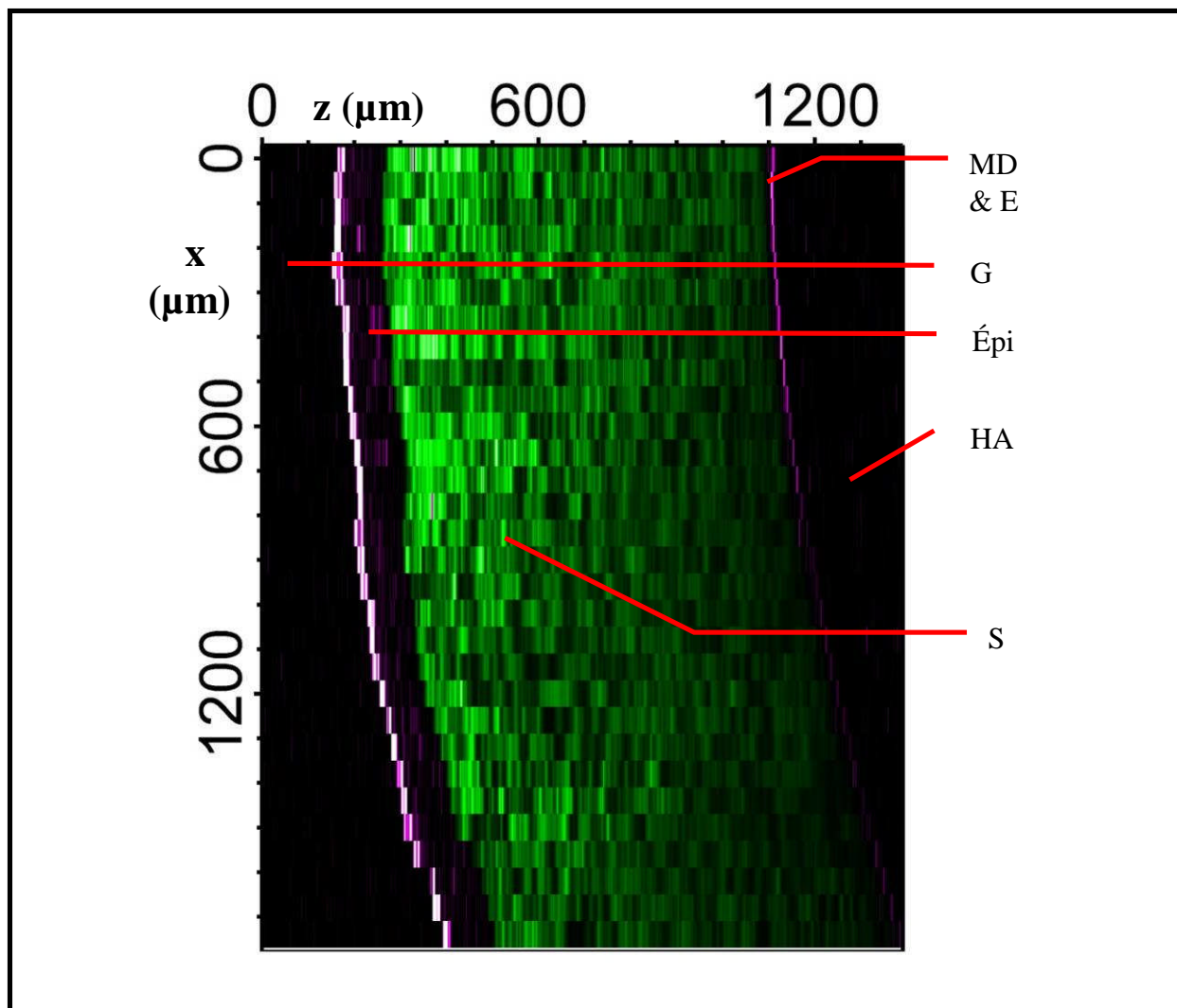
Descemet semble se révéler en TCO surtout par le fait qu'aucune rétrodiffusion n'y siège : lorsqu'elle est assez épaisse un manque de signal évident contraste avec le stroma ou l'endothélium.



**Figure 6.5 Observations transversales par TCO commerciale d'une cornée porcine fraîche**

Acquisition TCO avec l'appareil OCP930SR (Thorlabs). (a) acquisition dans la partie antérieure de la cornée avec la mise en évidence de l'épithélium. (b) acquisition dans la partie postérieure de la cornée montrant une structure supplémentaire à l'extrémité. (c) zoom sur cette même structure. (a) et (b) ont pour dimensions 1.6 mm et 6.0 mm axialement et transversalement.

Le zoom est fait sur une région de 0.5 mm et 3.0 mm.



**Figure 6.6** Observation transversale SH/TH d'une cornée porcine type TCO

Objectif Olympus ON 0.9 avec immersion au gel ophtalmique. SH (vert) en épi-détection et TH (violet) en transmission. L'image est volontairement d'une faible définition transversale (incrément de 60  $\mu\text{m}$ ) pour limiter le temps d'acquisition global. À ce niveau d'agrandissement, il n'est pas possible d'identifier clairement les couches postérieures de la cornée. La membrane de Bowman est inexistante chez le porc.

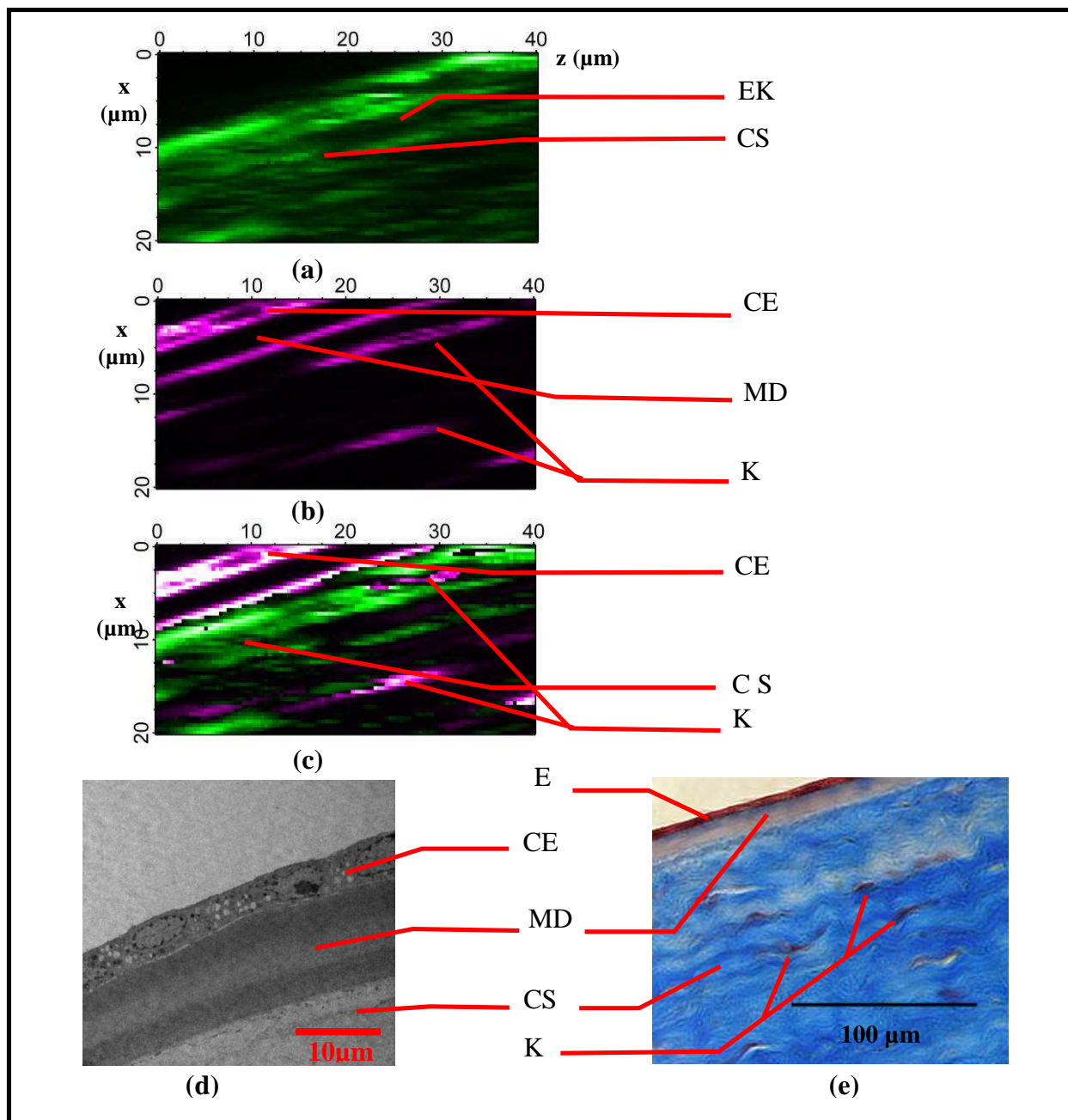
M D : membrane de Descemet ; E : endothelium ; Epi : épithelium ; S : stroma ; HA : humeur aqueuse ; G : gel.

Ceci est bien en accord avec le fait que la membrane de Descemet est un matériau particulièrement homogène (voir le chap. 2.1.2.4). Or, pour avoir un signal de retour en TCO, il faut absolument rencontrer des inhomogénéités du premier ordre sur l'indice de réfraction (ou l'absorption). L'article de Akiba *et al.* (2007) va dans le même sens : en se référant aux figures 2

et 4 de l'article, il n'y a pas de véritable interface marquant, par un regain d'intensité de réflexion de Fresnel, la démarcation stroma/membrane de Descemet. Ces faits tendent à faire penser que le stroma et la membrane de Descemet auraient des indices de réfraction très proches.

Au contraire, les images présentées en figure 6.7, où l'échantillon a pour l'occasion été préparé pour optimiser le plus possible la détection de la SH et la TH pour l'observation de cette région, c'est-à-dire cornée isolée et détection pour les deux signaux en transmission (voir le chap. 5.2.2 7) c)), montrent clairement l'avantage de l'IGSH/TH sur la zone postérieure de la cornée où il y a un besoin de haute résolution (vu l'étrécissement de ces couches) autant que de complémentarité entre les deux signaux pour l'observation de ces structures. En effet la SH s'éteint naturellement avec la fin du collagène stromal et le signal n'est donc pas exploitable plus profondément. En revanche, la TH montre clairement trois objets : deux interfaces et une couche de signal hétérogène. Cette dernière couche est facilement identifiable comme étant l'endothélium, dans la mesure où nous avons pu y observer des cellules, que ce soit avec des acquisitions transversales (fig. 6.7) ou *en face* (fig. 6.9) où les noyaux cellulaires apparaissent comme la plupart du temps en imagerie cellulaire de TH, sombres (Tserevelakis *et al.*, 2010, Yelin *et al.*, 1999). La qualité de l'observation de ces cellules endothéliales est au moins égale sinon meilleure que celle qu'offrirait les coupes histologiques standard.

Il est aussi intéressant de voir comment la membrane de Descemet se révèle en TH. Comme nous venons de le dire pour la TCO la membrane de Descemet est une structure exceptionnellement homogène de collagène globulaire et elle ne possède pas de cellules. Homogène en biologie pour la TH, peut se comprendre comme le fait qu'il y ait peut-être au sein du matériau des espaces où il n'y a pas de collagène mais que ces espaces sont si peu épais qu'il ne donnent aucun signal. Débarre *et al.* (2007b) a travaillé sur la modélisation du signal de TH en fonction des caractéristiques géométrique du matériau et l'ON : les figures de l'article montrent pour l'émission avant ou arrière, que ce soit pour une couche (« slab en anglais ») ou un matériau périodique, que le signal tend vers zéro lorsque les dimensions, épaisseur de la couche ou période spatiale, tendent vers zéro. Ceci justifie que l'intérieur même de la membrane de Descemet ne soit pas émissif de TH. En revanche les interfaces que la membrane de Descemet possède avec le stroma et l'endothélium sont très marquées structurellement (voir MET fig. 2.5



**Figure 6.7 Observation transversale SH/TH sur les couches postérieures de la cornée porcine**

Objectif condenseur : objectif Olympus ON 0.9 avec immersion au gel ophtalmique. Objectif collecteur : objectif Zeiss ON 0.75 sec. (a) SH (vert) et (b) TH (violet) en transmission. (c) fusion des deux signaux. (d) MET de cornée porcine postérieure (LOEX). (e) coupe histologique de cornée porcine postérieure avec marquage trichrome de Masson (LOEX).

MD : membrane de Descemet ; E : endothelium ; CE : cellules endothéliales ; CS : collagène stromal ; K : kératocyte ; EK : emplacement kératocyte.

du chapitre 2.1.2) et permettent ainsi d'apprécier l'épaisseur de cette couche. Le contraste existant avec l'endothélium peut relativement bien se comprendre car les deux couches sont très différentes : la membrane de Descemet possède principalement du collagène alors que l'endothélium est essentiellement cellulaire et les membranes cytoplasmiques sont toujours bien visibles en IGTH de par leurs lipides (voir le chap. 4.3.1).

En revanche l'interprétation de la mise en évidence de l'interface stroma/Descemet est plus intéressante dans la mesure où ces deux couches possèdent toutes les deux du collagène même s'il est de nature différente. Pour résumer, la TH révèle particulièrement bien la membrane de Descemet pour trois raisons :

- 1) la membrane de Descemet étant particulièrement homogène, elle ne génère pas la TH. Comme en TCO, cela crée une région particulièrement dépourvue de signal ;
- 2) le stroma n'est pas aussi homogène que la membrane de Descemet, dépendamment de son hydratation, mais il ne génère quand même pas beaucoup de signal comme le montre la figure 6.7 (b) de TH. Cette situation de faible signal est moins marquée en TCO à la vue des résultats de ces applications dans la cornée.

Ces deux milieux pauvres en signal TH offrent donc une zone où une interface peut particulièrement contraster puisque le contraste est justement

$$C = \frac{\Delta S}{\langle S \rangle}, \quad \text{éq. 38}$$

où  $\langle S \rangle$  est le signal moyen et  $\Delta S$  la différence de signal avec le signal moyen.

- 3) or si nous comme l'avons vu avec la TCO, l'indice de réfraction entre les deux milieux est bien proche alors le signal de TH sur l'interface serait principalement dû à la différence de  $\chi^{(3)}$  comme nous l'avons développé dans la partie théorique de la TH.

Pour complètement valider ce dernier point, il faudrait mesurer, avec le TCO (Lin *et al.*, 2004) avec la réflexion de Fresnel, quels sont les indices de réfraction du stroma et de la membrane de Descemet chez le porc et l'humain. Nous verrons que dans le chapitre 8, que cette situation est très différente voire opposée à celle qu'offre l'incision dans le stroma.

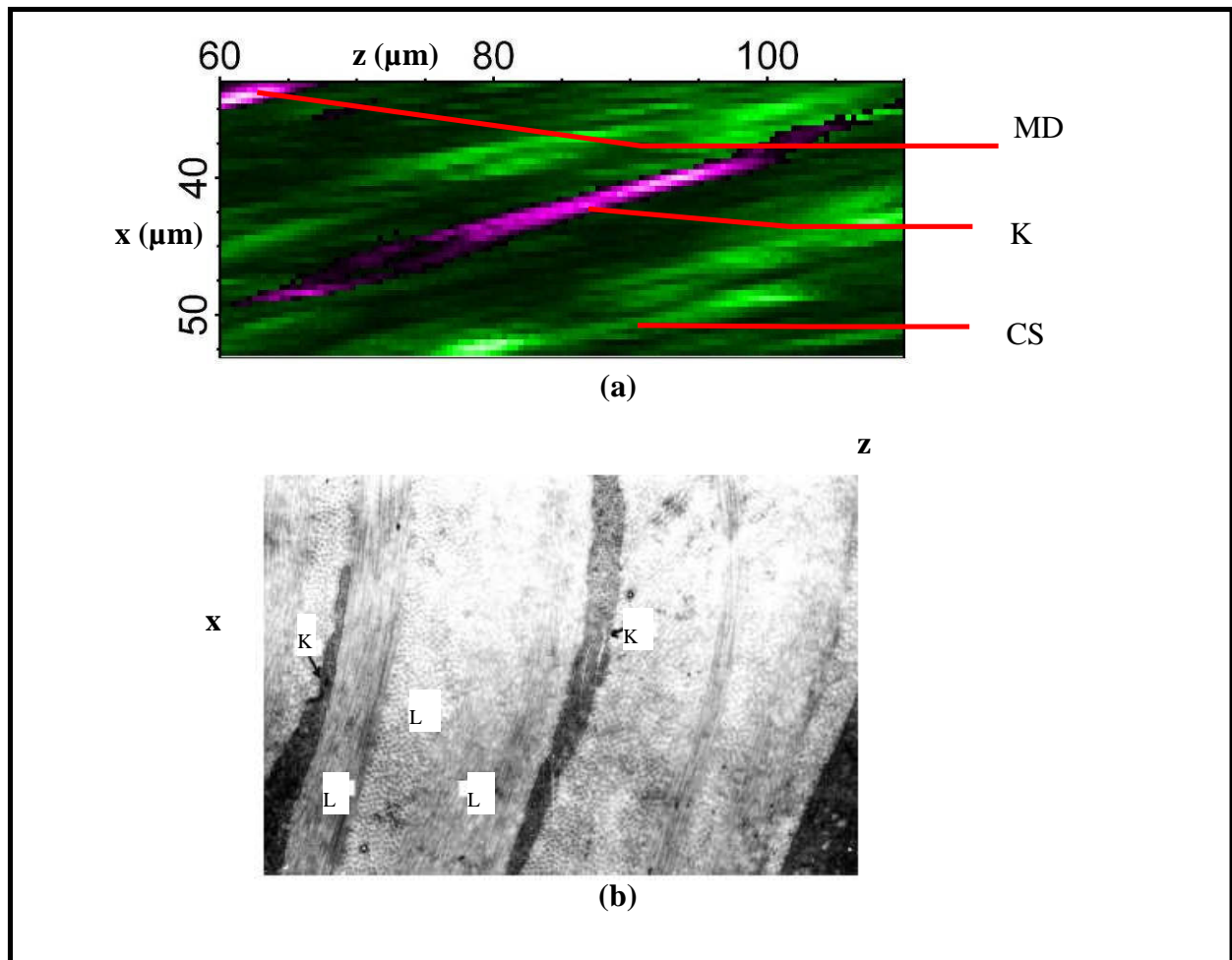
En tous les cas, c'est justement par ces acquisitions fines dans la région postérieure de la cornée qu'il est possible de vraiment identifier la membrane de Descemet : ces images de TH permettent

de prendre conscience de la continuité de la membrane de Descemet comme pourrait la révéler les méthodes classiques *in vitro* avec préparation.

Enfin, remarquons que sur les figures de microscopie d'harmoniques présentées, les axes mentionnés sont ceux qui correspondent aux platines de translation de l'échantillon et il n'y a donc pas lieu de s'étonner que la figure soit un peu de biais car localement les couches postérieures peuvent avoir adoptées un agencement non horizontal. Ceci explique aussi pourquoi sur l'image *a priori en face* de l'endothélium (voir la fig. 6.9), nous avons quand même cadré une portion de la membrane de Descemet. Cette inclinaison peut d'ailleurs être prise comme un avantage permettant ainsi de mieux résoudre des structures le long de l'axe optique, celles-ci étant en partie projetées dans le plan *en face* où la résolution spatiale est naturellement meilleure.

De la même façon, les figures 6.7 (c) et 6.8 (a) transversales permettent de mettre en lumière les kératocytes par la TH, reconnaissables par leur forme typiquement allongée due à leur positionnement coincé entre les lamelles de collagène stromal et l'espace qu'ils occupent dans le collagène implique que le signal de SH à cet endroit y soit moins fort (annotations E K et K respectivement sur les figures 6.7 (a) et (b)). En revanche nous avons vu dans le chapitre 2.2.3 que les kératocytes ne sont pas facilement observables en TCO ou en microscopie confocale de par la faible différence d'indice de réfraction entre leur cytoplasme et leur environnement (fonction de transparence cornéenne). Le noyau sombre en TH du kératocyte est visible alors même que la cellule est très étroite. La figure 6.7 (e) et 6.8 (b) illustrent cette observation d'un kératocyte respectivement en coupe histologique et en microscopie électronique à transmission.





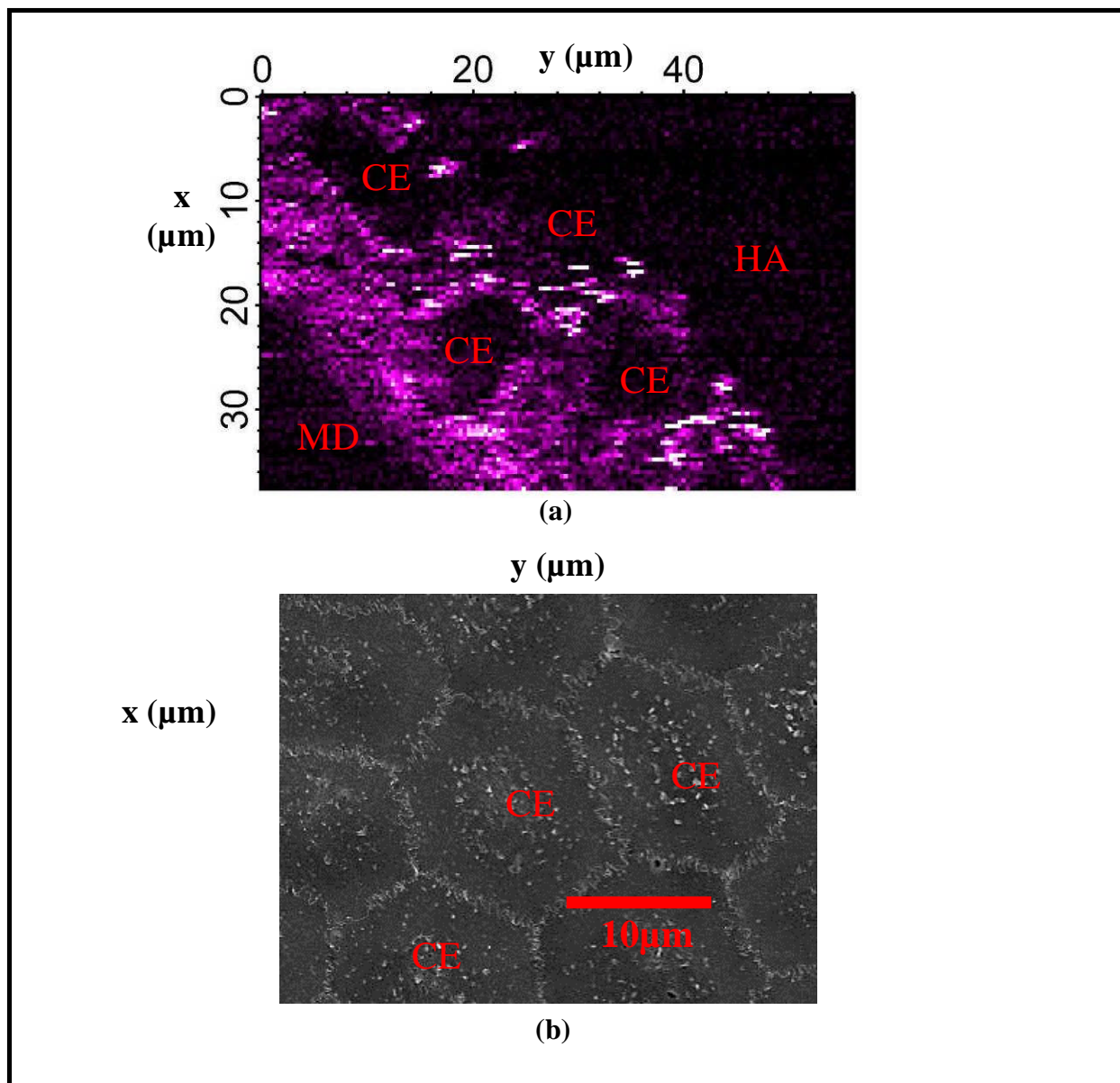
**Figure 6.8 Observation transversale SH/TH sur un kératocyte dans la cornée porcine**

Objectif condenseur : objectif Olympus ON 0.9 avec immersion au gel ophtalmique. Objectif collecteur : objectif Zeiss ON 0.75 sec. (a) fusion des deux signaux SH (vert) et TH (violet) en transmission (zoom de la figure 6.7 (c)).

(b) stroma porcin en MET. Les dimensions de l'image sont :  $7.4 \times 11 \mu\text{m}$ .

MD : membrane de Descemet ; CS : collagène stromal ; K : kératocyte ; L : lamelle de collagène (collagène stromal).

(b) est modifiée de la source : (Svaldenienė et al., 2003)



**Figure 6.9** Observation *en face* en IGSH/TH de l'endothélium d'une cornée porcine

Objectif Olympus ON 0.9 avec immersion au gel ophtalmique.

(a) TH (violet) en transmission. (b) microscopie électronique à transmission sur l'endothélium porcine (LOEX).

MD : membrane de Descemet ; CE : cellules endothéliales ; HA : humeur aqueuse.

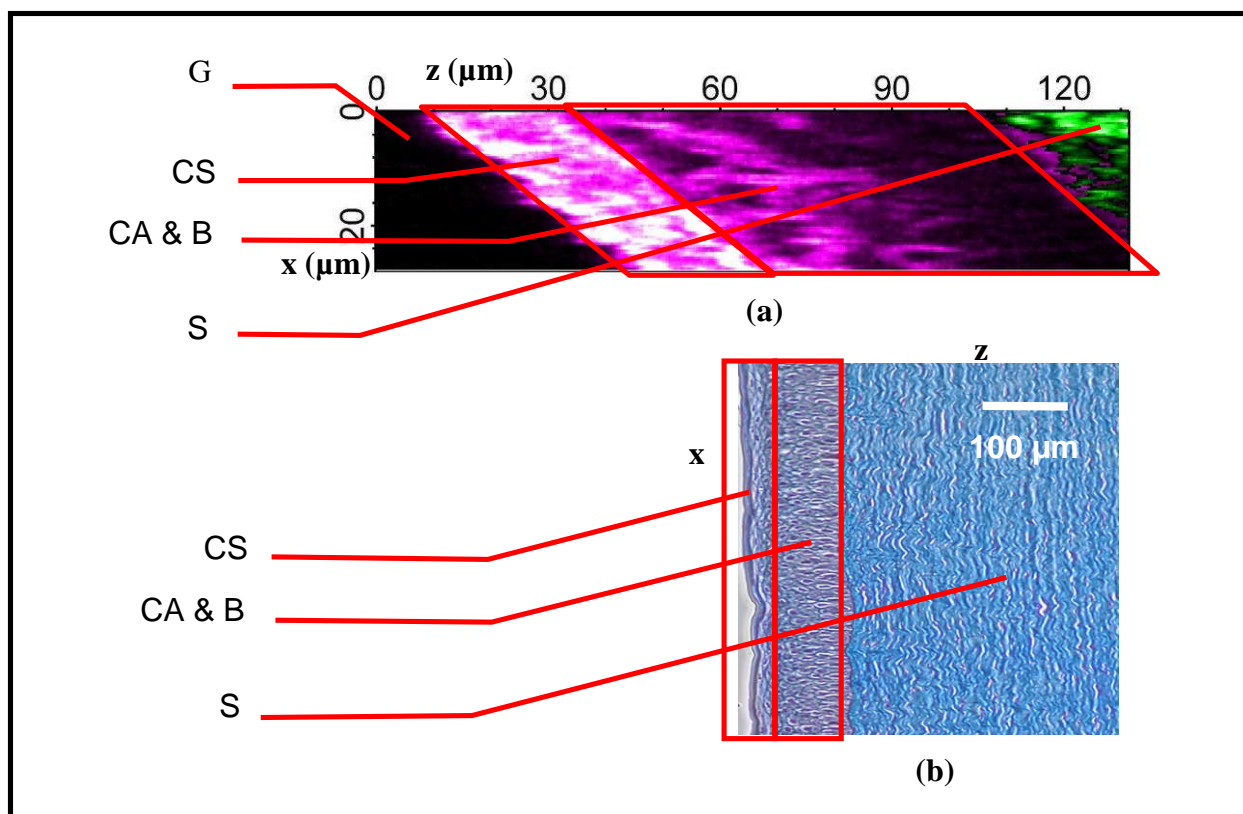
#### 6.4.4 Observation de l'épithélium cornéen

Pour montrer la polyvalence de notre microscope pour l'observation de la cornée nous avons enfin acquis des images dans la région de l'épithélium. La figure 6.10 montre en particulier que le microscope est capable de différencier les sous-couches connues de l'épithélium. En effet l'épithélium est comme nous l'avons vu dans le chapitre 2.1.2 1) organisé suivant des sous-couches stratifiées appelées successivement depuis la surface jusqu'à la limite avec le stroma:

- sous-couche des cellules superficielles (particulièrement aplaties),
- sous-couche des cellules en aile (davantage rondes),
- et enfin, la sous-couche de cellules basales qui sont plus allongées le long de la perpendiculaire à la surface cornéenne.

La figure 6.10 (b) montre cette structure en histologie. Sur la figure 6.10 (a), la TH pouvait être aisément épi-détectée et ce mode de détection de l'harmonique est donc pleinement satisfaisant pour contraster les cellules épithéliales entre elles : que ce soit en surface de la cornée ou en profondeur il n'y a pas de limitation fondamentale à l'épi-détection et celle-ci peut être optimisée sur la détection ou l'acquisition. Pour cette même raison, les cellules les plus profondes de l'épithélium se voient moins clairement dans la mesure où la diffusion impliquée par les couches supérieures diminue le signal de TH.

Cette observation de l'épithélium en TH, confirme que les cellules superficielles sont relativement aplaties alors que les cellules épithéliales gagnent en épaisseur au fur et à mesure que l'on s'enfonce dans la couche (cellules « en ailes » et basales). L'identification en TH entre les différentes sous-couches pourrait s'expliquer, mis à part cette considération morphologique, par le fait que les cellules superficielles étant plus densément regroupées et aplaties (donc montrant d'autant mieux leur membrane cytoplasmique) elles impliqueraient un signal plus fort puisque les lipides membranaires fournissent généralement un fort signal de TH.



**Figure 6.10** Observation transversale SH/TH sur l'épithélium porcine

Objectif Olympus ON 0.9 avec immersion au gel ophtalmique.

(a) fusion des deux signaux SH (vert) en transmission et TH (violette) en épi-détection. (b) coupe histologique de cornée porcine antérieure avec marquage trichrome de Masson (LOEX).

G : gel ; CS : cellules superficielles ; CA & B : cellules en « ailes » et basales ; S : stroma.

## 6.5 Conclusion et perspectives

Ces travaux ont fait la démonstration que la combinaison IGSH/IGTH permet l'identification de toutes les couches cornéennes chez le porc. Cette réalisation est rendue possible :

- grâce à la haute résolution spatiale autant axiale, pour pouvoir résoudre les plus fines couches comme la membrane de Descemet et l'endothélium, que transversale pour observer aisément les différentes cellules cornéennes ;
- grâce à un fort contraste : d'une part les deux signaux d'harmoniques se complètent très bien puisque la TH « prend le relais » d'observation quand la SH n'est plus émise

(cellules, couches postérieures) d'autre part, le rapport S/B est, avec un objectif à immersion, bien suffisant pour révéler toute l'épaisseur de la cornée et ceci même en épi-détection.

Notre microscope peut donc acquérir des images à grande échelle comme pourrait en fournir une imagerie TCO avec cependant bien moins d'ambiguïté, en particulier sur les couches postérieures grâce au jeu de contraste particulier de l'IGTH. Grâce à sa haute résolution spatiale, qu'il hérite des imageries non linéaires, l'IGSH/IGTH peut également facilement faire de l'imagerie cellulaire.

Par ailleurs, le fait d'être capable d'épi-détecter les deux signaux d'harmoniques sur des tissus frais sans marquage supplémentaire montre que la méthode n'est pas limitée fondamentalement pour envisager une future application *in vivo* et voire clinique.

Comme l'IGSH/IGTH a fait la preuve d'une identification particulièrement claire des couches postérieure, en particulier sur la membrane de Descemet, il serait en particulier possible de détecter des symptômes précoces de la dystrophie de Fuch's (changement d'épaisseur de la membrane de Descemet, guttae voir le chap. 2.1.3 1)), là où la TCO nécessite un stade avancé de la maladie pour observer les changements qui s'opèrent au niveau de la membrane de Descemet. Par ailleurs, la haute résolution spatiale latérale permettrait d'en apprendre plus sur les guttae qui ne peuvent pas être étudiées en 3D avec la TCO ou le microscope spéculaire. La TCO de la cornée est surtout macroscopique et n'y réalise pas encore une microscopie cellulaire par manque de résolution latérale et de contraste.

Par ailleurs nous avons vu dans ce même chapitre sur la dystrophie de Fuch's que celle-ci induisait des changements sur le collagène de la membrane de Descemet et ceux-ci pourraient se révéler en IGSH ou IGTH.

D'autres pistes possibles où la membrane de Descemet est fortement affectée concerneraient la dystrophie polymorphe postérieure (voir le chap. 2.1.3) ou certaines complications de LASIK réalisés trop bas (Edelhauser, 2000). Par ailleurs l'IGSH/IGTH peut aussi exploitée pour d'autres maladies comme le kératocône qui ont déjà été le sujet d'étude en IGSH/IF2P.



## **7 APPLICATION DE L'IGSH/IGTH POUR L'OBSERVATION DES CORNÉES RECONSTRUITES PAR GÉNIE TISSULAIRE**

### **7.1 Intérêt de l'application de l'IGSH/IGTH pour les cornées reconstruites**

Comme nous l'avons dit en introduction, le projet BioFemtoVision vise l'amélioration des chirurgies de la cornée postérieure. En particulier, bien que les greffes postérieures soient maintenant couramment utilisées en clinique pour remplacer l'endothélium cornéen pathologique, il reste certains problèmes dont le rejet de greffe (puisque c'est une allogreffe) et une décompensation endothéliale, menant à un échec du greffon par manque de cellules fonctionnelles. De plus la question des greffes renvoie également au problème de la pénurie du don d'organe (Buhrmann *et al.*, 2007, Christensen *et al.*, 2009) : le génie tissulaire peut répondre aussi à ce problème car même s'il nécessite des cellules de donneurs, en particulier cellules endothéliales, celles-ci peuvent être cultivées et conservées sur plusieurs années (Proulx *et al.*, 2012). Un des objectifs du Laboratoire d'organogénèse expérimentale (LOEX) de l'Université Laval, est donc de reconstruire un endothélium cornéen par génie tissulaire, en utilisant les cellules du patient, éliminant le rejet de greffe (puisque autologue), et hautement cellulaire pour éviter la décompensation. Les premiers résultats sont encourageants : des études à court terme (terminées avant l'apparition du rejet de greffe) démontrent qu'un endothélium allogénique reconstruit par génie tissulaire est fonctionnel lorsque greffé chez l'animal (Proulx *et al.*, 2009) et rapproche donc le sujet encore un peu plus de futures applications cliniques.

Le LOEX a développé une technique pour reconstruire différents tissus (Auxenfans *et al.*, 2009, Gauvin *et al.*, 2010, Larouche *et al.*, 2009) dont le stroma cornéen (Carrier *et al.*, 2009, Carrier *et al.*, 2008, Proulx *et al.*, 2010), appelé « auto-assemblage » (voir le chap. 7.3.1). L'étape suivante de la reconstruction sera donc d'utiliser le stroma reconstruit par auto-assemblage avec l'endothélium autologue. Cette technique permettra la reconstruction d'un tissu totalement autologue, sans ajout de matériel synthétique, 100 % naturel et biocompatible. Un tel tissu pourrait offrir une solution particulièrement intéressante pour une maladie comme la dystrophie de Fuchs où justement cette couche est dysfonctionnelle (voir le chap. 2.1.3). La reconstruction de ce tissu requiert cependant beaucoup d'ajustements successifs. L'imagerie non linéaire s'avère

donc un outil intéressant pour étudier la reconstruction de façon rapide et non invasive. Les échantillons que nous avons imagés étaient ainsi composés d'un stroma reconstruit par auto-assemblage (avec kératocytes), avec ou sans endothélium. Nous avons comparé les observations acquises par IGSH/IGTH à celles des méthodes d'observations traditionnelles d'histologie (coupes histologiques, MET, immunofluorescence, microscopie optique sur tissu frais).

## 7.2 Objectifs

L'objectif du travail de collaboration avec le LOEX fut d'évaluer l'utilité de l'IGSH/IGTH pour caractériser les cornées reconstruites, en comparant ces résultats de microscopie non linéaire les méthodes classiques d'histologie (coupes histologiques, MET, immunofluorescence, microscopie optique sur tissu frais).

## 7.3 Matériel et méthodes

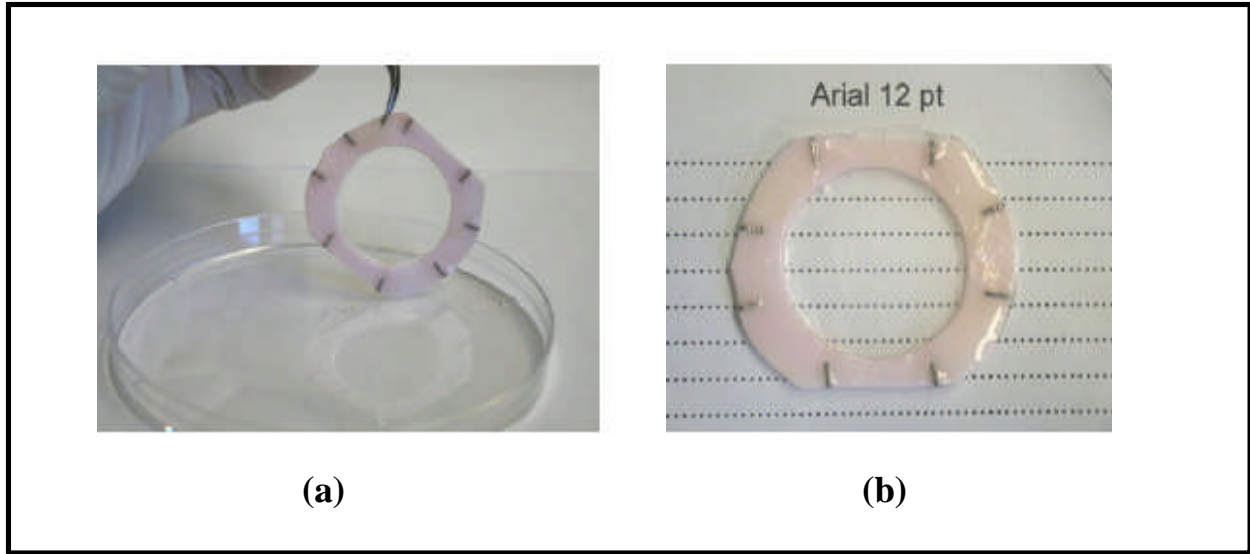
### 7.3.1 Le tissu cornéen reconstruit

La bioingénierie du stroma reconstruit par auto-assemblage et de la reconstruction de l'endothélium cornéen a déjà été publié (Proulx *et al.*, 2010). Brièvement, les kératocytes sont mis en culture en présence de sérum et d'acide ascorbique, générant (après plusieurs semaines de culture) un feuillet de matrice épais et manipulable. Les cellules endothéliales cornéennes (préalablement cultivées de façon séparée) sont ensuiteensemencées dessus, formant une cornée postérieure composée d'un mince stroma auto-assemblé et d'une monocouche de cellules endothéliales. La figure 7.1 montre justement l'aspect général d'une telle cornée. La figure 7.2 fait un résumé des étapes de la reconstruction de la cornée.

### 7.3.2 Modifications apportées au microscope pour l'imagerie du tissu reconstruit

Cette application a réclamé que nous fassions une implémentation nécessaire au microscope pour observer cet échantillon particulièrement fin. C'est ainsi qu'en plus du balayage avec les platines

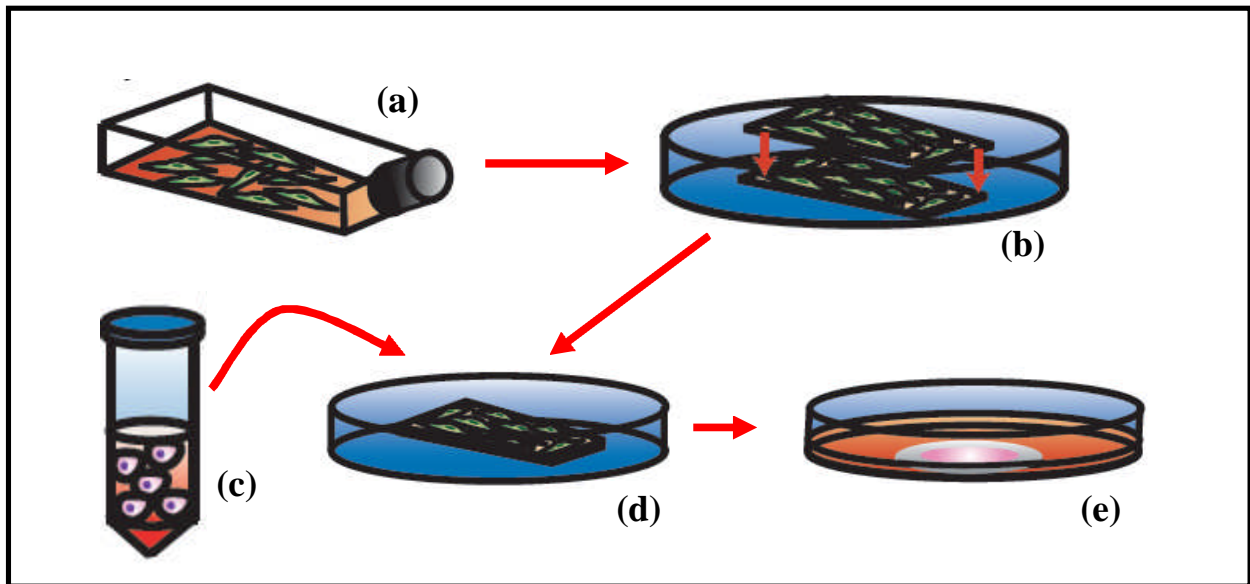




**Figure 7.1 Photographies d'un résultat de génie tissulaire cornéen**

(a) aspect général de la cornée reconstruite dans sa boîte de Pétri. (b) illustration de sa transparence.

(a) et (b) sont tirées de la source : (Proulx *et al.*, 2010)



**Figure 7.2 Résumé des étapes de la reconstruction du tissu stroma/endothélium**

(a) mise en culture des fibroblastes et production d'un feuillet de collagène. (b) assemblage de deux feuillets. (c) mise en culture des cellules endothéliales. (d) ensemencement des feuillets par les cellules endothéliales. (e) tissu reconstruit.

motorisées x,y,z pour les observations longitudinales, le balayage optique a été optimisé (voir le chap. 5.2.2) afin de pouvoir observer pleinement les objets dans les plans transversaux du tissu. Enfin dans ce travail nous avons plus de liberté sur la configuration du microscope (quant aux distances de travail) puisque le cadre expérimental était *in vitro* : le tissu à observer était placé dans des boîtes de Petri.

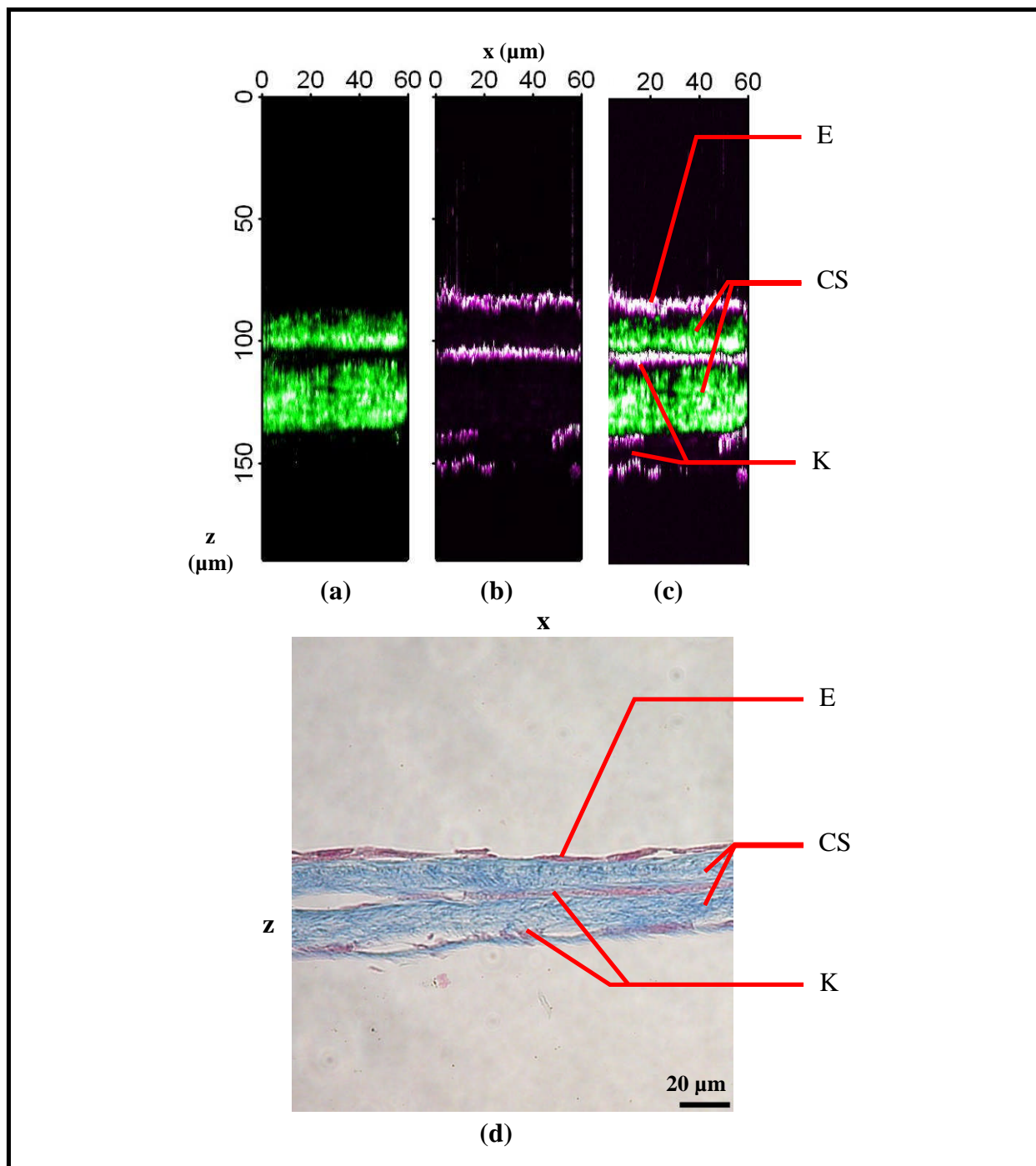
## 7.4 Résultats et discussion

### 7.4.1 Observation transversale de la cornée reconstruite

De la même façon que pour l'imagerie de la cornée de porc, la première étape d'analyse a été d'observer l'aspect macroscopique transversal de ce tissu pour identifier les couches présentes et pouvoir se repérer ultérieurement pour l'imagerie cellulaire.

La figure 7.3 expose le résultat de cette acquisition en même temps qu'une coupe histologique à titre comparatif. Pour cette acquisition, les signaux de SH et de TH étaient très forts sur toute l'épaisseur de l'échantillon. L'observation a aisément été réalisée en épi-détection. .

L'IGSH/IGTH ne permet pas ici, comme nous avons pu l'avoir dans les clichés sur la cornée porcine, de clairement apercevoir les cellules endothéliales et les keratocytes (en particulier leur noyau). Cette limitation est probablement due au fait que la cornée reconstruite étant plate (fig. 7.1) dans la boîte de Pétri, et l'axe suivant l'épaisseur de la cornée étant parallèle à celui de l'axe optique, la microscopie d'harmoniques ne pouvait donc pas résoudre axialement les cellules (keratocytes ou cellules endothéliales). Sur les images des cornées de porc natives, nous avons en revanche une légère inclinaison de l'échantillon qui devait aider à ce que les couches postérieures soient en partie résolues *en face* (fig. 6.7). Ainsi les couches de cellules se présentent ici comme des bandes de signal de TH d'environ 4-5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Cependant le contraste entre les couches cellulaires et celle de collagène est aussi bon que sur le cliché d'histologie grâce à la complémentarité des deux signaux.



**Figure 7.3** Coupe transversale de la cornée reconstruite

Objectif Olympus ON 0.9 avec immersion au gel ophtalmique.

(a) SH (vert) et (b) TH (violet) en épi-détection. (c) fusion des deux signaux. (d) coupe histologique de cornée reconstruite avec marquage trichrome de Masson (LOEX).

E : endothelium ; CS : collagène stromal ; K : kératocyte.

Par ailleurs nous avons mesuré l'épaisseur de la cornée reconstruite par l'IGSH/IGTH et par les coupes histologiques. Les mesures effectuées sur la figure 7.3 (b) en dix points différents donnent une valeur d'épaisseur de  $60.3 \pm 2.9 \mu\text{m}$  alors que le même échantillon une fois préparé pour l'histologie par la fixation dans le formaldéhyde et la déshydratation (fig. 7.3 (d)) donne une valeur d'épaisseur de  $38.1 \pm 4.6 \mu\text{m}$ . Ceci confirme ce que nous avons dit en chapitre 2.2.1 sur les artefacts des méthodes à préparation.

Lors de cette acquisition nous savions que l'endothélium était la première couche en s'enfonçant dans l'échantillon (donc à l'opposé du fond de la boîte de Pétri) et nous avons donc la connaissance *a priori* de sa position. L'endothélium est donc bien cette bande de signal de TH élevée en haut de l'image.

Contrairement à ce que nous avons eu pour les membranes de Descemet observées sur les cornées porcines, nous n'avons pas pu identifier de signature comparable en TH sur ces échantillons de cornée reconstruite. Les coupes histologiques nous ont confirmé l'absence de membrane de Descemet, ce qui s'explique par le fait que cette membrane, sécrétée par cellules endothéliales tout au long de la vie, n'était pas assez épaisse pour être observée. Cette minceur a été également confirmée au microscope électronique (épaisseur de moins de 20 nm).

Par ailleurs, les kératocytes, de par la construction du tissu, pouvaient présenter par endroit une distribution plus aléatoire ce qui explique la relative irrégularité de la structure en bas d'image qui pourrait être composée d'une multicouche de kératocytes alternée avec du collagène en plus faible quantité : en saturant les images il était possible de voir encore du signal de SH et de TH dans cette région.

Enfin, comme les cellules endothéliales et les kératocytes sont différents morphologiquement nous pouvions avoir une occasion supplémentaire d'identification de chacune des cellules en faisant des observations *en face* dans les régions d'intérêt.

#### **7.4.2 Observations *en face* dans le stroma de la cornée reconstruite**

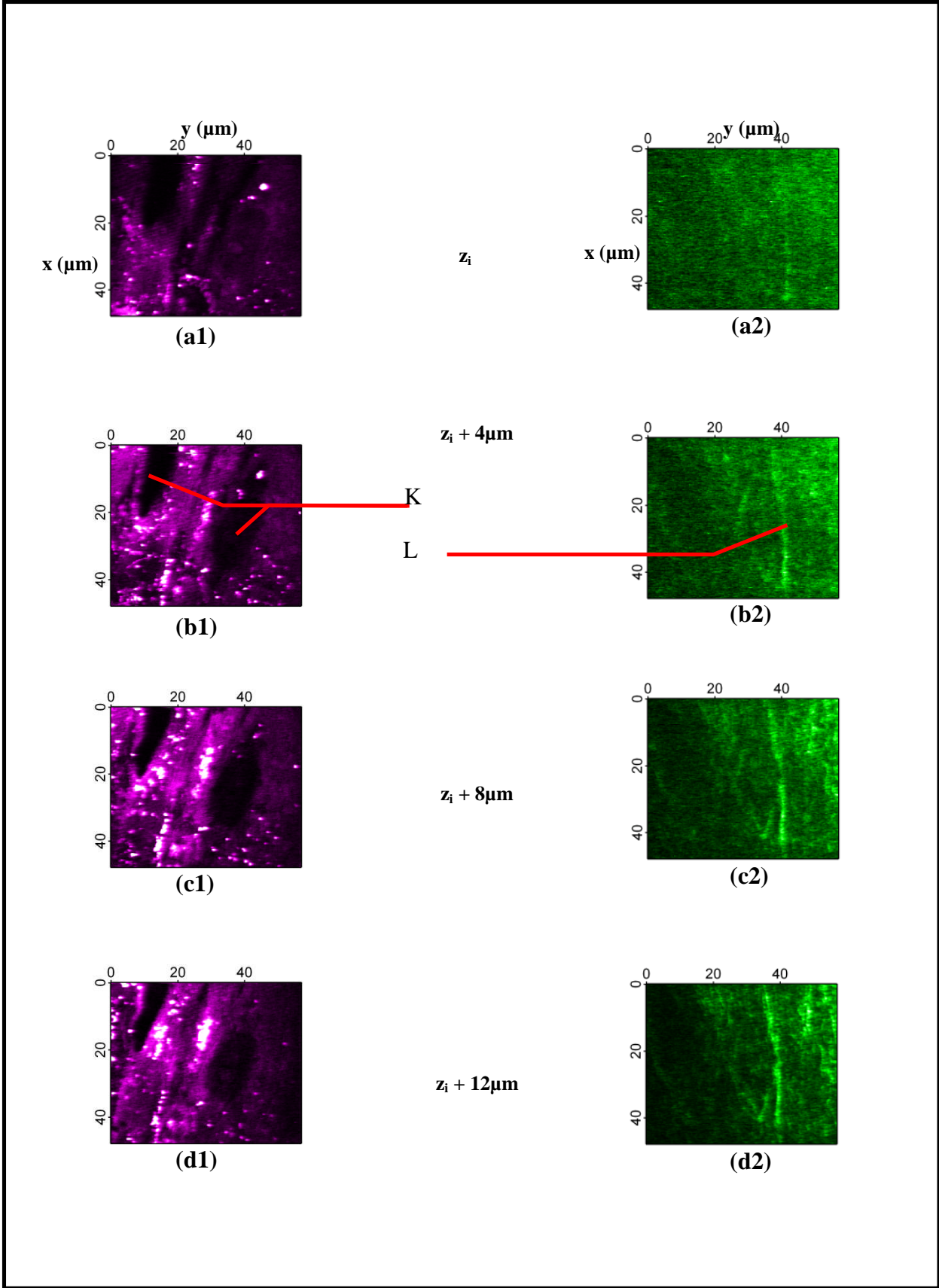
Sur la base de l'acquisition transversale nous pouvions nous placer pour imager *en face* le stroma reconstruit à l'aide du balayage optique. Il est aussi possible de réaliser un empilement d'images *en face* pour rendre compte de la disposition tridimensionnelle des kératocytes dans le réseau de collagène.

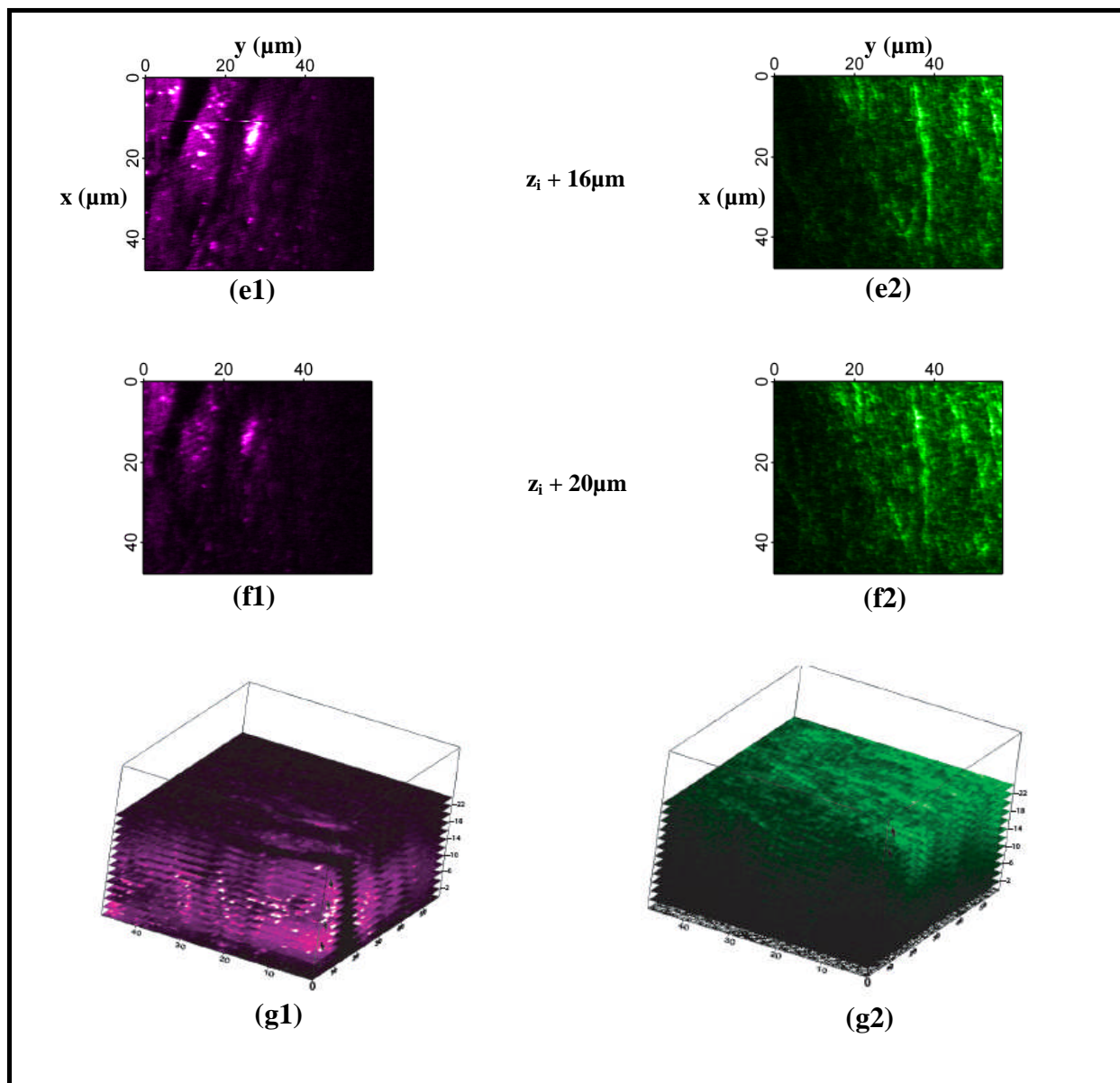
Les acquisitions SH/TH de la figure 7.4 sont justement réalisées dans cette zone en transmission. L'IGTH permet l'observation cellulaire, ici celle des kératocytes. Leur forme est allongée avec un noyau cellulaire sombre tandis que des organites produisent autour un fort signal de TH. La série effectuée semble montrer que les cellules (on en distingue au moins clairement deux) ont été observées dans leur intégralité vu la variation du signal de TH et des dimensions dans la pile d'images. La SH permet quant à elle d'imager le réseau de collagène et une lamelle de collagène peut clairement être observée à l'occasion de cette série axiale d'images.

La figure 7.5 (a) donnant un cliché du stroma reconstruit avec marquage immunohistologique du collagène I, illustre justement cette disposition du collagène autour des kératocytes dont les figures 7.5 (b) et 7.5 (c) montrent autant transversalement qu'*en face* la forme allongée et la connectivité.

### **7.4.3 Observation *en face* dans l'endothélium**

Enfin, une image *en face* au niveau de l'endothélium a été acquise (fig. 7.6). Cette image présente deux cellules. Un noyau sombre est visible pour la cellule qui est en haut à droite. Ici aussi les organites sont nombreux comme nous l'avons déjà remarqué sur la cornée saine (voir le chap. 6.4.3). Ceci est en accord avec la forte activité métabolique des cellules endothéliales (voir le chap. 2.1.2 5)). Sa forme moins allongée et plus arrondie que celle des keratocytes est en accord avec celle observée avec un marquage à l'alizarine rouge, marqueur des membranes cellulaires sur un tissu frais. On peut remarquer la présence de collagène I par la SH qui comble des espaces intercellulaires, ce qui est normal dans la mesure où contrairement à la cornée native, l'endothélium ici, n'est pas isolé du stroma par une membrane de Descemet. Cette inclusion du stroma peut aussi s'observer par endroit dans l'observation transversale de la cornée reconstruite (fig. 7.3).

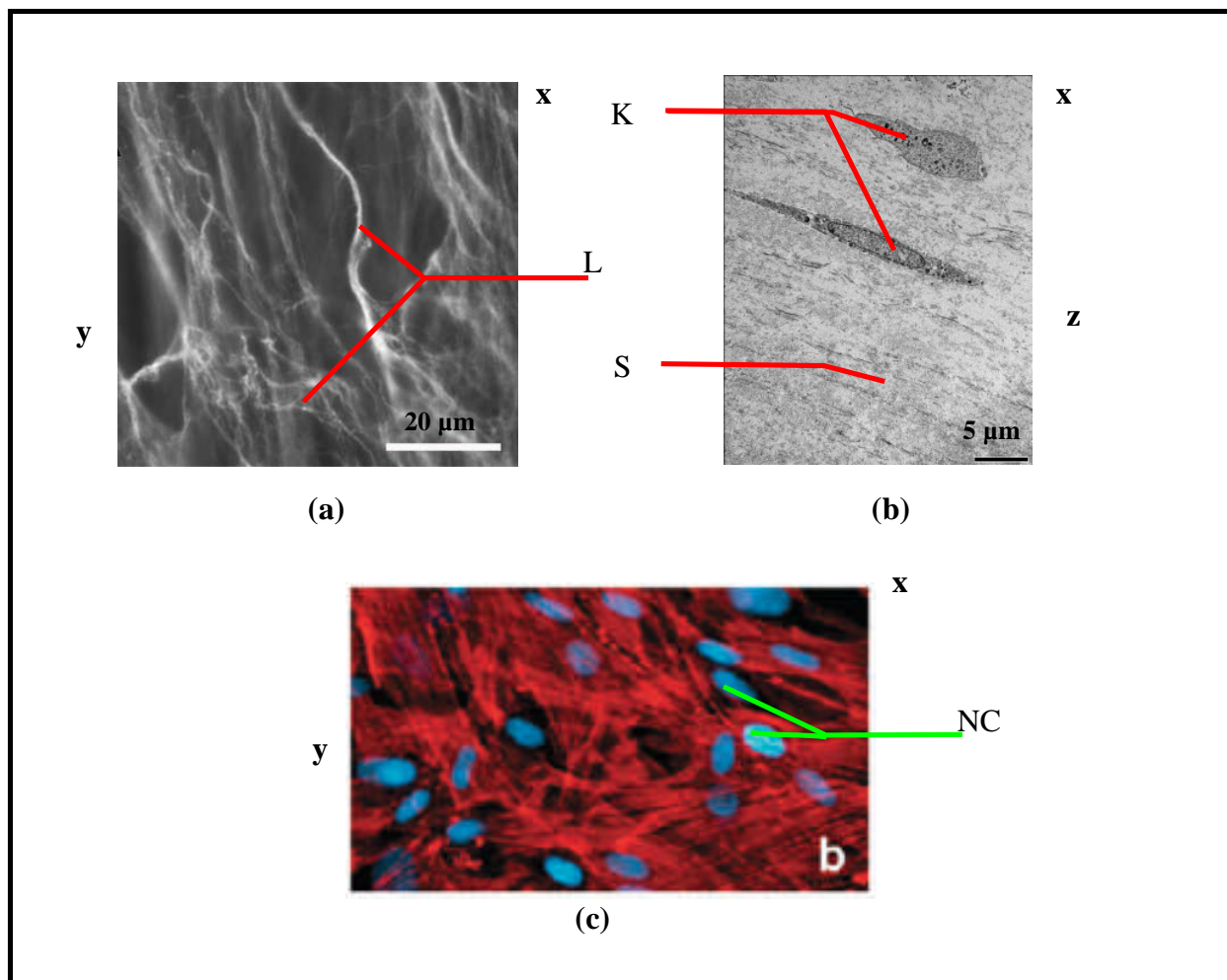




**Figure 7.4** Observation *en face* dans le stroma reconstruit

Objectif condenseur : objectif Olympus ON 0.9 avec immersion dans le milieu de culture. Objectif collecteur : objectif Zeiss ON 0.75 sec. (a1 → g1) TH (violet) en transmission (a2 → g2) SH (vert) en transmission. De (b) à (f) images *en face* séparées axialement et successivement de 4 μm depuis une position  $z_i$  dans le stroma. (g1) et (g2) sont respectivement en TH et en SH les empilements de 13 images transversales. (a) à (f) sont tirées de cette série.

L : lamelle de collagène ; K : kératocyte.



**Figure 7.5 Observation en face dans le stroma reconstruit avec les méthodes classiques d'histologie**

(a) détail *en face* du réseau de collagène stromal reconstruit, avec marquage immunohistologique du collagène I (LOEX). (b) détail transversal du réseau de collagène stromal reconstruit, en microscopie électronique à transmission (LOEX). (c) kératocytes d'une cornée reconstruite avec marquage de l'actine (rouge) et des noyaux (bleu). La figure (c) est tirée de la source (Guillemette *et al.*, 2009) mais c'est également une observation d'une cornée reconstruite au LOEX à partir de fibroblastes humains et avec la culture en boîte de Petri (contrôle dans l'article).

L : lamelle de collagène ; K : kératocyte ; S : stroma ; NC : noyau cellulaire.

L'échelle pour l'image (c) est 283×170 µm.



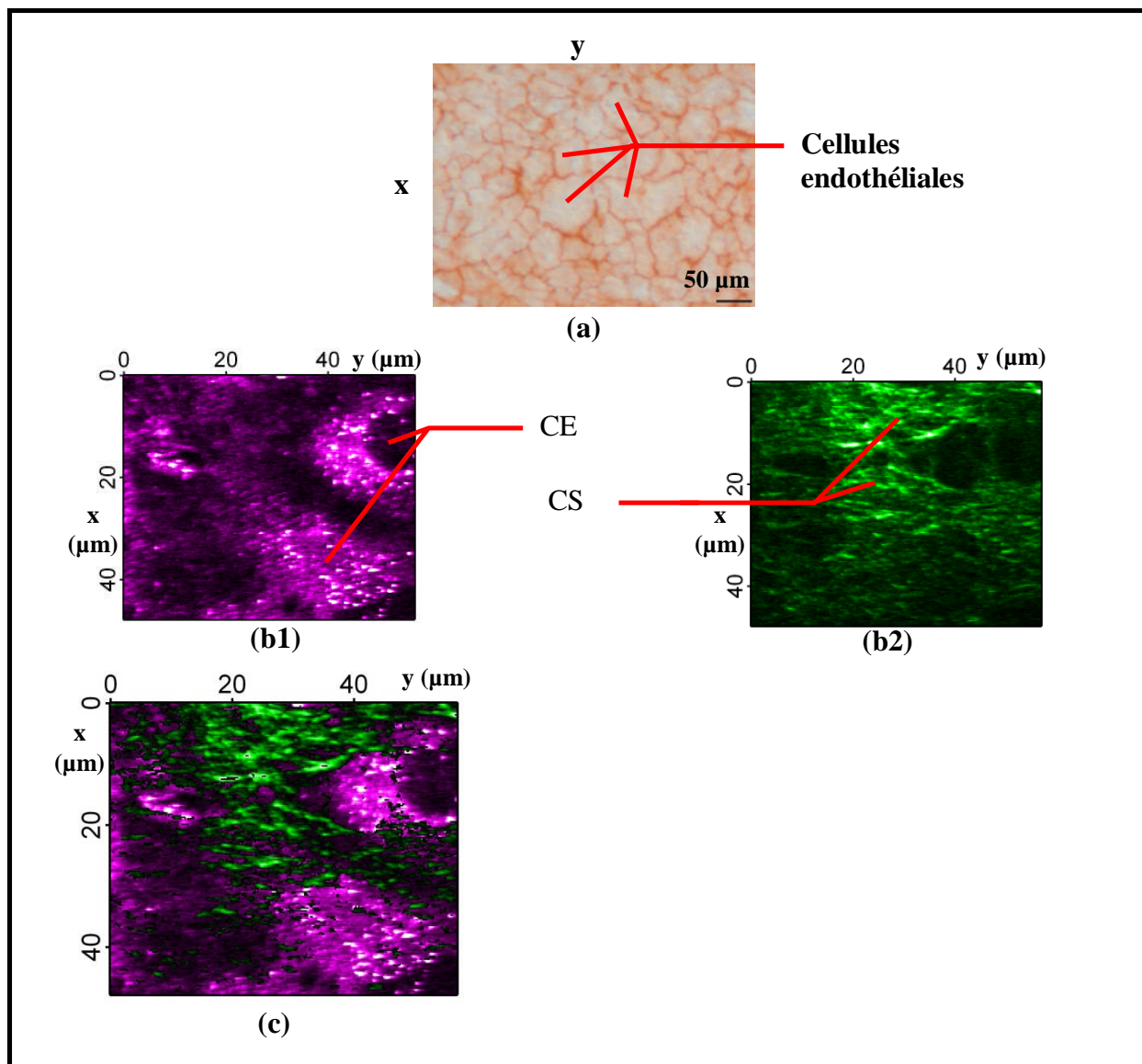


Figure 7.6 Observation *en face* dans la couche d'endothélium

Objectif condenseur : objectif Olympus ON 0.9 dans le milieu de culture et objectif collecteur : objectif Zeiss ON 0.75 sec. (a) observation *en face* des cellules endothéliales de cornée reconstruite en microscopie optique. Le marqueur Alizarin rouge dessine le contour des cellules (LOEX). (b1) TH (violet) et (b2) SH (vert) en transmission. (c) fusion des deux signaux.

CE : cellule endothéliale ; CS : collagène stromal.

## 7.5 Conclusion et perspectives

La microscopie de SH/TH fait la démonstration par son contraste et sa haute résolution spatiale qu'elle peut offrir un moyen de contrôle du produit final du génie tissulaire et ceci autant sur son aspect général (ex. agencement des couches de kératocytes, disposition du collagène) que sur ses composants les plus fins (ex. fibres collagéniques individuelles, cellules). Par exemple, il a été démontré que la membrane de Descemet n'avait pas eu le temps d'être sécrétée/assemblée en 14 jours.

Sur l'imagerie cellulaire, il serait possible d'implémenter d'autres optiques pour avoir un plus grand champ d'observation que celui présentement utilisé pour les images *en face* avec l'utilisation du balayage optique. Ceci permettrait la visualisation d'un plus grand nombre de cellules, en particulier dans l'endothélium où les ophtalmologistes sont intéressés à avoir la densité de cellules.

Mis à part cette optimisation technologique possible, notre méthode permet un gain de temps appréciable pour analyser le produit du génie tissulaire en condition *in vitro* (i.e. un tissu maintenu vivant dans un milieu de culture) et ceci sans recourir à des agents de contrastes qui seraient sinon nécessaires pour d'autres méthodes (ex. microscopie champ clair, fluorescence). Par ailleurs, l'IGSH/IGTH offre tous les prérequis pour qu'il soit possible d'observer *in vivo*. Il serait alors possible de mener une étude des cornées reconstruites avant et pendant les greffes auxquelles elles sont destinées. Pendant la greffe, il y aurait ainsi l'opportunité de suivre l'évolution des couches de la cornée reconstruite et leur appariement avec celles de la cornée du receveur. A une observation plus fine, il serait toujours possible de vérifier la morphologie des différentes cellules.

## **8 L'IGSH/IGTH COMME OUTIL ACCOMPAGNANT LA CHIRURGIE CORNÉENNE**

### **8.1 Particularité pour l'imagerie cornéenne de la coupe intrastromale mécanique par rapport à la coupe au laser femtoseconde**

Après avoir réalisé, avec la microscopie de SH/TH, l'étude de la cornée intacte et celle d'une cornée artificielle qui pourrait être utilisée comme greffon, il était logique dans le cadre du projet BioFemtoVision que nous nous intéressions également à la cornée lorsque celle-ci est manipulée à l'occasion des actes chirurgicaux (Jay *et al.*, 2010).

Les actes chirurgicaux en ophtalmologie cornéenne peuvent se diviser en deux grandes catégories (Azar *et al.*, 2007, Foster *et al.*, 2005, Krachmer *et al.*, 2005) comme nous avons déjà eu l'occasion d'en parler :

- la chirurgie réfractive pour la correction des défaillances réfractives de l'œil (cristallin mais surtout cornée),
- la kératoplastie qui est la chirurgie associée à la greffe de cornée pour palier à ses pathologies.

Ce qui est important, c'est que presque toutes ces interventions nécessitent une coupe de la cornée. En effet, à part quelques opérations dites de surface, où la cornée est directement modifiée/ablatée (la kératectomie est l'ablation mécanique ou photonique de tissu cornéen) depuis l'épithélium (Jackson *et al.*, 2005, Thompson *et al.*, 2007), la plupart des opérations nécessite un travail sur le stroma ou les couches profondes. Ainsi, pour atteindre ces profondeurs, que ce soit pour la chirurgie réfractive ou la kératoplastie, il n'y a pas d'autres alternatives que de faire des coupes/incisions pour ensuite

- soit créer un capot de cornée (laissé cependant attaché à un endroit -charnière-) sous lequel on pourra modifier/ablater le reste du tissu dans le but de la correction voulue (chirurgie réfractive). Ce second travail d'ablation se fait habituellement avec un laser excimer. Dans le chapitre 2.1.4 nous avons illustré l'opération LASIK (fig. 2.6) qui justement nécessite une coupe intrastromale ;
- soit simplement retirer le tissu indésirable en vue de le remplacer (kératoplastie).

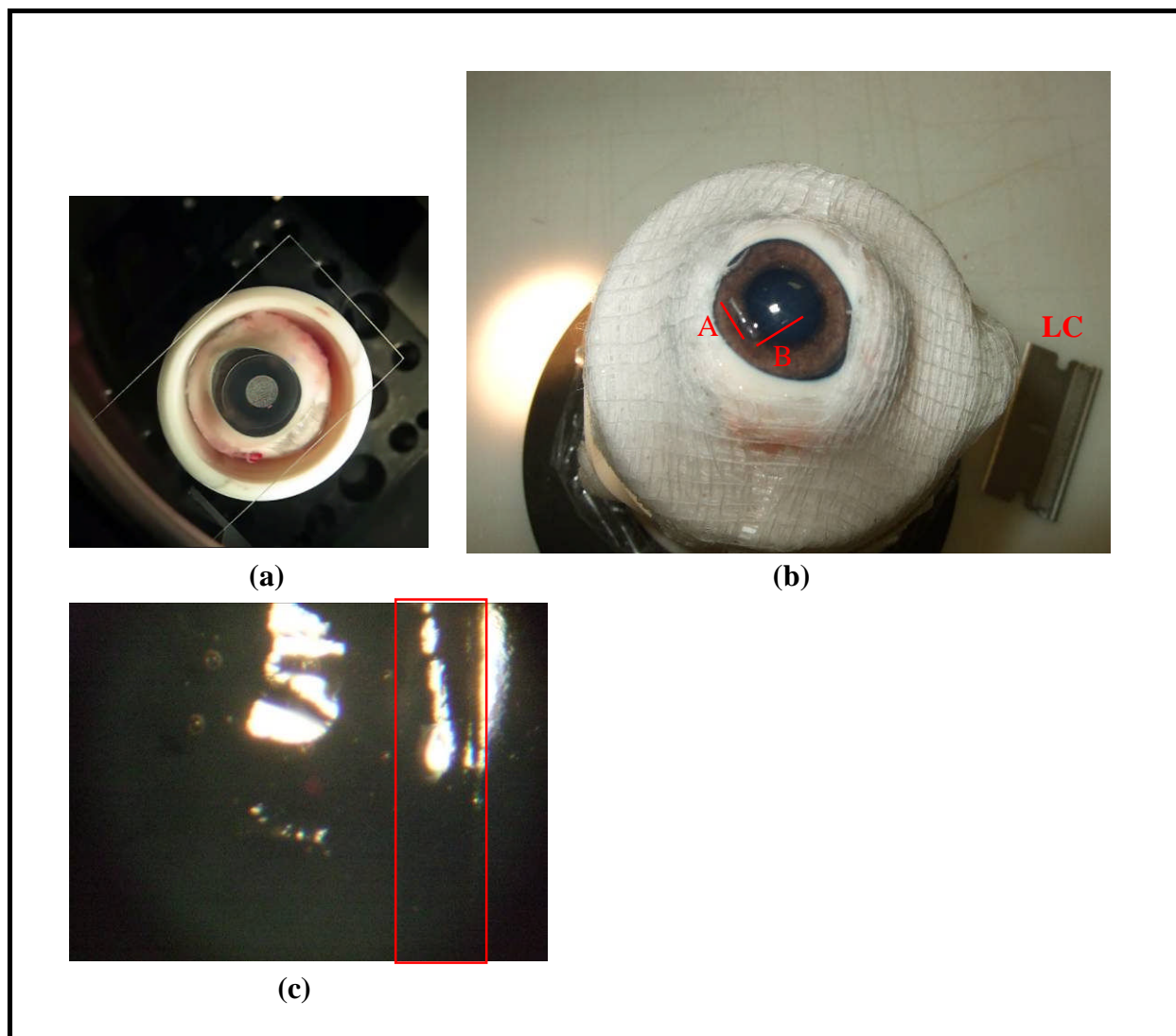
Par ailleurs, une dernière tendance en chirurgie réfractive consiste à faire des incisions (kératotomie (Braunstein *et al.*, 2007)) pour que celles-ci, par leur disposition pertinente dans le stroma, puissent également rendre une vision optimale.

La coupe ou les incisions sont donc une étape cruciale dans les opérations chirurgicales de la cornée. Le contrôle de celles-ci est donc un enjeu particulièrement intéressant pour le chirurgien dans la mesure où celui-ci a tout intérêt à savoir le plus précisément possible où il opère et quelle est la qualité de son opération.

Comme nous l'avons déjà évoqué dans le chapitre sur la cornée (voir le chap. 2.1.4) ces coupes peuvent être effectuées soit par laser ultrabref soit mécaniquement. Le résultat après les deux types de coupe est visuellement très différent car comme nous l'avons expliqué, la coupe au laser procède fondamentalement par la création de micro-cavitations, autrement dit des bulles de gaz de dimensions micrométriques. C'est ce qui explique l'aspect radicalement différent obtenu, suivant que, la cornée soit coupée au laser femtoseconde ou mécaniquement (fig. 8.1).

En effet mis à part certains bords d'une découpe mécanique qui peuvent se voir comme une ligne de diffusion (le côté A fig. 8.1 (b)), le tissu qui est sous le capot, ne laisse pas cette diffusion observable à l'occasion d'une coupe laser (voir la fig. 8.1 (a)). Par ailleurs certaines coupes peuvent présenter des côtés ressemblant tous à B (fig. 8.1 (b) et (c)) et après immersion de la cornée sous le gel ou le sérum physiologique, il devient vraiment impossible de distinguer les bords de la coupe.

Cette simple observation est à l'origine de notre motivation expérimentale pour savoir si la microscopie de SH et TH serait capable d'imager un état en apparence si peu contrasté. La motivation dans cette étude n'était pas donc pas tant de discuter sur les avantages et les défauts de la création de capot cornéen réalisé mécaniquement par rapport à celui qui pourrait être effectué par une coupe femtoseconde (Hamilton *et al.*, 2008, Patel *et al.*, 2007a). Mais nous étions intéressés par la procédure mécanique dans la mesure où son principe physique est très différent de celui de l'ablation laser femtoseconde : en particulier il n'y a pas de bulles de cavitation remplies de gaz (vapeur de H<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> (Juhász *et al.*, 2002)) et les bords de la coupe sont donc *a priori* moins identifiables (voir aussi le chap. 2.1.4 2)) par IGTH dans ce cadre



**Figure 8.1** Coupe mécanique et coupe au laser femtoseconde

(a) photographie d'un œil de porc coupé à l'aide d'un laser Ti:Sa amplifié (INRS). (b) photographie d'un œil de porc coupé avec lame chirurgicale (LC). Les côtés A et B sont juste mis à titre indicatif pour mieux faire apparaître les dimensions du capot créé. (c) photographie prise à l'aide d'un microscope à dissection magnifiant un côté de la coupe par lame chirurgicale où justement il n'y a pas ici de diffusion locale apparente mais un espace (cadré par le rectangle rouge) laissé par la tension s'exerçant des deux côtés de la coupe.

opératoire. Plus généralement cette étude est d'un intérêt particulier puisque de nombreuses opérations chirurgicales, y compris en chirurgie réfractive, continuent à se faire à l'aide d'instruments mécaniques de différents matériaux (ex. métal, diamant...). La complexité de ces instruments s'étend des lames et couteaux chirurgicaux aux microkératomes automatiques

(Braunstein *et al.*, 2007, Vayr *et al.*, 2007), ces derniers permettant en particulier un ajustement précis de la profondeur de coupe. Tous ces procédés mécaniques de coupe offrent encore un bon rapport qualité/prix pour réaliser les différentes opérations discutées plus haut. Il est donc intéressant d'imager ce type de coupe mécanique et les perturbations occasionnelles qu'elle peut générer sur les tissus traversés.

La coupe qui est observée dans ces travaux est en l'occurrence une coupe intrastromale lamellaire dans la mesure où elle est principalement dirigée parallèlement à la surface de la cornée et dans le stroma comme cela se fait lors de la réalisation d'un capot cornéen pour le LASIK. Nous l'avons donc observée par l'IGSH/IGTH depuis l'endroit où elle a été initiée, l'épithélium, jusqu'à plus profondément dans le stroma pour voir quelles perturbations elle serait susceptible d'induire.

## 8.2 Objectifs

L'objectif de ce travail fut d'observer par l'IGSH/IGTH des coupes mécaniques intrastromales lamellaires réalisées à l'aide d'une lame chirurgicale. Nous voulions aussi savoir si l'observation en transmission ou en épi-détection changeait quelque chose quant à la possibilité de repérer la coupe intrastromale. Enfin nous voulions aussi comprendre plus précisément à quoi pouvait être dû le contraste observé sur la coupe intrastromale.

## 8.3 Méthodes

Ces expériences ont été réalisées sur globe entier (voir le chap. 5.2.2 7)) ou dans le cas de la détection en transmission avec la chambre antérieure artificielle (fig. 5.7 (b)). L'objectif condenseur utilisé était toujours l'objectif à immersion Olympus de ON 0.9 avec le gel ophtalmique. En collection, lorsqu'il fallait détecter en transmission, nous placions directement le PM au plus près sous la chambre antérieure artificielle.

Toutes les coupes lamellaires intrastromales ont été réalisées sur l'œil entier frais (même condition de conservation que pour les résultats anatomiques) et si nous voulions ne garder que la cornée pour la monter dans la chambre antérieure artificielle, nous isolions celle-ci qu'une fois cette coupe réalisée. La coupe elle-même fut effectuée sous stéréomicroscope avec une lame

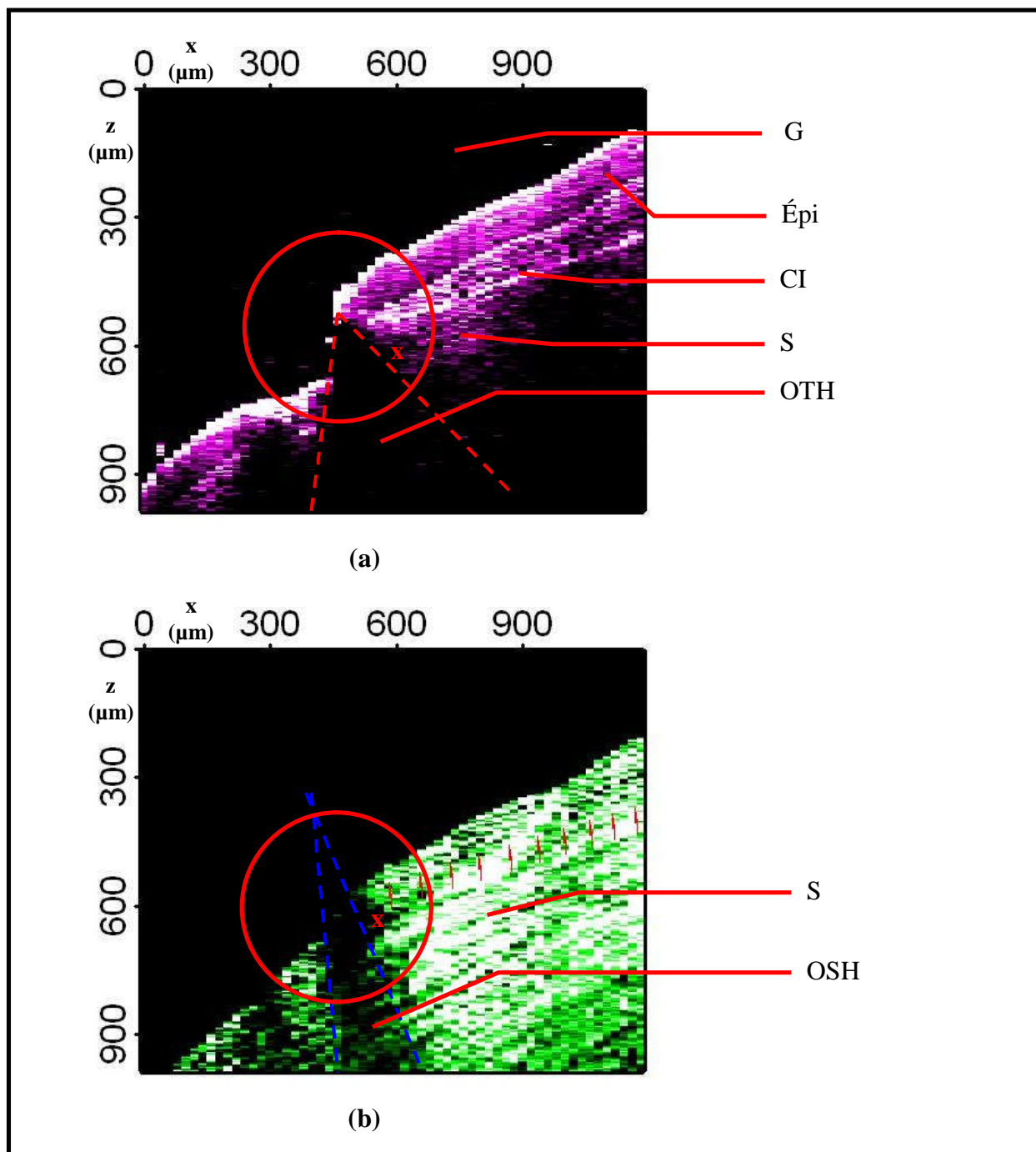
chirurgicale single edge HD razor blades 0.012" (voir la fig. 8.1 (b)). La coupe était partielle et conservait une charnière pour permettre le bon repositionnement du capot sur le stroma. Aucune des cornées observées en IGSH/IGTH ne fut percée jusqu'à la chambre antérieure.

Dans toutes les expériences d'imagerie que nous avons menées pour cette application nous sommes revenus sur le balayage par platines de translation car nous voulions surtout nous focaliser sur l'observation transversale des cornées coupées. La coupe lamellaire effectuée parallèlement à la surface de la cornée s'y prêtait particulièrement.

## **8.4 Résultats et discussion**

### **8.4.1 IGSH/IGTH en épi-détection de la cornée coupée sur œil entier**

Les premières expériences ont été de réaliser l'IGSH/IGTH en épi-détection pour les deux signaux car le montage de l'échantillon était facile dans ce cas. La figure 8.2 illustre le résultat d'observation transversale de cette coupe dans la partie antérieure de la cornée porcine en épi-détection des deux signaux. Comme dans le cas de nos observations sur la cornée intacte nous pouvons facilement identifier l'épithélium et le stroma. Cependant une ligne de contraste (coupe intrastromale dans la figure 8.2) apparaît en plus dans l'image de TH épi-détection. Cette ligne ne peut être que la coupe que la lame chirurgicale a créée car il n'y a pas de raison qu'il y ait justement cette structure dans le stroma et par ailleurs cette ligne commence à l'endroit où une forte dislocation s'est créée qui est révélatrice de l'endroit où la lame a pénétré (région encerclée sur la figure 8.2). Il est cependant intéressant de constater que la SH en épi-détection



**Figure 8.2** Observation transversale de la cornée porcine coupée par une lame chirurgicale

Objectif Olympus ON 0.9 avec immersion au gel ophtalmique. (a) TH (violet) et (b) SH (vert) en épi-détection. Pour voir ce que désignent, le cercle rouge, la croix rouge et les lignes en pointillé, se référer au texte.

G : gel ; Épi : épithélium ; S : stroma ; CI : coupe intrastromale ; OTH : ombre en TH ; OSH : ombre en SH.



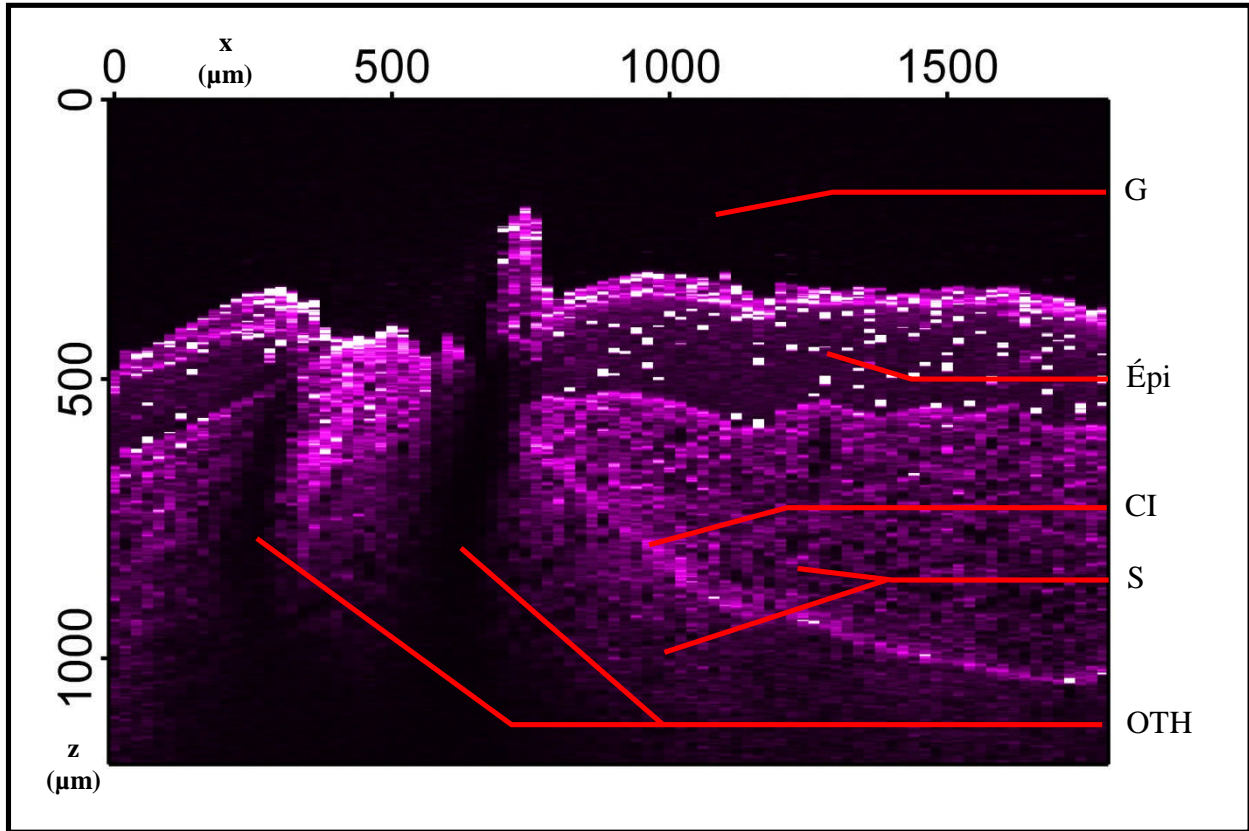
ne révèle rien de cette coupe intrastromale comme peut en témoigner la série de petites flèches disposées le long de ce que nous avons identifié en TH.

Un autre point intrigant sur ces observations est la présence « d'ombres » autant en SH qu'en TH. Ces ombres sont bien identifiables dans la région du cercle. Elles pourraient être dues au fait que la lame a particulièrement perturbé le tissu dans cette zone en le rendant opaque. Les photographies de la figure 8.1 nous avaient justement montré que les bords de la coupe pouvaient présenter une diffusion plus marquée que sous le capot créé. C'est ce qui peut expliquer ce phénomène observé (nous aurons une preuve expérimentale plus loin dans ce chapitre avec les observations en TCO). On remarque par ailleurs une différence dans le contraste de ces ombres pour les deux signaux. Ces images, autant en SH qu'en TH, pour faire apparaître aux mieux ces ombres, ont été saturées par rapport au voltage acquis dans le stroma en dehors des ombres. Le signal est donc normalisé par rapport à cette valeur. Par ailleurs, un seuil à 20 % dans les deux images depuis le minimum dans l'ombre (valeurs différentes pour SH et TH) a été appliqué : ainsi tout ce qui est entre le bruit et 20 % au-dessus du minimum dans l'ombre est mis à zéro pour les deux signaux. Ces 20 % sont arbitraires mais le but est surtout d'avoir le même pourcentage pour les signaux pour pouvoir comparer l'étendue des ombres. Les ombres sont alors délimitées par les lignes tracées sur la figure en pointillé et qui se prolongent plus loin dans le stroma.

Le contraste entre l'ombre et le stroma en dehors de celui-ci est bien plus marqué en TH qu'en SH. Ceci peut s'expliquer par le fait que la TH est un phénomène du troisième ordre alors que celui de SH est du second. D'ailleurs ce contraste moins fort en SH par rapport au stroma fait penser que la petite région sombre marquée d'une croix rouge n'est probablement pas due à ces ombres mais est sans doute une cavité de tissu créée par l'opération. Enfin les lignes délimitant les ombres se croisent et déterminent donc une divergence. On peut alors observer que cette divergence est plus importante pour la TH que la SH. Si le pourcentage de seuil avait été choisi différemment, les lignes auraient du coup donné un autre angle pour les deux signaux mais comme ce pourcentage serait de toutes façons le même pour les deux signaux la comparaison resterait dans le même ordre : une divergence plus forte pour la TH que la SH.

Cette divergence des ombres est cependant délicate à expliquer car nous ne savons pas *a priori*

quel est le diagramme de rayonnement que l'échantillon implique (avec la création de ces obstacles plus ou moins opaques et diffusants) sur la génération de la SH et de la TH. Par ailleurs la longueur d'onde n'est pas la même pour la SH et la TH et cette différence peut induire, si la description de la diffusion de Rayleigh convient<sup>20</sup>, des différences de divergence.



**Figure 8.3** Observation macroscopique transversale en IGTH de la cornée porcine coupée par une lame chirurgicale

Objectif Olympus ON 0.9 avec immersion au gel ophtalmique. TH détectée en épi-détection.

G : gel ; Épi : épithélium ; S : stroma ; CI : coupe intrastromale ; OTH : ombre en TH.

La figure 8.3, qui cadre plus largement une coupe intrastromale épi-détectée en TH, montre que la sensibilité de la TH pour révéler la coupe reste très bonne même à 500 μm de profondeur dans l'échantillon (cet œil avait une pachymétrie mesurée par pachymétrie US -ultrasons- d'environ 1100 μm en début d'expérience d'imagerie). Le signal qui reste encore assez fort dessous pourrait donc probablement, dans cette situation de cornée incisée, révéler les couches postérieures.

20 : en revanche, si la taille des diffuseurs ne justifie pas l'approximation de Rayleigh, la théorie de Mie prévoit que la diffusion est faiblement dépendante de la longueur d'onde.

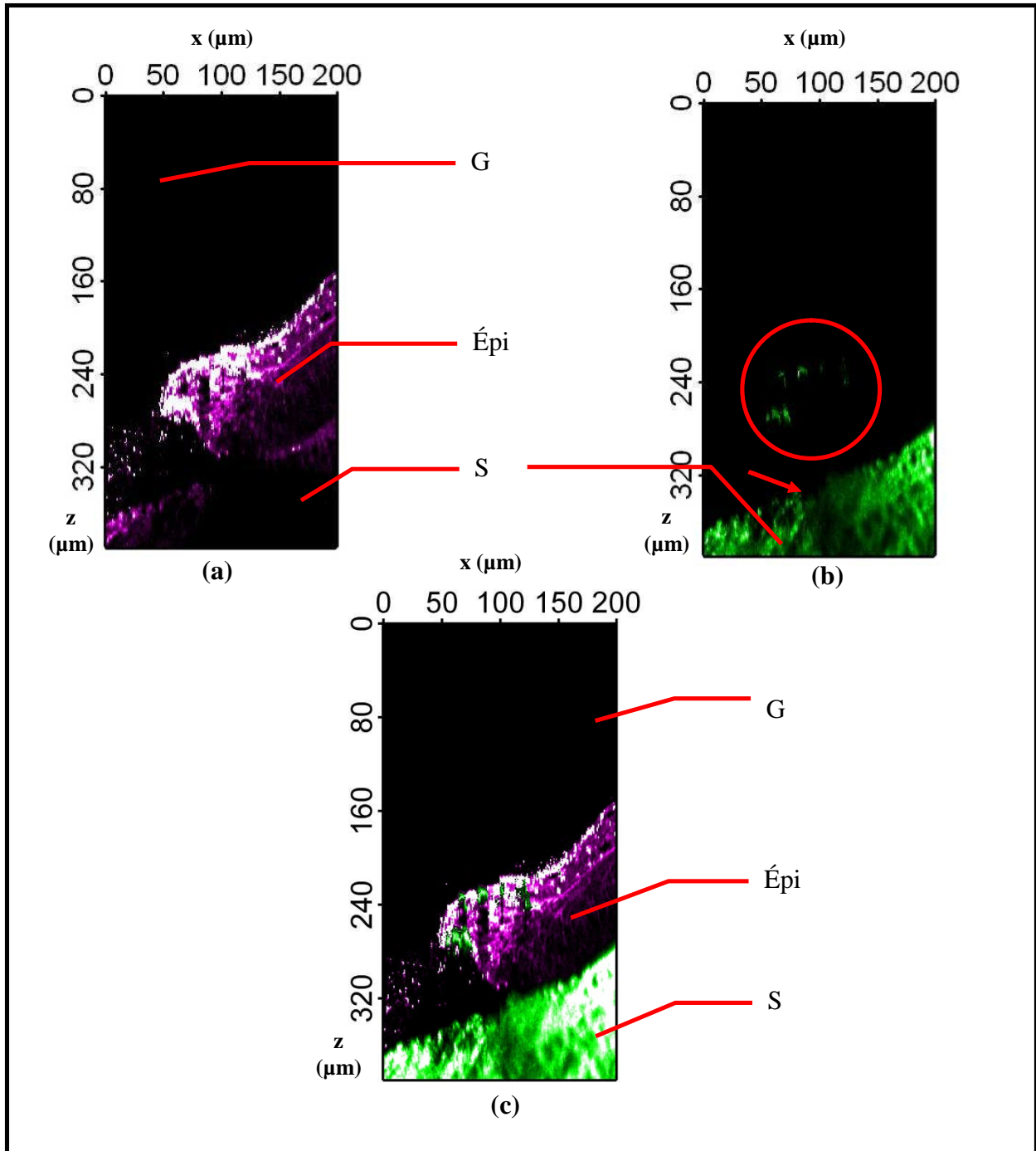
Une fois cette observation macroscopique réalisée, nous voulions faire une observation transversale plus fine sur l'endroit où la lame avait pénétré pour essayer d'identifier plus spécifiquement ce qui pouvait causer les ombres observées. Par ailleurs nous devons aussi réaliser une observation transversale plus définie sur la seule coupe intrastromale pour savoir ce qui permettait de la révéler et vérifier si la SH épi-détectée ne pouvait réellement pas révéler cette coupe.

La figure 8.4 présente cette magnification dans la région où la lame a initié la coupe et la figure 8.5 présente cette magnification autour de la coupe intrastromale. Pour ces deux figures les signaux étaient encore détectés en épi-détection.

La figure 8.4 présente un tissu très perturbé là où la coupe mécanique a été amorcée (déchirure). Trois points principaux peuvent être observés :

- d'une part une discontinuité marquée de l'épithélium : alors que sur le côté droit on peut observer l'épithélium déformé, à gauche de la coupe il n'y en a pas car la première interface de TH de ce côté commence à la même hauteur que celle révélée par la SH ;
- le stress biomécanique induit par la coupe a changé les propriétés optiques dans l'épithélium car on constate que le signal de TH est bien plus fort à l'aplomb du départ de la coupe que plus loin en allant vers le coin supérieur droit de l'image (cette observation peut aussi être faite sur l'image macroscopique en figure 8.2 sur les bords proches de la déchirure). Il se pourrait que cette variation locale de TH confirme une fois de plus le caractère diffusif que peut présenter la coupe mécanique dans le voisinage de ses bords ;
- la perturbation de la coupe semble avoir été si violente qu'une part de collagène a pu être arraché du stroma et se retrouver au-dessus de celui-ci : c'est ce qu'indiquent les objets dans le cercle rouge qui émettent de la SH et on observe par ailleurs un défaut de collagène à l'emplacement indiqué par la flèche en SH. Cependant il ne faut pas exclure que le stress biomécanique ait aussi pu modifier localement les propriétés optiques de l'épithélium, en particulier en surface où les cellules sont par ailleurs densément empilées.

Ce stress biomécanique pourrait être une nouvelle source de SH dans l'épithélium.



**Figure 8.4** Observation transversale magnifiée au départ de la coupe

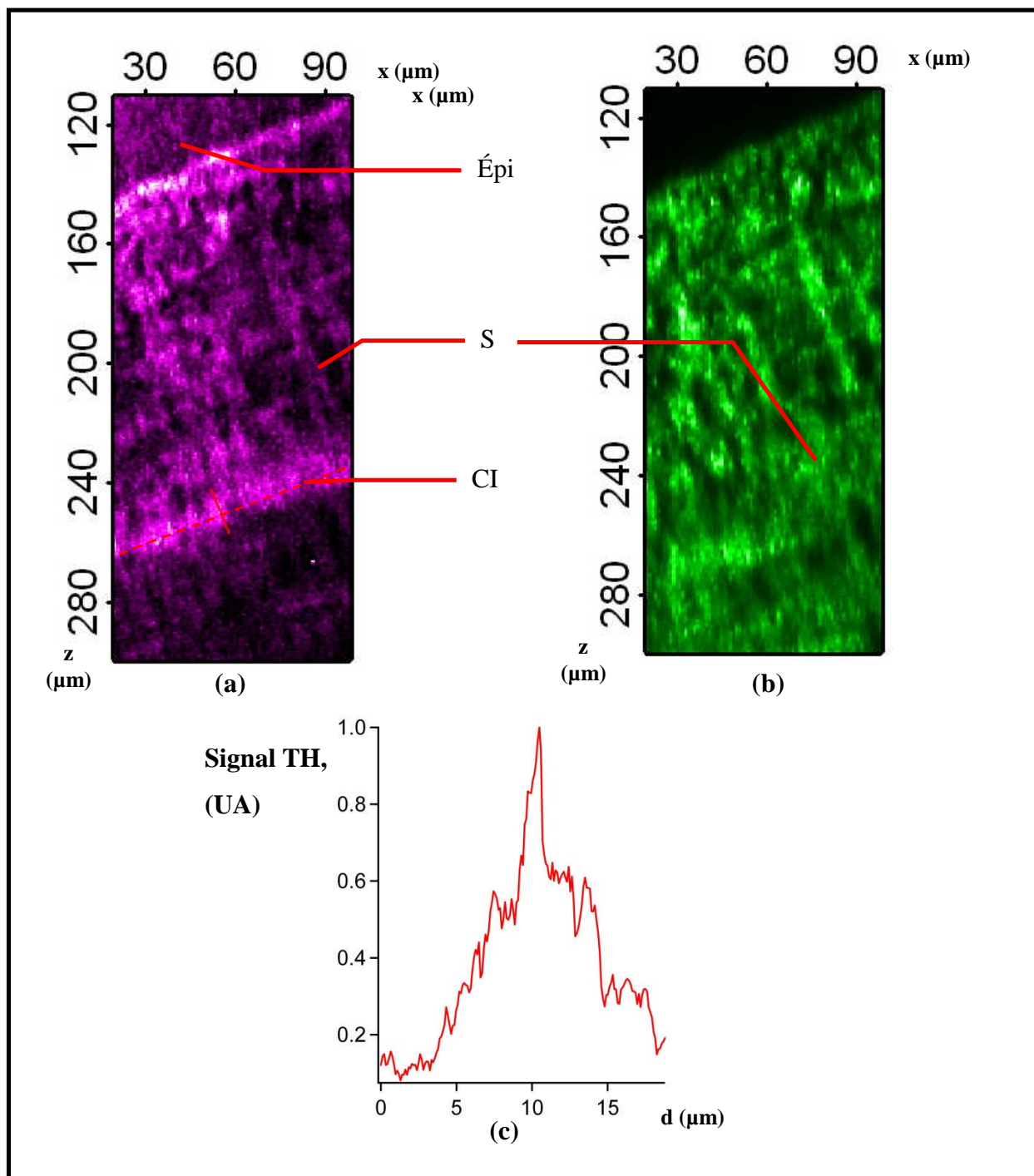
Objectif Olympus ON 0.9 avec immersion au gel ophtalmique. (a) TH (violet) et (b) SH (vert) en épi-détection. (c) fusion des deux signaux. Pour voir ce que désignent, le cercle rouge et flèche rouge, se référer au texte.

G : gel ; Épi : épithélium ; S : stroma

La figure 8.5 est cadrée plus spécifiquement dans le stroma pour voir comment apparaît en détail la coupe. Il peut être vérifié que la coupe est observable en TH épi-détection, mais qu'il n'y a pas de correspondance en SH épi-détection. L'information vient donc essentiellement du signal acquis en TH épi-détection. Sur cette portion transversale de 80  $\mu\text{m}$ , la coupe apparaît donc sous la forme d'une bande de signal d'épaisseur constante avec le signal environnant du stroma (la figure 6.4 des résultats anatomiques montre que le stroma fournit un signal tout de même fort de TH dans sa partie antérieure). Surtout, les deux bords de la coupe ne parviennent pas à être résolus spatialement en TH épi-détection et il n'y a pas un signal plus faible au centre de la bande.

La bande de signal est assez large comme en témoigne la figure 8.5 (c). Sur la figure 8.9, plus loin dans ce chapitre, nous évaluons expérimentalement la résolution axiale de TH en épi-détection comme nous l'avons fait dans la partie méthode (voir le chap. 5.2.2 8)). Nous trouvons sur la base des huit positions indiquées (traits bleus sur la figure 8.9 (a)) pour avoir l'interface épithélium/stroma (à environ 220  $\mu\text{m}$  sous la surface cornéenne pour ce sujet, i.e. environ la même profondeur que dans notre cas en figure 8.5) perpendiculaire à l'axe optique, une résolution axiale expérimentale de TH en épi-détection de :  $2.9 \pm 0.7 \mu\text{m}$ . Cette valeur reste assez proche de la résolution axiale de TH que nous avons pour la transmission. Comme la coupe est présentée de biais par rapport à l'axe optique dans la figure 8.5, elle est en partie résolue latéralement si bien que  $2.9 + 0.7 \mu\text{m}$  représente un maximum dans cette situation : la résolution est donc meilleure. Comme 3.6  $\mu\text{m}$  est largement inférieur aux dimensions de largeur de la bande d'après le profil en figure 8.5 (c), soit la coupe ne contient pas de collagène mais est remplie dans son vide d'objets qui sont autant de sources pour la TH, soit les deux bords de la coupe se sont recollés et la GTH peut autant être due à des objets à l'exacte interface entre les deux bords réassemblés qu'à des perturbations ayant eu lieu dans le stroma voisin.

La résolution en SH épi-détection suivant l'oblique de la coupe peut être évaluée sur l'interface épithélium/stroma. Elle vaut environ 4  $\mu\text{m}$ . Au niveau de la coupe elle est *a priori* moins bonne puisque nous avons vu, l'imagerie en profondeur se dégrade. Cependant il est très peu probable qu'elle soit si mauvaise qu'elle ne parviendrait pas à résoudre la coupe d'au moins 7  $\mu\text{m}$  si celle-ci laissait un vide. Ainsi, les deux bords du stroma se recolleraient « parfaitement » après la coupe, avec la lame, effectuée.



**Figure 8.5 Observation transversale magnifiée de la coupe intrastromale**

Objectif Olympus ON 0.9 avec immersion au gel ophtalmique. (a) TH (violet) et (b) SH (vert) en épi-détection. La ligne rouge en pointillé indique la direction de la coupe. Le trait plein rouge sur (a), indique le segment pour le profil (c) avec d ( $\mu\text{m}$ ) la distance le long de ce segment.

Épi : épithélium ; S : stroma ; CI : coupe intrastromale.

## 8.4.2 TCO de la cornée coupée sur œil entier

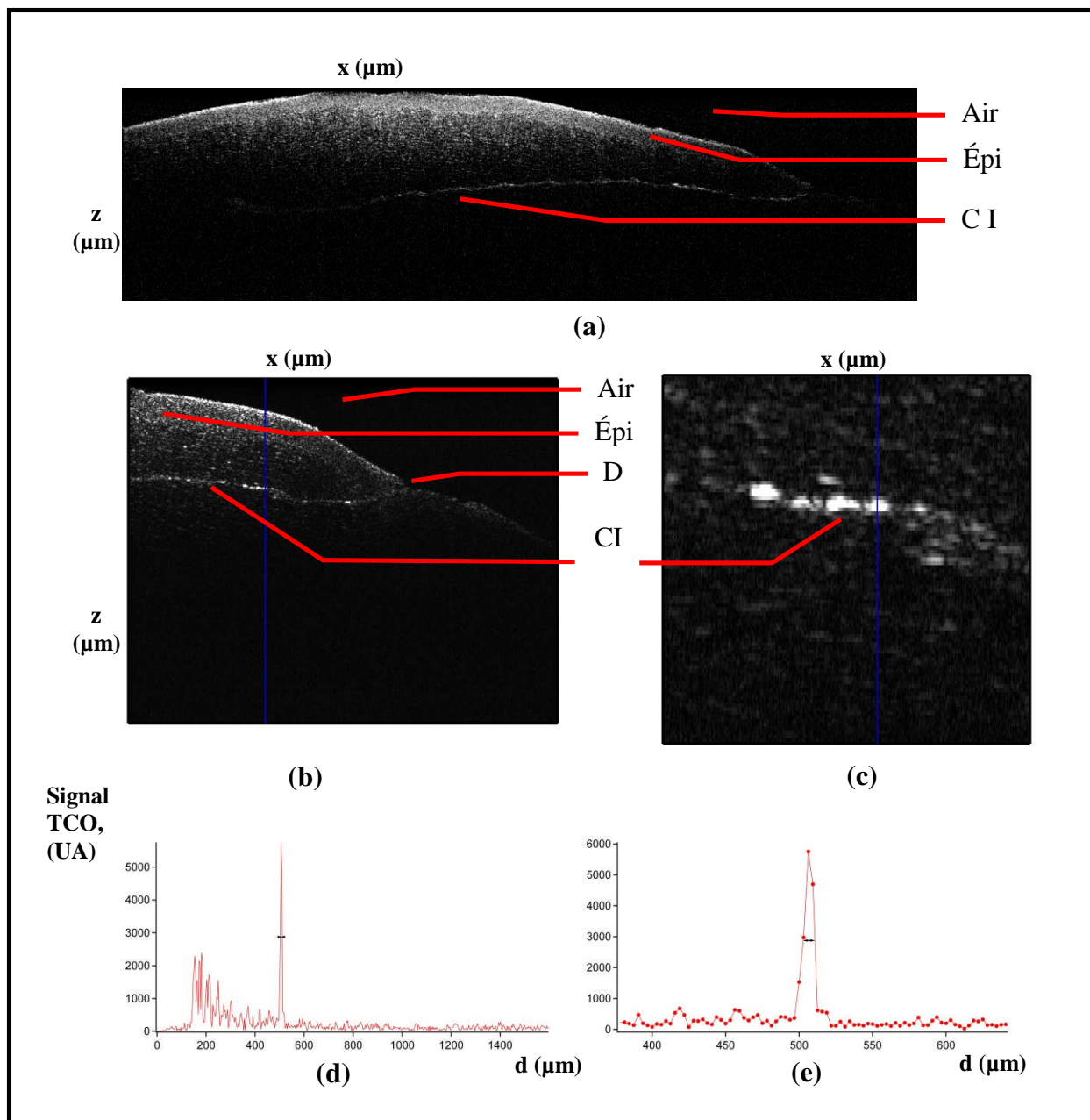
### 1) observations générales :

Pour apporter des réponses à ces différents points (ombres, dimensions de la coupe intrastromale) et voir les différences d'observations sur la cornée incisée, entre notre microscopie de générations d'harmoniques et une imagerie d'optique linéaire, nous avons mené des expériences de TCO sur des yeux coupés. Les cornées porcines fraîches peuvent provenir d'yeux différents mais le protocole chirurgical reste le même que décrit précédemment. La TCO avec lequel nous avons fait ces mesures a été le même que celui utilisé pour les résultats illustrés en figure 6.5.

Sur les figures 8.6 (a) et (b) la coupe intrastromale est observable depuis l'endroit où elle a été initiée (déchirure) et son prolongement dans le stroma. Elle apparaît, comme en IGTH, comme une trace de signal sans laisser de cavité apparente. Cependant, le signal de la coupe n'est pas d'amplitude constante et peut être suffisamment faible pour être perdu dans le bruit du signal de stroma par endroit.

La figure 8.7 montre une acquisition au plus près de la déchirure. Dans la déchirure même, il est difficile de cerner où se trouve l'épithélium par rapport au stroma : à cet endroit une trace révélant la coupe intrastromale n'est pas discernable comme dans la figure 8.6 mais au-dessus des flèches dessinées, il y a un niveau de signal globalement plus fort qu'en dessous, sans qu'il soit possible de distinguer l'épithélium du stroma ou si la partie du dessus inclut la coupe. Nous n'avons constaté ce palier que près de la déchirure : plus loin dans le stroma la coupe intrastromale contrastait seule au-dessus d'un niveau moyen de signal dans le stroma de par et d'autres de la coupe.

L'imagerie de SH/TH ne peut pas présenter ce type d'ambiguïté sur la distinction de l'épithélium par rapport au stroma, combien même il y aurait saturation par un éclairage trop fort, puisque la répartition des signaux entre les différentes structures, i.e. épithélium par la TH, et stroma par la SH, permet une identification sans équivoque par ce contraste spectral (fig. 8.2 et 8.4 (c)).



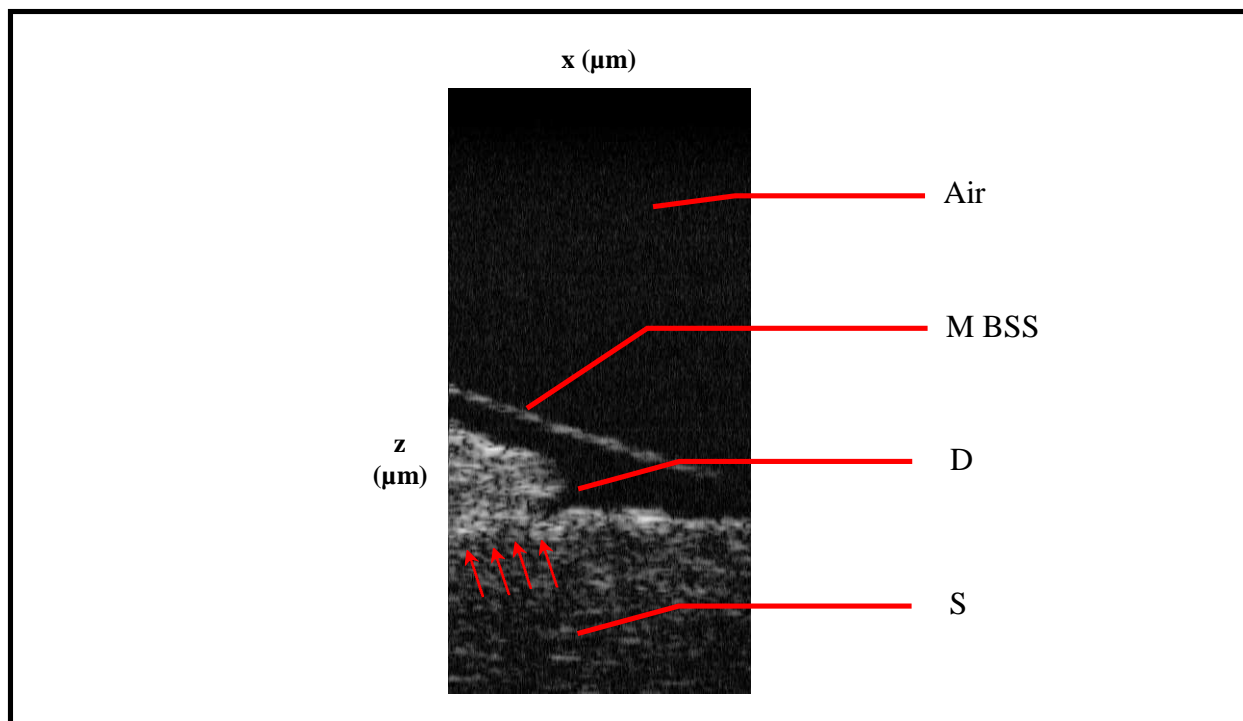
**Figure 8.6 Observations transversales par TCO commerciale d'une cornée porcine coupée : vue d'ensemble et coupe intrastromale**

Acquisition TCO avec l'appareil OCP930SR (Thorlabs). (a) acquisition montrant la coupe dans son ensemble. (b) voisinage de la déchirure. (c) zoom sur les pixels de la coupe intrastromale (pour (b) et (c), la ligne bleue indique la même droite sur laquelle le profil (d) a été réalisé). (e) est un zoom du profil (d) sur le pic de coupe intrastromale.

Les dimensions de (a), (b) et (c) sont respectivement de : 1.6x6.0 mm, 1.6x2.0 mm et 0.3x0.3 mm.

Épi : épithélium ; D : déchirure ; CI : coupe intrastromale.





**Figure 8.7 Observations transversales par TCO commerciale d'une cornée porcine coupée : grossissement sur la déchirure**

Acquisition TCO avec l'appareil OCP930SR (Thorlabs). (a) acquisition dans le très proche voisinage de la déchirure. Les dimensions de la figure sont de : 0.4x0.8 mm.

M BSS : ménisque de solution saline (balanced salt solution) ; D : déchirure ; S : stroma.

Cette situation de signal particulièrement fort dans le très proche voisinage de la déchirure pourrait s'expliquer par le fait qu'une compression tissulaire, comme peut en faire subir une lame chirurgicale, ait des conséquences sur la diffusion et la rétro-diffusion. Cette modification optique du tissu peut être révélée en TCO comme d'autres travaux l'ont déjà documenté (Alvarez Ferré, 2009). Il se pourrait que cette même cause soit à l'origine du fort signal de TH épi-détectée dans l'épithélium sur la figure 8.4. Par ailleurs cette même portion de cornée plus diffusante est également plus opaque et explique les ombres qui en partent. Ce phénomène d'ombres est également connu en TCO (Fabritius *et al.*, 2009, Girard *et al.*, 2011) et la figure 8.8 l'illustre avec trois types de corps opaques : la sclère (a) et (a') est particulièrement diffusante la rendant opaque ; les bulles de gaz, formées par LASIK femtoseconde (b), et dont l'indice de réfraction est très différent du stroma environnant, sont suivant leur taille, diffusantes ou très réfléchissantes induisant également des ombres à leur aplomb ; les vaisseaux sanguins de la rétine absorbent par

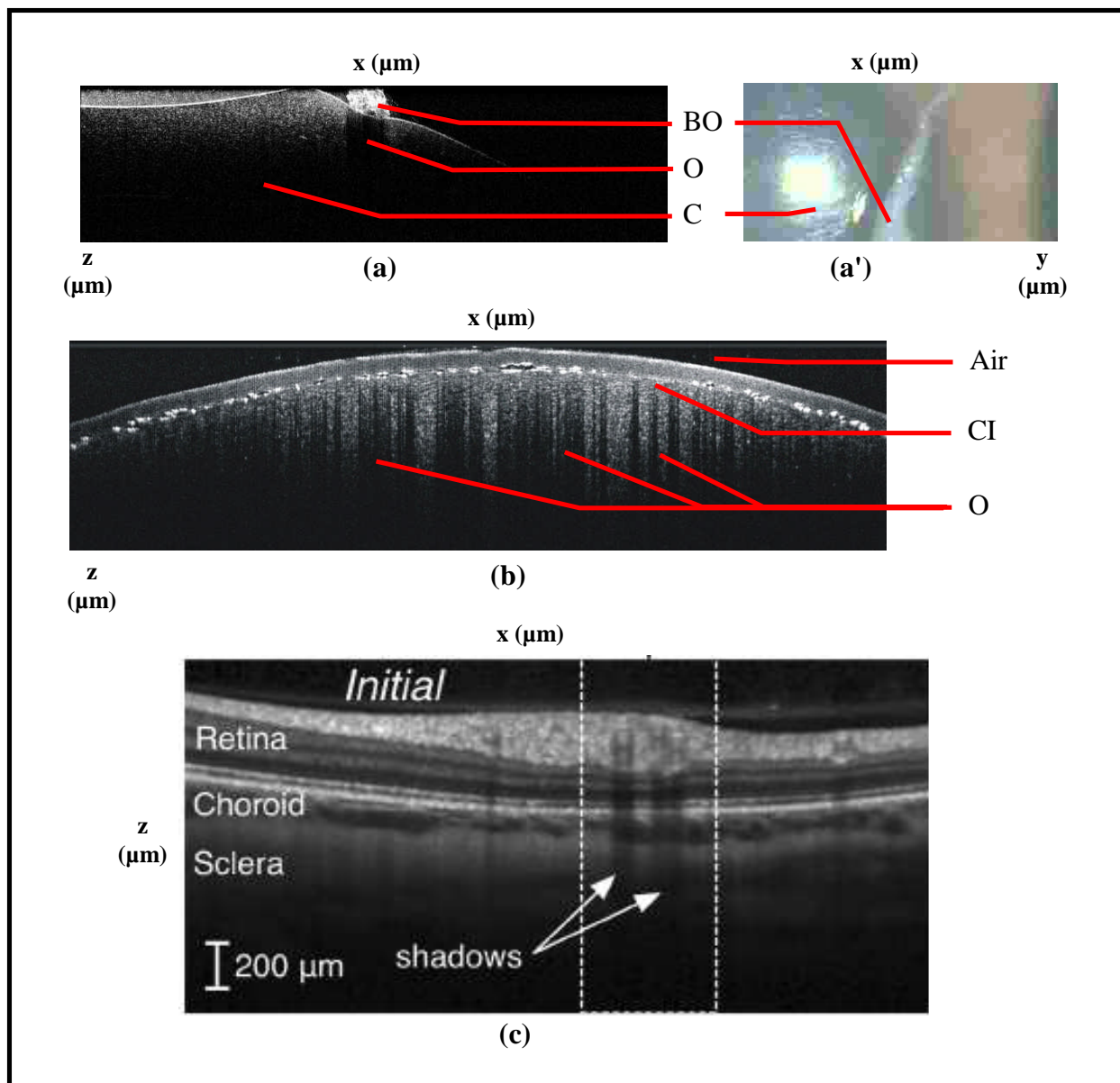
l'hémoglobine (c). Ainsi, mis à part le cas (c) puisque la cornée n'est pas vascularisée, ces différentes situations sont également à prendre en compte dans nos expériences : elles expliquent sur la figure 8.4 la présence des ombres et les signaux de TH particulièrement forts en épi-détection amplifiés par la rétrodiffusion ou la réflexion. Nous avons également constaté cette situation à l'utilisation de l'objectif sec en condenseur (fig. 6.2).

## **2) dimensions de la coupe intrastromale en TCO :**

L'image de la figure 8.6 (b) est de dimension 2000 pixels horizontalement et 512 verticalement. Puisque la dimension verticale est de 1.6 mm, la TCO a acquis une valeur de signal tous les 3.1  $\mu\text{m}$  soit un échantillonnage d'à peu près la moitié de ce que vaut la résolution axiale en l'estimant à un minimum de 6.2  $\mu\text{m}$  (donnée constructeur dans l'air). Cet échantillonnage est donc suffisant d'après le critère de Nyquist. Sur les figures 8.6 (b) et (c) est représentée une ligne bleue le long de laquelle nous avons réalisé un profil d'épaisseur : sur 8.6 (c) quelques pixels de signal plus forts permettent de révéler la coupe intrastromale.

Nous avons fait huit profils similaires croisant la coupe intrastromale perpendiculairement de telle façon que l'imagerie de la coupe, n'interroge que la résolution axiale. Cela dit, il n'est pas évident *a priori* que la coupe intrastromale soit sous-résolution pour la TCO. Mais à y regarder de près, comme sur le graphe de la figure 8.6 (e), nous remarquons que peu de points participent au signal de ce pixel de forte valeur non saturé. Comme l'échantillonnage axial (3.1  $\mu\text{m}$ ) est suffisant, il faut en déduire que la coupe intrastromale est bien sous-résolution pour cet appareil de TCO. Ceci peut s'expliquer par le fait que cette TCO qui utilise un objectif sec subit la détérioration de sa résolution par l'effet combiné de la réfraction (déjà vu au chapitre 5.2.2 8)) et la diffusion du tissu.

Ainsi, les huit mesures ont donné des largeurs à mi-hauteur de  $8.4 \pm 1.6 \mu\text{m}$ . Notre microscope de génération d'harmonique donne une bande de signal de largeur assez similaire à cette valeur, mais possède une résolution spatiale suffisamment forte pour affirmer que cette bande contient des objets, comme le pic central de la figure 8.5 (c), source de TH qui peuvent eux-mêmes être résolus.



**Figure 8.8** Phénomènes d'ombre en TCO pour des tissus opaques par diffusion, réflexion et absorption

(a) acquisition réalisée avec l'appareil OCP930SR (Thorlabs) : ombre par un bout de blanc d'œil, i.e. principalement sclère, déposé sur une cornée. (a') photographie du bout de sclère déposé sur la cornée pour l'acquisition de (a). (b) TCO d'ombres induites par une coupe intrastromale au laser femtoseconde. (c) TCO d'ombres (shadows) induites par les vaisseaux sanguins dans la rétine. Les dimensions de (a) sont de : 1.6x6.0 mm.

BO : blanc d'œil ; O : ombre(s) ; C : cornée ; CI : coupe intrastromale.

Les sources sont tirées de : (b) (Rowiak, 2009) (c) (Girard *et al.*, 2011).

### 8.4.3 Nature des sources de signal sur la coupe intrastromale

Alors qu'une coupe intrastromale remplie du liquide intrastromal (eau ou solution saline<sup>21</sup> (Meek *et al.*, 2003a)) se révèle très peu en TCO (Wirbelauer *et al.*, 2005) de par la faible différence avec l'indice de réfraction du stroma, la coupe intrastromale de notre expérience de TCO est particulièrement rétro-diffusive ou réfléchive : le graphe de la figure 8.6 (d) montre même que le signal de la coupe intrastromal peut être plus fort que celui de la surface de la cornée.

La diffusion d'après la théorie de Mie est fonction de deux caractéristiques importantes du matériau<sup>22</sup> :

- la force du signal de diffusion est fonction croissante de la différence des indices de réfraction de l'objet diffusant et de celui de son environnement. Ceci est valable quelque soit les dimensions de l'objet diffusant. Cette dépendance vaut aussi pour la réflexion de Fresnel;
- la proportion de signal de diffusion émis vers l'arrière par rapport à celui émis vers l'avant, est fonction décroissante de la taille de l'objet diffusant : plus la particule est petite, plus elle est en mesure de rétro-diffuser directement.

Ainsi, le signal de TCO sur la coupe intrastromale tient à des objets dont l'indice de réfraction contraste avec celui du stroma environnant. Ces objets pourraient en partie être de l'air qui soit resté piégé à l'occasion de la coupe ce qui apporterait justement un milieu d'indice fort différent. Cependant beaucoup de natures différentes de ces objets sont possibles comme certains auteurs l'ont proposé. Juste une fois la coupe intrastromale d'un LASIK effectué au microkératome métallique, cette coupe fraîchement<sup>23</sup> effectuée peut garder des débris (Hirst *et al.*, 1998, Ivarsen *et al.*, 2004, Vesaluoma *et al.*, 2000). Certains de ces débris sont propres à une véritable opération chirurgicale utilisant un microkératome automatique (ex. éponge, plastique du microkératome, cellules de peau). Cependant d'autres, également suggérés, ont certainement été introduits à l'occasion de notre protocole : ex. cellules épithéliales, fragments cellulaires,

21 : l'indice de réfraction est différent sur la troisième décimale

22 : voir « Mie Scattering Calculator » avec [http://omlc.org.edu/calc/mie\\_calc.html](http://omlc.org.edu/calc/mie_calc.html)

23 : nous ne parlons ici que de ce que la coupe peut induire et non des processus de cicatrisation qui surviennent après en *in vivo* : activations des kératocytes... En effet des complications combinant biologie *in vivo* et débris d'origine peuvent induire après la chirurgie une densité croissante de points brillants observables en microscopie confocale. C'est la Kératite lamellaire diffuse qui est une réaction inflammatoire de la cornée.

fragments métalliques de la lame. Ces débris sont observables de façon très disséminée en microscopie confocale comme peut le montrer la figure 3-21 A et B, du livre « refractive surgery » (Jester, 2007b).

Dans nos expériences, nous n'avons pas eu recours à un microkératome automatique, ce qui élimine la possibilité de présence de particules plastiques. Le fait que la TCO ou la microscopie de TH permette de voir la coupe de façon continue pourrait laisser penser que ces méthodes soient sensibles à un panel plus large d'objets diffusifs d'optique linéaire ou non linéaire. Comme l'indice de réfraction du stroma tient à un équilibre précis entre ses différents composants (ex. fibrilles de collagène, eau (Meek *et al.*, 2003a)), il est possible que la lame mécanique est modifié localement l'indice autour de la coupe intrastromale. Dans le cas de la TH les modifications des caractéristiques optiques du matériau sont plus ouvertes qu'en TCO puisque, comme nous l'avons vu, ce signal est fonction des indices, de leur dispersion et de  $\chi^3$  (éq. 65). Par ailleurs, la coupe peut avoir induit des modifications biomécaniques déchirant le collagène. En effet si le collagène est réorienté ou raccourci, il présente au faisceau des dimensions différentes que celles dans le cas normal, modifiant complètement son diagramme de rayonnement que ce soit en optique linéaire ou non linéaire cohérente. Il faut remarquer que ces débris ont également été documentés sur une coupe intrastromale fraîchement réalisée au laser femtoseconde, ce qui laisse penser que leur origine peut tout aussi être exogène (corps étrangers (Hirst *et al.*, 1998)) qu'endogène (cellules, débris de collagène (Sonigo *et al.*, 2006)).

Ainsi, le seul moyen véritable de résoudre définitivement cette question sur la nature de ces débris serait de recourir à une imagerie non invasive de haute résolution spatiale et spectrométrique<sup>24</sup>, sur telle espèce animale, même si des images encore plus fine de TH *en face* dans la coupe, et de SH/TH autour pour explorer plus finement la perturbation du réseau de collagène, devrait apporter des informations supplémentaires.

24 : l'étude de Ivarsen *et al.* (2003) a utilisé à cet effet la microscopie CARS. Cependant cette méthode ne leur a servi qu'à dévoiler qu'une partie de la nature des sources de signal observées en microscopie confocal puisque comme le souligne également Sonigo *et al.* (2006) la microscopie confocale permet de révéler de grosses particules dispersées (ces particules de plastique supposées) mais également un tapis de sources plus présentes mais moins réfléchissantes.

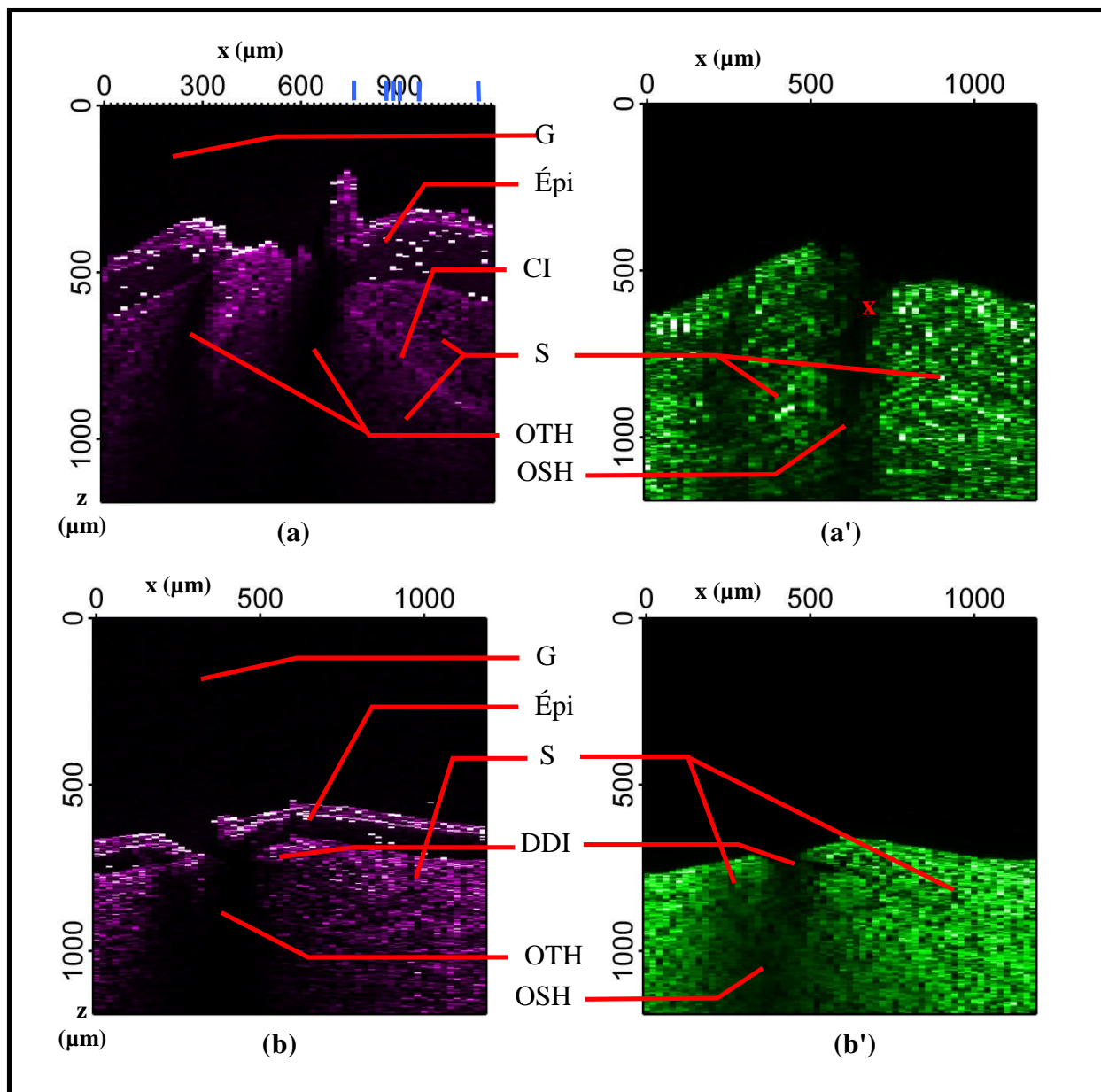
#### 8.4.4 Comparatif IGSH/IGTH de la coupe intrastromale en transmission et en épi-détection

##### 1) Résultats

Avec ce modèle commercial de TCO, nous ne pouvions pas acquérir d'images transversales en transmission mais nous l'avons fait avec l'IGSH/IGTH pour voir comment la coupe intrastromale se révélait suivant la configuration de détection.

La figure 8.9 présente les résultats de ces différentes acquisitions sur la cornée porcine incisée. Dans la première configuration (a) et (a') nous avons épi-détekté la TH et détekté la SH en transmission. Comme nous l'avons déjà vu la TH épi-détektée, révèle sans problème la coupe intrastromale. Par ailleurs, sur cette acquisition on peut mesurer l'importance de la désorganisation des parties antérieures de la cornée opérée, ces perturbations se concentrant principalement dans l'épithélium. La SH en transmission, révèle des perturbations sur le stroma près de l'épithélium. Cependant elle ne révèle pas non plus dans ce cas de détektion en transmission, la coupe intrastromale, par un contraste ou une amélioration de résolution spatiale qui serait propre à cette configuration : la coupe intrastromale qui débute depuis l'astérisque rouge, par référence à la TH épi-détektée, est suivi d'un petit trou latéral mais en s'enfonçant d'avantage dans le stroma la coupe intrastromale n'est plus visible. Par ailleurs, il n'y a pas non plus de niveau de signal de SH différent au-dessus et en dessous de la coupe intrastromale localisée par la TH. Ainsi que ce soit en épi-détektion ou en transmission le seul moyen permettant de révéler la coupe intrastromale mécanique, en SH, serait un vide suffisamment large pour pouvoir être résolu. Ce constat est en accord avec l'étude<sup>25</sup> de Morishige *et al.* (Morishige *et al.*, 2008) qui n'ont pas relevé de particules qui auraient été des sources de signal pour l'IGSH que ce soit en transmission ou en épi-détektion.

25 : dans cette étude, un laser femtoseconde a été utilisé mais il est connu que les débris sont en partie communs pour les deux types de coupe.



**Figure 8.9** Différences sur les observation transversale de la cornée porcine coupée par une lame chirurgicale entre la détection en transmission et épi-détection

Objectif Olympus ON 0.9 avec immersion au gel ophtalmique. (a) TH (violet) en épi-détection et (a') SH (vert) en transmission. (b) TH (violet) en transmission et (b') SH (vert) en épi-détection. Les traits bleus sont là pour montrer où les profils 1D ont été choisis pour faire les mesures de résolution axiale en TH (voir plus haut texte fig. 8.5) au niveau de l'interface epithelium/stroma. Sur  $x=780 \mu\text{m}$  et  $x=980 \mu\text{m}$  deux mesures sur pics proches.

G : gel ; Épi : épithélium ; S : stroma ; DDI : déchirure et début d'incision ; CI : coupe intrastromale ; OTH : ombre en TH ; OSH : ombre en SH.

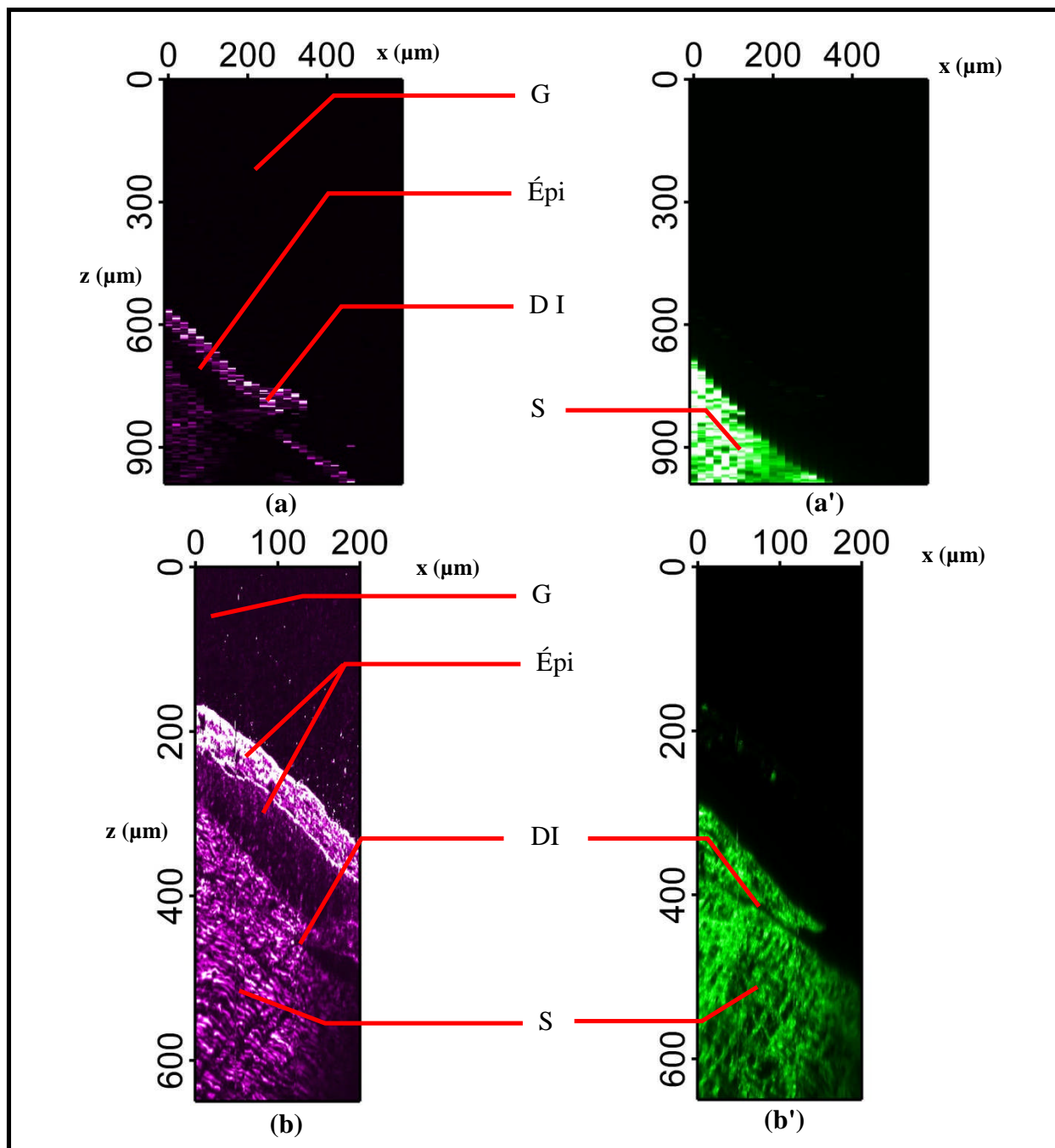


Figure 8.10 Observation transversale magnifiée de la coupe intrastromale dans la configuration TH en transmission

Objectif Olympus ON 0.9 avec immersion au gel ophtalmique. (a) TH (violet) en transmission et (a') SH (vert) en épi-détection : vue large sur la déchirure. (b) TH (violet) en transmission et (b') SH (vert) en épi-détection : vue proche sur la déchirure.

G : gel ; Épi : épithelium ; S : stroma ; DI : début d'incision.



Toujours en figure 8.9, dans la configuration (b) et (b') qui est associé au même œil porcin que dans l'expérience (a) (a'), nous avons épi-déecté la SH et déecté la TH en transmission. Encore dans cette expérience, la SH confirme son impossibilité de déecté la coupe intrastromale. La TH en transmission ne révèle pas la coupe intrastromale. La SH montre une large cavité (DDI sur la figure 8.9 (b')) qui est *a priori* le début de la coupe intrastromale mais sur l'image de TH aucune ligne de coupe visible ne prolonge cette cavité.

En acquérant de façon plus résolue autour de la déchirure et dans la même configuration (SH épi-déectée et TH en transmission), le résultat en figure 8.10 confirme cet état de fait.

Ainsi la TH ne peut révéler la coupe intrastromale mécanique qu'en épi-déecté.

## 2) Discussion

Nous savons que même si la cornée saine est transparente, elle diffuse légèrement et ceci explique la diminution du signal autant avec les méthodes en optique linéaire (TCO, microscope confocal) que sur l'imagerie non linéaire comme nous l'avons nous même constaté en microscopie d'harmoniques (voir profiles de signal sur le chapitre 6). Par ailleurs, la coupe intrastromale mécanique rétrodiffuse comme nous pouvons le constater en TCO.

Cependant nous sommes en droit de nous demander si cette rétrodiffusion en TCO est une émission directe vers l'arrière ou si elle redirige la lumière émise au-dessus de la coupe intrastromale et fait, dans ce cas, écran pour ce qui est dessous induisant donc des ombres. Ces ombres ne sont pas vraiment prononcées sur nos images de TCO en comparaison avec celles illustrées en figure 8.8. Surtout, il est remarquable qu'aucun palier de signal ne s'observe en SH au-dessus et au-dessous de la position de la coupe intrastromale. Si la coupe intrastromale faisait écran, elle devrait révéler ces deux paliers en SH.

Ainsi si la coupe intrastromale se voit en épi-déecté en TCO ou en TH c'est qu'elle émet en partie directement en arrière. Que ce soit en TCO en SH ou en TH, pour qu'il y ait une part importante de signal qui soit émis vers l'arrière il faut que les objets émissifs soient très petits. En TCO donc en optique linéaire, c'est la situation de la diffusion de Rayleigh. En SH, nous avons vu (fig. 3.8) que suivant l'orientation du collagène nous ne présentions pas les mêmes dimensions à la fondamentale et en TH, la tendance est la même comme a pu par exemple en discuter Débarre *et al.* (2007b).

Comme la SH ne décèle pas de signal vers l'arrière c'est que la contribution du collagène dans la coupe intrastromale dans cette diffusion vers l'arrière est *a priori* négligeable. Que ce soit en optique linéaire dans la théorie de Mie, ou justement l'approximation de Rayleigh pour les petites particules ou dans la théorie de la TH (J. X. Cheng *et al.*, 2002, Débarre *et al.*, 2007b), le signal peut au mieux se répartir à égalité entre l'avant et l'arrière. Une fois ce signal émis, il doit regagner la détection et subir alors la diffusion du tissu sur son retour. Ceci rentrerait dans le cas plus « classique » de situation que Débarre *et al.* (2007b) décrit pour expliquer pourquoi l'épi-détection peut révéler des objets que la transmission ne peut pas, lorsqu'un échantillon épais est sondé. Nous n'avons pas fait l'expérience sur les cornées coupées mais pour apporter une confirmation supplémentaire, nous aurions pu retourner la cornée avec l'épithélium au plus profond de l'échantillon pour voir si dans ce cas où la coupe est près de la sortie de l'échantillon, en transmission, nous avons l'observation de la TH en transmission au détriment de celle en épi-détection.

Ainsi au regard de ce que nous avons pu dire sur le chapitre sur la nature des sources de signal et ici en discussion, il y aurait peut-être de grosses particules très réfléchissantes, quoique le plastique des appareils de microkératome automatique soit exclu, et d'autres beaucoup plus petites résultant dans une part d'émission directe vers l'arrière. Les grosses particules très réfléchissantes ne peuvent pas, par ailleurs, être en concentration importante sinon elles impliqueraient, par leur opacité, des images où la coupe intrastromale se révélerait plus par palier de part et d'autre de celle-ci que des images où la coupe intrastromale contraste au milieu d'un signal moyen du stroma comme c'est le cas en TCO ou IGTH.

## 8.5 Conclusion et perspectives

La coupe intrastromale mécanique qui est un objet difficile à résoudre spatialement a cependant des mécanismes de contraste, pour la TH, bien différents de l'interface stroma/membrane de Descemet et l'IGTH fournit des informations que ni l'IGSH ni l'IF2P ne pourraient fournir. Par ailleurs, même si sur cette expérience de cornée coupée mécaniquement, une part importante d'informations peut déjà être fournie par la TCO, celle-ci a des limitations sur la résolution spatiale que ce soit en axial ou en latéral. Nous avons également vu l'utilité de l'IGTH pour lever l'ambiguïté d'imagerie de la TCO au début de la déchirure. Même si les sources dans la coupe

intrastronale semblent donner les mêmes tendances de contraste pour la TCO et l'IGTH, il serait intéressant d'approfondir sur la coupe intrastronale ce qui les différencie plus précisément : il faudrait en particulier réaliser des images *en face* résolue en polarisation en TH.

Les phénomènes d'ombre seraient par ailleurs une source d'information à exploiter pouvant renseigner directement sur la diffusion et le diagramme de rayonnement des signaux d'harmoniques. Ces phénomènes ne sont pas trop gênants car le signal reste quand même détectable sous les opacités créées.

En tous les cas, le fait que des incisions mécaniques, qui sont des opérations très courantes en chirurgie cornéenne et néanmoins moins faciles à observer que des opérations laser femtoseconde, puissent justement se révéler en épi-détection est encore un très bon signe de la potentialité d'utiliser l'IGTH de pair avec l'IGSH dans un contexte *in vivo* voire clinique. Ces imageries non linéaires partagent, de plus, toutes les deux la même technologie femtoseconde. L'IGSH/IGTH a donc la capacité de fournir les mêmes observations que la combinaison IGSH, IF2P et microscopie confocale ou TCO.

Enfin l'IGSH/TH pourrait également offrir des possibilités intéressantes pour suivre dans la cornée opérée, la coupe et sa cicatrisation : sa position le long de l'épaisseur (observation transversale) mais aussi dans la coupe même, la façon dont le collagène et les kératocytes se réorganisent comme d'autres travaux l'ont fait à l'aide de la microscopie électronique (Y. Y. Cheng *et al.*, 2009). En effet contrairement à la microscopie confocale (Sonigo *et al.*, 2006), l'IGSH/TH peut observer le collagène et en suivre sa direction en exploitant par ailleurs la polarimétrie.



## 9 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans ce travail de doctorat, nous avons tout d'abord présenté les limitations des instrumentations ophtalmiques relevant de l'optique linéaire. Ces limitations peuvent être liées à l'invasivité, car certaines méthodes (microscopie de fluorescence en particulier) requièrent des marqueurs compliqués à concevoir car risquant d'être toxiques chimiquement ou photochimiquement. Ces marqueurs qui sont des consommables augmentent aussi le budget associé à ces imageries. Pour certaines imageries cliniques, les limitations peuvent être de l'ordre d'un manque de contraste pour différencier les couches cornéennes, distinguer certaines cellules (kératocytes) ou observer le stroma. La résolution spatiale peut aussi faire défaut, où comme dans le cas de la TCO, il y a des limites à utiliser de fortes ouvertures numériques conditionnant la résolution latérale. Dans ces conditions, il est difficile de réaliser une imagerie 3D pour un tissu aussi fin que la cornée. Les microscopies IGSH/IGTH gagnent sur de nombreux tableaux de par leur nature non linéaire.

Dans les chapitres théoriques sur la seconde et troisième harmonique nous avons présenté en particulier comment les signaux étaient conditionnés par la géométrie de faisceau ainsi que celle de l'échantillon. Sur la GTH, plus spécifiquement, nous avons, dans le cadre d'un modèle gaussien, donné l'expression de l'irradiance de la GTH sur une interface nous permettant de dégager, dans cette situation qui se présente autant sur des matériaux qu'en biologie, la résolution spatiale de ce signal. Cette résolution a été validée expérimentalement sur nos échantillons inorganiques et biologiques.

Par ailleurs, une grande partie du travail aura été dévolue à la réalisation du microscope d'IGSH/IGTH. Ce microscope a été pensé pour permettre une utilisation très libre autant en biologie que pour des applications *in vivo*. La mise en œuvre de deux types de balayage permet dans ce contexte particulier de l'imagerie tissulaire de réaliser une microscopie « conventionnelle » *en face* par le balayage optique, mais également, de réaliser des images sur de très grandes distances comme peut en faire la TCO, cette fonction étant difficilement réalisable par la création de piles d'images *en face*. Des améliorations techniques sur le plan de la sensibilité (détection synchrone couplée avec des impulsions excitatrices plus courtes) et des

deux balayages permettraient un gain de commodité pour que ce prototype devienne un instrument ophtalmique de la cornée à part entière.

Enfin, nos résultats ont permis de caractériser l'IGTH sur différents types d'échantillons cornéens :

- nos résultats anatomiques ont permis de montrer que l'IGTH était une méthode non linéaire particulièrement pertinente pour observer la cornée par sa complémentarité avec l'IGSH. En particulier, L'IGTH fait la preuve de son utilité pour révéler les très importantes couches postérieures de la cornée là où, autant les imageries linéaires que la combinaison IGSH/IF2P, laissent une ambiguïté d'identification. Par ailleurs l'IGTH n'est pas strictement associée à une longueur d'excitation comme l'IF2P, ce qui offre des avantages certains sur le plan de la phototoxicité et celui de la profondeur de pénétration. L'IGTH révèle très correctement les cellules mais élargit les observations par rapport à ce que permet l'IF2P à toutes les couches cornéennes ;
- nos résultats dans la cornée reconstruite nous ont permis de conclure que l'IGSH/IGTH offrait une solution complète de caractérisation de ces tissus par rapport à ce qu'offrent les méthodes d'histologie où les protocoles de préparation sont lourds et invasifs ;
- enfin, nos résultats sur des cornées incisées mécaniquement et offrant par conséquent peu de contraste pour l'imagerie en comparaison d'une coupe au laser femtoseconde, nous ont permis, avec un comparatif avec la TCO, de réaliser que l'interface laissée par la coupe était très fine et sans espace aqueux avec notre microscopie de GTH. En revanche l'IGSH n'avait rien révélé sur nos clichés, faisant penser que la coupe mécanique n'ait pas modifié notablement le réseau de collagène stromal (espace interlamellaire ou contraste particulier en IGSH). Cette observation va dans le sens de la littérature scientifique documentant l'interface de coupe. Contrairement à l'IGSH, l'IGTH a montré qu'un contraste le long de la coupe était observable en épi-détection et permettrait donc une observation pour une observation *in vivo*.

Pour continuer une démarche vers une adoption clinique de l'IGSH/IGTH, il serait également intéressant de réaliser des images de plus haute qualité *en face* dans les différentes couches cornéennes et en particulier dans le stroma où des caractérisations par polarimétrie sur les deux phénomènes sont également possibles. Il faudrait également étudier, par rapport à notre imagerie,

quelles sont les particularités de l'œil humain. D'autres études couplant la TCO avec l'IGSH/IGTH seraient également intéressantes pour mesurer les indices de groupe et déduire les indices de réfraction des couches afin de connaître plus particulièrement la nature du signal de GTH (ex. interface stroma/membrane de Descemet).

Cependant nos travaux ont montré qu'aucune raison fondamentale ne s'opposait à ce que l'IGSH/IGTH soit exploitée pour l'observation *in vivo* de la cornée : résolution suffisante pour la distinction des couches et imagerie cellulaire, contraste par la complémentarité des signaux, épi-détection possible des deux signaux sur la pleine épaisseur. Par ailleurs la logique de nos observations a été de faire principalement des coupes transversales car ces perspectives sont souvent importantes en ophtalmologie que ce soit pour réaliser des mesures sur la cornée (pachymétrie), positionner les différentes couches cornéennes, ou en chirurgie réfractive observer la coupe du LASIK. Enfin, le fait que l'IGSH/IGTH soit également du ressort de la technologie femtoseconde laisse présager que cette imagerie s'intégrerait pertinemment à la chirurgie laser femtoseconde.

Ainsi, les signaux de SH et de TH, permettent une imagerie radicalement différente et se joignent au grand arsenal déjà offert en imagerie linéaire. La mise en évidence du réseau de collagène stromal, ou plus spécifiquement à la GTH, l'observation de l'interface entre le stroma et la membrane de Descemet ou celle de la coupe intrastromale lamellaire mécanique, illustrent ce potentiel.





## BIBLIOGRAPHIE

- Akiba M, Maeda N, Yumikake K, Soma T, Nishida K, Tano Y & Chan KP (2007) Ultrahigh-resolution imaging of human donor cornea using full-field optical coherence tomography. *J. Biomed. Opt.* 12(4):0412021-0412027.
- Alfonso EC, Forster RK, Garg P & Sharma S (2005) Fungal Infections. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management*, Krachmer J, Mannis M & Holland E (Édit.) Elsevier Mosby, St. Louis, MO, 2nd Ed. Vol 1. p 405-426.
- Alvarez Ferré L (2009) *Étude comparative de l'anatomie des plaies de greffe de cornée par tomographie de cohérence optique (OCT)*. Thèse de doctorat (Université de Montréal, Montréal). 350 p.
- Ameen DB, Bishop MF & McMullen T (1998) A lattice model for computing the transmissivity of the cornea and sclera. *Biophys. J.* 75(5):2520-2531.
- An Y (2003) *Spectroscopic Studies of Optical Second-Harmonic Generation from Si(001) Surfaces*. PhD Thesis (University of Colorado, Boulder). 143 p.
- Artal P & Tabernero J (2010) Optics of human eye: 400 years of exploration from Galileo's time. *Appl. Opt.* 49(16):D123-D130.
- Asejczyk-Widlicka M, Srodka W, Schachar RA & Pierscionek BK (2011) Material properties of the cornea and sclera: a modelling approach to test experimental analysis. *J. Biomech.* 44(3):543-546.
- Auxenfans C, Fradette J, Lequeux C, Germain L, Kinikoglu B, Bechetoille N, Braye F, Auger FA & Damour O (2009) Evolution of three dimensional skin equivalent models reconstructed in vitro by tissue engineering. *Eur. J. Dermatol.* 19(2):107-113.
- Azar TD, Gatinel D & Hoang-Xuan T (2007) *Refractive Surgery*. Elsevier Mosby, St. Louis, MO, 2nd Ed. 580 p.
- Barad Y, Eisenberg H, Horowitz M & Silberberg Y (1997) Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation. *Appl. Phys. Lett.* 70(8):922-924.
- Bartholomew LR, Pang DX, Sam DA & Cavender JC (1997) Ultrasound biomicroscopy of globes from young adult pigs. *Am. J. Vet. Res.* 58(9):942-948.
- Barzda V, Greenhalgh C, Aus der Au J, Elmore S, van Beek J & Squier J (2005) Visualization of mitochondria in cardiomyocytes by simultaneous harmonic generation and fluorescence microscopy. *Opt. Express* 13(20):8263-8276.

- Baudouin C, Labbe A & Fayol N (2009) Imagerie de la surface oculaire par microscopie confocale et OCT de segment antérieur. *Réflexions*:59-63.
- Bechmann M, Thiel MJ, Neubauer AS, Ullrich S, Ludwig K, Kenyon KR & Ulbig MW (2001) Central corneal thickness measurement with a retinal optical coherence tomography device versus standard ultrasonic pachymetry. *Cornea* 20(1):50-54.
- Beuthan J, Minet O, Helfmann J, Herrig M & Müller G (1996) The spatial variation of the refractive index in biological cells. *Phys. Med. Biol.* 41(3):369-382.
- Birk DE (2001) Type V collagen: Heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron* 32(3):223-237.
- Bjorklund G (1975) Effects of focusing on third-order nonlinear processes in isotropic media. *IEEE J. Quantum Electron.* 11(6):287-296.
- Both M, Vogel M, Friedrich O, von Wegner F, KÄ¼nting T, Fink RHA & Uttenweiler D (2004) Second harmonic imaging of intrinsic signals in muscle fibers in situ. *J. Biomed. Opt.* 9(5):882-892.
- Boulesteix T (2004) *Microscopie non linéaire : chiralité et génération de seconde harmonique*. Thèse de doctorat (Université Paris XI, Orsay). 231 p.
- Bourne WM (2003) Biology of the corneal endothelium in health and disease. *Eye* 17(8):912-918.
- Bourne WM & McLaren JW (2004) Clinical responses of the corneal endothelium. *Exp. Eye Res.* 78(3):561-572.
- Bouvier D (1999) 5 - Polarité moléculaire. [http://www.arpe.snv.jussieu.fr/td\\_2\\_fr/pol.html](http://www.arpe.snv.jussieu.fr/td_2_fr/pol.html) (Consulté le 2012-04-30)
- Boyd RW (2008) *Nonlinear Optics*. Academic Press, Elsevier, Burlington, MA, 3rd Ed. 613 p.
- Braunstein RE, Kleyman L, Assil K & Azar DT (2007) Radial keratotomy: techniques, complications and management. *Refractive Surgery*, Azar TD, Gatinel D & Hoang-Xuan T (Édit.) Elsevier Mosby, St. Louis, MO, 2nd Ed. p 299-324.
- Brocas A, Jay L, Mottay E, Brunette I & Ozaki T (2008) Corneal imaging by second and third harmonic generation microscopy. *Photonics West*. (San Jose, CA, SPIE, Vol 6860. p 1-9.
- Bron AJ (2001) The architecture of the corneal stroma. *Br. J. Ophthalmol.* 85(4):379-381.
- Brun A & Georges P (1996) Sources laser femtosecondes. *Les lasers et leurs applications scientifiques et médicales*, Fabre C & Pocholle JP (Édit.) EDP Sciences, Les Ulis, 2nd Ed. p 287-307.

- Buhrmann R, Hodge W, Beardmore J, Baker G, Lowcock B, Pan I & Bovel A (2007) *Foundations for a canadian vision health strategy*. National Coalition for Vision Health, Toronto. 111 p.
- Calossi A (2007) Corneal asphericity and spherical aberration. *J. Refract. Surg.* 23(5):505-514.
- Campagnola PJ (2008) Second-Harmonic Generation Imaging Microscopy of Structural Protein Arrays in Tissue. *Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy*, Masters BR & So PTC (Édit.) Oxford University Press Inc., New York, NY. p 377-411.
- Campagnola PJ, Clark HA, Mohler WA, Lewis A & Loew LM (2001) Second-harmonic imaging microscopy of living cells. *J. Biomed. Opt.* 6(3):277-286.
- Campagnola PJ & Dong CY (2011) Second harmonic generation microscopy: principles and applications to disease diagnosis. *Laser Photon Rev.* 5(1):13-26.
- Campagnola PJ, Millard AC, Terasaki M, Hoppe PE, Malone CJ & Mohler WA (2002) Three-Dimensional High-Resolution Second-Harmonic Generation Imaging of Endogenous Structural Proteins in Biological Tissues. *Biophys. J.* 82(1):493-508.
- Campagnola PJ, Wei M, Lewis A & Loew LM (1999) High-Resolution Nonlinear Optical Imaging of Live Cells by Second Harmonic Generation. *Biophys. J.* 77(6):3341-3349.
- Cargile JJ (2012) *Immersion oil and the microscope*. <http://www.cargille.com/immersionoilmicroscope.shtml> (Consulté le 2012-04-30)
- Carrasco S, Saleh BEA, Teich MC & Fourkas JT (2006) Second- and third-harmonic generation with vector Gaussian beams. *J. Opt. Soc. Am. B* 23(10):2134-2141.
- Carrier P, Deschambeault A, Audet C, Talbot M, Gauvin R, Giasson CJ, Auger FA, Guerin SL & Germain L (2009) Impact of cell source on human cornea reconstructed by tissue engineering. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50(6):2645-2652.
- Carrier P, Deschambeault A, Talbot M, Giasson CJ, Auger FA, Guerin SL & Germain L (2008) Characterization of wound reepithelialization using a new human tissue-engineered corneal wound healing model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49(4):1376-1385.
- Cavanagh HD, Ladage PM, Petroll WM & Jester JV (2005a) Clinical Specular Microscopy. *Smolin and Thoft's The Cornea : Scientific Foundations and Clinical Practice*, Foster CS, Azar DT & Dohlman CH (Édit.) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 4th Ed. p 199-204.
- Cavanagh HD & Petroll WM (2006) Real-time high spatial resolution in vivo corneal imaging: current successes and future needs. *Photonics West*. (San Jose, CA, 21 January 2006) SPIE, Vol 6138. p 61380C-61381.

- Cavanagh HD, Petroll WM & Jester JV (2005b) Confocal Microscopy. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management*, Krachmer J, Mannis M & Holland E (Édit.) Elsevier Mosby, St. Louis, MO, 2<sup>nd</sup> Ed. Vol 1. p 283-298.
- Chamberlain W, Omid N, Lin A, Farid M, Gaster RN & Steinert RF (2011) Comparison of corneal surface higher-order aberrations after endothelial keratoplasty, femtosecond laser-assisted keratoplasty, and conventional penetrating keratoplasty. *Cornea*:6-13.
- Chang C-F, Chen H-C, Chen M-J, Liu W-R, Hsieh W-F, Hsu C-H, Chen C-Y, Chang F-H, Yu C-H & Sun C-K (2010a) Direct backward third-harmonic generation in nanostructures. *Opt. Express* 18(7):7397-7406.
- Chang Y, Chen C, Chen J, Jin Y & Deng X (2009) Theoretical simulation study of linearly polarized light on microscopic second-harmonic generation in collagen type I. *J. Biomed. Opt.* 14(4):0440161-04401612.
- Chang Y & Deng X (2010b) Characterization of excitation beam on second-harmonic generation in fibrillous type i collagen. *J. Biol. Phys.* 36(4):365-383.
- Cheng JX & Xie XS (2002) Green's function formulation for third-harmonic generation microscopy. *J. Opt. Soc. Am. B* 19(7):1604-1610.
- Cheng YYY, Kang SJ, Grossniklaus HE, Pels E, Duimel HJ, Frederik PM, Hendrikse F & Nuijts RM (2009) Histologic evaluation of human posterior lamellar discs for femtosecond laser Descemet's stripping endothelial keratoplasty. *Cornea* 28(1):73-79.
- Christensen K, Doblhammer G, Rau R & Vaupel JW (2009) Ageing populations: the challenges ahead. *Lancet* 374(9696):1196-1208.
- Chu SW, Chen IH, Liu TM, Chen PC, Sun CK & Lin BL (2001) Multimodal nonlinear spectral microscopy based on a femtosecond Cr:forsterite laser. *Opt. Lett.* 26(23):1909-1911.
- Chu SW, Chen SY, Chern GW, Tsai TH, Chen YC, Lin BL & Sun CK (2004) Studies of  $x(2)/x(3)$  tensors in submicron-scaled bio-tissues by polarization harmonics optical microscopy. *Biophys. J.* 86(6):3914-3922.
- Chu SW, Chen SY, Tsai TH, Liu TM, Lin CY, Tsai HJ & Sun CK (2003) In vivo developmental biology study using noninvasive multi-harmonic generation microscopy. *Opt. Express* 11(23):3093-3099.
- Dapena I, Ham L & Melles GR (2009) Endothelial keratoplasty: DSEK/DSAEK or DMEK--the thinner the better? *Curr. Opin. Ophthalmol.* 20(4):299-307.
- Dapena I, Ham L, Netukova M, van der Wees J & Melles GR (2011) Incidence of early allograft rejection after Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Cornea*:1341-1345.

- de Boer JF, Cense B, Park BH, Pierce MC, Tearney GJ & Bouma BE (2003) Improved signal-to-noise ratio in spectral-domain compared with time-domain optical coherence tomography. *Opt Lett* 28(21):2067-2069.
- Débarre D (2006) *Microscopie par génération de troisième harmonique appliquée à la biologie*. Thèse de doctorat (Ecole Polytechnique, Palaiseau). 244 p.
- Débarre D & Beaurepaire E (2007a) Quantitative characterization of biological liquids for third-harmonic generation microscopy. *Biophys. J.* 92(2):603-612.
- Débarre D, Olivier N & Beaurepaire E (2007b) Signal epidetection in third-harmonic generation microscopy of turbid media. *Opt. Express* 15(14):8913-8924.
- Débarre D, Supatto W & Beaurepaire E (2005) Structure sensitivity in third-harmonic generation microscopy. *Opt. Lett.* 30(16):2134-2136.
- Débarre D, Supatto W, Pena A-M, Fabre A, Tordjmann T, Combettes L, Schanne-Klein M-C & Beaurepaire E (2006) Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy. *Nat. Methods* 3(1):47-53.
- Dogru M & Tsubota K (2005) Sjogren's Syndrome. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management*, Krachmer J, Mannis M & Holland E (Édit.) Elsevier Mosby, St. Louis, MO, 2nd Ed. Vol 1. p 629-646.
- Dombeck DA, Sacconi L, Blanchard-Desce M & Webb WW (2005) Optical recording of fast neuronal membrane potential transients in acute mammalian brain slices by second-harmonic generation microscopy. *J. Neurophysiol.* 94(5):3628-3636.
- Doutch J, Quantock AJ, Smith VA & Meek KM (2008) Light transmission in the human cornea as a function of position across the ocular surface: theoretical and experimental aspects. *Biophys. J.* 95(11):5092-5099.
- Drexler W (2004) Ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *J. Biomed. Opt.* 9(1):47-74.
- Ducasse A (2009) Tumeurs de l'orbite de l'enfant et de l'adulte. *Réflexions*:90-95.
- Edelhauser HF (2000) The resiliency of the corneal endothelium to refractive and intraocular surgery. *Cornea* 19(3):263-273.
- Erie JC, McLaren JW & Patel SV (2009) Confocal Microscopy in Ophthalmology. *Am. J. Ophthalmol.* 148(5):639-646.
- Faber C, Scherfig E, Prause JU & Sorensen K (2008) Corneal thickness in pigs measured by ultrasound pachymetry in vivo. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 35(1):39-43.

- Fabritius T, Makita S, Hong Y, Myllyla R & Yasuno Y (2009) Automated retinal shadow compensation of optical coherence tomography images. *J. Biomed. Opt.* 14(1):0105031-0105033.
- Faktorovich EG (2009) *Femtodynamics: A Guide to Laser Settings and Procedure Techniques to Optimize Outcomes with Femtosecond Lasers*. Slack Inc, Thorofare, NJ. 264 p.
- Farrar MJ, Wise FW, Fetcho JR & Schaffer CB (2011) In vivo imaging of myelin in the vertebrate central nervous system using third harmonic generation microscopy. *Biophys. J.* 100(5):1362-1371.
- Feenstra RP & Tseng SC (1992) Comparison of fluorescein and rose bengal staining. *Ophthalmology* 99(4):605-617.
- Feiz V (2005) Corneal Edema. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management*, Krachmer J, Mannis M & Holland E (Édit.) Elsevier Mosby, St. Louis, MO, 2nd Ed. Vol 1. p 359-364.
- Ferrando M & Spiess WEL (2000) Review: confocal scanning laser microscopy. A powerful tool in food science revision. *Food Sci. Technol. Int.* 6(4):267-284.
- Feuk T & McQueen D (1971) The angular dependence of light scattered from rabbit corneas. *Invest. Ophthalmol.* 10(4):294-299.
- Fine BS & Yanoff M (1979) *Ocular histology: a text and atlas*. Medical Dept., Harper & Row, Hagerstown, MD, 2nd Ed. 359 p.
- Fine S (1965) *Federation Proc.* 24, Suppl.(14):S47.
- Fine S & Hansen WP (1971) Optical Second Harmonic Generation in Biological Systems. *Appl. Opt.* 10(10):2350-2353.
- Fischbarg J, Hernandez J, Liebovitch LS & Koniarek JP (1985) The mechanism of fluid and electrolyte transport across corneal endothelium: critical revision and update of a model. *Curr. Eye Res.* 4(4):351-360.
- Foster CS, Azar DT & Dohlman CH (2005) *Smolin and Thoft's The Cornea : Scientific Foundations and Clinical Practice*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 4th Ed. 1323 p.
- Franken PA, Hill AE, Peters CW & Weinreich G (1961) Generation of optical harmonics. *Phys. Rev. Lett.* 7(4):118-119.
- Freegard TJ (1997) The physical basis of transparency of the normal cornea. *Eye* 11(4):465-471.
- Freund DE, McCally RL & Farrell RA (1986a) Effects of fibril orientations on light scattering in the cornea. *J. Opt. Soc. Am. A* 3(11):1970-1982.

- Freund I & Deutsch M (1986b) Second-harmonic microscopy of biological tissue. *Opt. Lett.* 11:94-96.
- Fu Y, Wang H, Shi R & Cheng J-X (2007) Second Harmonic and Sum Frequency Generation Imaging of Fibrous Astroglial Filaments in Ex Vivo Spinal Tissues. *Biophys. J.* 92(9):3251-3259.
- Fujimoto JG, Chen Y & Aguirre A (2009) Biomedical Imaging Using Optical Coherence Tomography. *Biomedical Optical Imaging*, Fujimoto JG & Farkas DL (Édit.) Oxford University Press, New York, NY. p 161-195.
- Furelaud G & Bonnet G (2004) *La structure de l'oeil.* <http://www.snv.jussieu.fr/vie/documents/oeil/index.htm> (Consulté le 2012-04-30)
- Gannaway JN & Sheppard CJR (1978) Second-harmonic imaging in the scanning optical microscope. *Opt. Quantum Electron.* 10(5):435-439.
- Gauderon R, Lukins PB & Sheppard CJR (1998) Three-dimensional second-harmonic generation imaging with femtosecond laser pulses. *Opt. Lett.* 23:1209-1211.
- Gauderon R, Lukins PB & Sheppard CJR (2001) Optimization of second-harmonic generation microscopy. *Micron* 32(7):691-700.
- Gauvin R, Ahsan T, Larouche D, Levesque P, Dube J, Auger FA, Nerem RM & Germain L (2010) A novel single-step self-assembly approach for the fabrication of tissue-engineered vascular constructs. *Tissue Eng., Part A* 16(5):1737-1747.
- Giguère D, Olivie G, Vidal F, Toetsch S, Girard G, Ozaki T, Kieffer JC, Nada O & Brunette I (2007) Laser ablation threshold dependence on pulse duration for fused silica and corneal tissues: experiments and modeling. *J. Opt. Soc. Am. A Opt. Image Sci. Vis.* 24(6):1562-1568.
- Girard MJA, Strouthidis NG, Ethier CR & Mari JM (2011) Shadow Removal and Contrast Enhancement in Optical Coherence Tomography Images of the Human Optic Nerve Head. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52(10):7738-7748.
- Gotzinger E, Pircher M, Sticker M, Fercher AF & Hitzenberger CK (2004) Measurement and imaging of birefringent properties of the human cornea with phase-resolved, polarization-sensitive optical coherence tomography. *J. Biomed. Opt.* 9(1):94-102.
- Gourley PL (2003) Biocavity laser for high-speed cell and tumour biology. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36(14):R228-R239.
- Grupcheva CN, Craig JP, Sherwin T & McGhee CN (2001) Differential diagnosis of corneal oedema assisted by in vivo confocal microscopy. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 29(3):133-137.

- Guell JL (2005) Are intracorneal rings still useful in refractive surgery? *Curr. Opin. Ophthalmol.* 16(4):260-265.
- Guillemette MD, Cui B, Roy E, Gauvin R, Giasson CJ, Esch MB, Carrier P, Deschambeault A, Dumoulin M, Toner M, Germain L, Veres T & Auger FA (2009) Surface topography induces 3D self-orientation of cells and extracellular matrix resulting in improved tissue function. *Integr. Biol.* 1(2):196-204.
- Gusachenko I, Latour G & Schanne-Klein MC (2010) Polarization-resolved Second Harmonic microscopy in anisotropic thick tissues. *Opt. Express* 18(18):19339-19352.
- Hamill MB & Kohnen T (2002) Scanning electron microscopic evaluation of the surface characteristics of 4 microkeratome systems in human corneas. *J. Cataract Refract. Surg.* 28(2):328-336.
- Hamilton DR, Johnson RD, Nancy L & Nirit B (2008) Differences in the corneal biomechanical effects of surface ablation compared with laser in situ keratomileusis using a microkeratome or femtosecond laser. *J. Cataract Refract. Surg.* 34(12):2049-2056.
- Han M, Giese G & Bille J (2005) Second harmonic generation imaging of collagen fibrils in cornea and sclera. *Opt. Express* 13(15):5791-5797.
- Han M, Giese G, Zickler L, Sun H & Bille JF (2004a) Mini-invasive corneal surgery and imaging with femtosecond lasers. *Opt. Express* 12(18):4275-4281.
- Han M, Zickler L, Giese G, Walter M, Loesel F & Bille J (2004b) Second-harmonic imaging of cornea after intrastromal femtosecond laser ablation. *J. Biomed. Opt.* 9(4):760-766.
- Hanna KD, Jouve FE & Waring GO, III (1989) Preliminary computer simulation of the effects of radial keratotomy. *Arch. Ophthalmol.* 107(6):911-918.
- Hayashi S, Osawa T & Tohyama K (2002) Comparative observations on corneas, with special reference to Bowman's layer and Descemet's membrane in mammals and amphibians. *J. Morphol.* 254(3):247-258.
- He J, Bazan NG & Bazan HE (2010) Mapping the entire human corneal nerve architecture. *Exp. Eye Res.* 91(4):513-523.
- Hellwarth R & Christensen P (1975) Nonlinear optical microscope using second harmonic generation. *Appl. Opt.* 14(2):247-248.
- Herrmann WA, Hillenkamp J, Hufendiek K, Prahs P, Lohmann CP, Helbig H & Kobuch K (2008) Epi-laser in situ keratomileusis: comparative evaluation of epithelial separation with 3 microkeratomes. *J. Cataract Refract. Surg.* 34(10):1761-1766.
- Hillenaar T, Cals RH, Eilers PH, Wubbels RJ, van Cleynenbreugel H & Remeijer L (2011) Normative database for corneal backscatter analysis by in vivo confocal microscopy. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 52(10):7274-7281.



- Hirst LW & Vandeleur KW, Jr. (1998) Laser in situ keratomileusis interface deposits. *J. Refract. Surg.* 14(6):653-654.
- Hormière J (2010) *Instruments d'optique ophtalmique*. Lavoisier. Tec & Doc, Paris. 478 p.
- Hovhannisyanyan V, Lo W, Hu C, Chen SJ & Dong CY (2008) Dynamics of femtosecond laser photo-modification of collagen fibers. *Opt. Express* 16(11):7958-7968.
- Hsieh C-S, Chen S-U, Lee Y-W, Yang Y-S & Sun C-K (2008) Higher harmonic generation microscopy of in vitro cultured mammal oocytes and embryos. *Opt. Express* 16(15):11574-11588.
- Huang S, Heikal AA & Webb WW (2002) Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein. *Biophys. J.* 82(5):2811-2825.
- Itoh K, Watanabe W & Ozeki Y (2009) Nonlinear ultrafast focal-point optics for microscopic imaging, manipulation, and machining. *Proceedings of the IEEE* 97(6):1011-1030.
- Ivarsen A, Laurberg T & Moller-Pedersen T (2003) Characterisation of corneal fibrotic wound repair at the LASIK flap margin. *Br. J. Ophthalmol.* 87(10):1272-1278.
- Ivarsen A, Thogersen J, Keiding SR, Hjortdal JO & Moller-Pedersen T (2004) Plastic particles at the LASIK interface. *Ophthalmology* 111(1):18-23.
- Jackson WB & Al-Muammar A (2005) Photorefractive Keratectomy. *Cornea: Surgery of the Cornea and Conjunctiva*, Krachmer J, Mannis M & Holland E (Édit.) Elsevier Mosby, St. Louis, MO, 2nd Ed. Vol 2. p 1923-1939.
- Jay L, Brocas A, Singh K, Kieffer JC, Brunette I & Ozaki T (2008) Determination of porcine corneal layers with high spatial resolution by simultaneous second and third harmonic generation microscopy. *Opt. Express* 16(21):16284.
- Jay L, Dion C, Brocas A, Singh K, Kieffer JC, Brunette I & Ozaki T (2010) High-resolution imaging of a corneal incision by second- and third-harmonic generation microscopy. *Photonics West*. (San Jose, CA, SPIE, Vol 7569. p 1-7.
- Jester JV (2007a) Corneal wound healing following refractive surgery. *Refractive Surgery*, Azar TD, Gatinel D & Hoang-Xuan T (Édit.) Elsevier Mosby, St. Louis, MO, 2nd Ed. p 19-32.
- Jester JV (2007b) Refractive surgery revealed through in vivo confocal microscopy. *Refractive Surgery*, Azar TD, Gatinel D & Hoang-Xuan T (Édit.) Elsevier Mosby, St. Louis, MO, 2nd Ed. p 33-52.
- Johnson DH, Bourne WM & Campbell RJ (1982) The ultrastructure of Descemet's membrane: I. Changes with age in normal corneas. *Arch. Ophthalmol.* 100(12):1942-1947.

- Juhasz T, Kastis GA, Suarez C, Bor Z & Bron WE (1996) Time-resolved observations of shock waves and cavitation bubbles generated by femtosecond laser pulses in corneal tissue and water. *Lasers Surg. Med.* 19(1):23-31.
- Juhasz T, Kurtz R, Horvath C, Suarez C, Nordan LT & Slade SG (2002) Femtosecond laser eye surgery: The first clinical experience. *Photonics West*. (San Jose, CA, SPIE, Vol 4633. p 1-10.
- Jurkunas U & Colby K (2005) Evaluation of the Corneal Endothelium. *Techniques in Ophthalmology* 3(1):19-26.
- Keuch RJ & Bleckmann H (1999) Comparison of 3 microkeratomes used for keratomileusis in situ in a swine model. *J. Cataract Refract. Surg.* 25(1):24-31.
- Kim E, Elovikov S & Aktsipetrov O (2003) Hyper-Rayleigh light scattering in the third harmonic generation in silver island films. *JETP Lett.* 77(4):158-161.
- Kitzmann AS, Bourne WM & Patel SV (2007) Confocal Microscopy of a Femtosecond Laser LASIK Flap Before Separation. *Am. J. Ophthalmol.* 143(4):691-693.
- Klintworth GK (2009) Corneal dystrophies. *Orphanet J. Rare Dis.* 4(1).
- Klyce SD (2005) Corneal Physiology. *Smolin and Thoft's The Cornea : Scientific Foundations and Clinical Practice*, Foster CS, Azar DT & Dohlman CH (Édit.) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 4th Ed. p 37-58.
- Knoesen A (2009) Second order optical nonlinearity in single and triple helical protein supramolecular assemblies. *Nonlinear Opt., Quantum Opt.* 38(3-4):213-225.
- Koester CJ (1980) Scanning mirror microscope with optical sectioning characteristics: applications in ophthalmology. *Appl. Opt.* 19(11):1749-1757.
- Kolk A, Pautke C, Wiener E, Ploder O & Neff A (2005) A novel high-resolution magnetic resonance imaging microscopy coil as an alternative to the multislice computed tomography in postoperative imaging of orbital fractures and computer-based volume measurement. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 63(4):492-498.
- Komai Y & Ushiki T (1991) The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 32(8):2244-2258.
- Konig K (2008) Multiphoton-Induced Cell Damage. *Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy*, Masters BR & So PTC (Édit.) Oxford University Press Inc., New York, NY. p 334-347.
- Konig K, Wang B, Krauss O, Riemann I, Schubert H, Kirste S & Fischer P (2004) First in vivo animal studies on intraocular nanosurgery and multiphoton tomography with low-energy 80-MHz near-infrared femtosecond laser pulses. *Photonics West*. (San Jose, CA, 24 January 2004) SPIE, Vol 5314. p 262.

- Konstantopoulos A, Hossain P & Anderson DF (2007) Recent advances in ophthalmic anterior segment imaging: a new era for ophthalmic diagnosis? *Br. J. Ophthalmol.* 91(4):551-557.
- Krachmer J, Mannis M & Holland E (2005) *Cornea: Surgery of the Cornea and Conjunctiva (Vol. 2)*. Elsevier Mosby, St. Louis, MO, 2nd Ed. Vol 2. 2151 p.
- Lacomb R, Nadiarnykh O, Townsend SS & Campagnola PJ (2008) Phase Matching considerations in Second Harmonic Generation from tissues: Effects on emission directionality, conversion efficiency and observed morphology. *Opt. Commun.* 281(7):1823-1832.
- Laliberte JF, Meunier J, Chagnon M, Kieffer JC & Brunette I (2007) Construction of a 3-D atlas of corneal shape. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 48(3):1072-1078.
- Larouche D, Paquet C, Fradette J, Carrier P, Auger FA & Germain L (2009) Regeneration of skin and cornea by tissue engineering. *Methods Mol. Biol.* 482:233-256.
- Le Grand Y (1964) *Optique physiologique: La Dioptrique de l'oeil et sa correction (Vol. 1)*. Éditions de la Revue d'optique, Paris, 3ème Ed. Vol 1. 412 p.
- Le TT, Yue S & Cheng J-X (2010) Shedding new light on lipid biology with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *J. Lipid Res.* 51(11):3091-3102.
- Leblanc B (3.7 *Le collagène, protéine très modifiée*. <http://pages.usherbrooke.ca/bcm-514-bl/3f.html> (Consulté le 2012-04-30)
- LeCours SM, Guan H-W, DiMugno SG, Wang CH & Therien MJ (1996) Push–Pull Arylethynyl Porphyrins: New Chromophores That Exhibit Large Molecular First-Order Hyperpolarizabilities. *J. Am. Chem. Soc.* 118(6):1497-1503.
- Légaré F, Pfeffer C & Olsen BR (2007) The Role of Backscattering in SHG Tissue Imaging. *Biophys. J.* 93(4):1312-1320.
- Lin RC, Shure MA, Rollins AM, Izatt JA & Huang D (2004) Group index of the human cornea at 1.3- $\mu\text{m}$  wavelength obtained in vitro by optical coherence domain reflectometry. *Opt. Lett.* 29(1):83-85.
- Loiko VA, Ruban GI, Gritsai OA, Berdnik VV & Goncharova NV (2007) Mononuclear cells morphology for cells discrimination by the angular structure of scattered light. *Tenth International Conference on Light Scattering by Non-spherical Particles*. (Bodrum, 22 June 2007). p 105-108.
- Lubatschowski H, Maatz G, Heisterkamp A, Hetzel U, Drommer W, Welling H & Ertmer W (2000) Application of ultrashort laser pulses for intrastromal refractive surgery. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 238(1):33-39.
- Lukosz W (1966) Optical Systems with Resolving Powers Exceeding the Classical Limit. *J. Opt. Soc. Am. A Opt. Image Sci. Vis.* 56(11):1463-1471.

- Lyubovitsky JG, Spencer JA, Krasieva TB, Andersen B & Tromberg BJ (2006) Imaging corneal pathology in a transgenic mouse model using nonlinear microscopy. *J. Biomed. Opt.* 11(1):0140131-0140136.
- Marimbert J (2005) *Recommandations concernant la fluorescéine injectable.* <http://www.ansm.sante.fr/Infos-de-securite/Lettres-aux-professionnels-de-sante/Recommandations-concernant-la-fluoresceine-injectable/%28language%29/fre-FR> (Consulté le 2012-04-30)
- Martonyi CL (2005) Slit Lamp Examination and Photography. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management*, Krachmer J, Mannis M & Holland E (Édit.) Elsevier Mosby, St. Louis, MO, 2nd Ed. Vol 1. p 191-224.
- Masters BR (1998) Three-dimensional confocal microscopy of the living in situ rabbit cornea. *Opt. Express* 3(9):351-355.
- Masters BR (2009) Correlation of histology and linear and nonlinear microscopy of the living human cornea. *J. Biophotonics* 2(3):127-139.
- Masters BR & So PTC (2008) The Genesis of Nonlinear Microscopies and Their Impact on Modern Developments. *Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy*, Masters BR & So PTC (Édit.) Oxford University Press Inc., New York, NY. p 5-29.
- McConnell G (2007) Nonlinear optical microscopy at wavelengths exceeding 1.4  $\mu$  m using a synchronously pumped femtosecond-pulsed optical parametric oscillator. *Phys. Med. Biol.* 52(3):717-724.
- McLaren JW, Nau CB, Erie JC & Bourne WM (2004) Corneal thickness measurement by confocal microscopy, ultrasound, and scanning slit methods. *Am. J. Ophthalmol.* 137(6):1011-1020.
- Meek KM & Boote C (2009) The use of X-ray scattering techniques to quantify the orientation and distribution of collagen in the corneal stroma. *Prog. Retinal Eye Res.* 28(5):369-392.
- Meek KM, Dennis S & Khan S (2003a) Changes in the Refractive Index of the Stroma and Its Extrafibrillar Matrix When the Cornea Swells. *Biophys. J.* 85(4):2205-2212.
- Meek KM & Fullwood NJ (2001a) Corneal and scleral collagens - A microscopist's perspective. *Micron* 32(3):261-272.
- Meek KM, Leonard DW, Cannon CJ, Dennis S & Khan S (2003b) Transparency, swelling and scarring in the corneal stroma. *Eye* 17(8):927-936.
- Meek KM & Quantock AJ (2001b) The Use of X-ray Scattering Techniques to Determine Corneal Ultrastructure. *Prog. Retinal Eye Res.* 20(1):95-137.

- Merindano MD, Costa J, Canals M, Potau JM & Ruano D (2002) A comparative study of Bowman's layer in some mammals: Relationships with other constituent corneal structures. *European Journal of Anatomy* 6(3):133-140.
- Mertz J (1998) Molecular photodynamics involved in multi-photon excitation fluorescence microscopy. *Eur. Phys. J. B* 3(1):53-66.
- Mertz J (2008) Applications of Second-Harmonic Generation Microscopy. *Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy*, Masters BR & So PTC (Édit.) Oxford University Press Inc., New York, NY. p 348-376.
- Mertz J & Moreaux L (2001) Second-harmonic generation by focused excitation of inhomogeneously distributed scatterers. *Opt. Commun.* 196(1):325-330.
- Millard AC, Wiseman PW, Fittinghoff DN, Wilson KR, Squier JA & Müller M (1999) Third-Harmonic Generation microscopy by use of a compact, femtosecond fiber laser source. *Appl. Opt.* 38(36):7393-7397.
- Millodot M (2008) *Dictionary of optometry and visual science*. Butterworth-Heinemann, New York, NY, 7th Ed. 409 p.
- Miyata K (2010) Pure  $\chi(3)$  Third-Harmonic Generation in Noncentrosymmetric Media. *Advances in Lasers and Electro Optics*, Costa N & Cartaxo A (Édit.) InTech, Rijeka. p 838-851.
- Moller-Pedersen T, Cavanagh HD, Petroll WM & Jester JV (2000) Stromal wound healing explains refractive instability and haze development after photorefractive keratectomy: A 1-year confocal microscopic study. *Ophthalmology* 107(7):1235-1245.
- Moreaux L, Sandre O, Blanchard-Desce M & Mertz J (2000a) Membrane imaging by simultaneous second-harmonic generation and two-photon microscopy. *Opt. Lett.* 25(5):320-322.
- Moreaux L, Sandre O & Mertz J (2000b) Membrane imaging by second-harmonic generation microscopy. *J. Opt. Soc. Am. B* 17(10):1685-1694.
- Morishige N, Kesler-Diaz A, Wahlert AJ, Kurtz RM, Juhasz T, Sarayba M & Jester JV (2008) Corneal response to femtosecond laser photodisruption in the rabbit. *Exp. Eye Res.* 86(5):835-843.
- Morishige N, Nishida T & Jester JV (2009) Second Harmonic Generation for Visualizing 3-Dimensional Structure of Corneal Collagen Lamellae. *Cornea* 28(11):S46-S53.
- Morishige N, Petroll WM, Nishida T, Kenney MC & Jester JV (2006) Noninvasive corneal stromal collagen imaging using two-photon-generated second-harmonic signals. *J. Cataract Refract. Surg.* 32(11):1784-1791.

- Morishige N, Wahlert AJ, Kenney MC, Brown DJ, Kawamoto K, Chikama T-i, Nishida T & Jester JV (2007) Second-Harmonic Imaging Microscopy of Normal Human and Keratoconus Cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48(3):1087-1094.
- Mouriaux F, Sardyga F, Costo S, Lehoang P & Agostini D (2010) Usefulness of gallium scintigraphy patterns in a case of idiopathic retinal vasculitis, aneurysms and neuroretinitis. *Acta Ophthalmol.* 88(2):e38-e39.
- Muller LJ, Pels E & Vrensen GFJM (2001) The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *Br. J. Ophthalmol.* 85(4):437-443.
- Muller M, Squier J, Wilson KR & Brakenhoff GJ (1998) 3D microscopy of transparent objects using third-harmonic generation. *J. Microsc.* 191(3):266-274.
- Murphy DB (2001) *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. John Wiley and Sons, New York, NY, 1st Ed. 388 p.
- Murzina TV, Kolmychek IA, Maidykovski AI, Nikulin AA, Sychev FY & Aktsipetrov OA (2008) Second- and third-harmonic generation and hyper-Rayleigh scattering in porous-silicon-based photonic microcavities. *Opt. Lett.* 33(22):2581-2583.
- Nishida T (2005) Cornea. *Cornea : Fundamentals, Diagnosis and Management*, Krachmer J, Mannis M & Holland E (Édit.) Elsevier Mosby, St. Louis, MO, 2nd Ed. Vol 1. p 3-26.
- Ntziachristos V (2010) Going deeper than microscopy: the optical imaging frontier in biology. *Nat. Methods* 7(8):603-614.
- Odin C, Le Grand Y, Renault A, Gailhouste L & Baffet G (2008) Orientation fields of nonlinear biological fibrils by second harmonic generation microscopy. *J. Microsc.* 229(1):32-38.
- Olivier N & Beaupaire E (2008) Third-harmonic generation microscopy with focus-engineered beams: a numerical study. *Opt. Express* 16(19):14703-14715.
- Oron D, Tal E & Silberberg Y (2003) Depth-resolved multiphoton polarization microscopy by third-harmonic generation. *Opt. Lett.* 28(23):2315-2317.
- Pallikaris IG & Kymionis GD (2005) LASIK Techniques and Outcomes. *Smolin and Thoft's The Cornea : Scientific Foundations and Clinical Practice*, Foster CS, Azar DT & Dohlman CH (Édit.) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 4th Ed. p 1217-1228.
- Park CK & Kim JH (1999) Comparison of wound healing after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis in rabbits. *J. Cataract Refract. Surg.* 25(6):842-850.
- Patel S (1987) Refractive index of the mammalian cornea and its influence during pachometry. *Ophthalmic Physiol. Opt.* 7(4):503-506.
- Patel S, Marshall J & Fitzke FW, III. (1995) Refractive index of the human corneal epithelium and stroma. *J. Refract. Surg.* 11(2):100-105.

- Patel SV, Maguire LJ, McLaren JW, O. Hodge DO & Bourne WM (2007a) Femtosecond Laser versus Mechanical Microkeratome for LASIK: A Randomized Controlled Study. *Ophthalmology* 114(8):1482-1490.
- Patel SV, Winter EJ, McLaren JW & Bourne WM (2007b) Objective Measurement of Backscattered Light from the Anterior and Posterior Cornea In Vivo. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 48(1):166-172.
- Pena AM (2006) *Génération de seconde harmonique par le collagène et application à l' étude de fibres par microscopie multiphoton*. Thèse de doctorat (Ecole Polytechnique, Palaiseau). 149 p.
- Pena AM, Fabre A, Débarre D, Marchal-Somme J, Crestani B, Martin JL, Beaurepaire E & Schanne-Klein MC (2007) Three-dimensional investigation and scoring of extracellular matrix remodeling during lung fibrosis using multiphoton microscopy. *Microsc. Res. Tech.* 70(2):162-170.
- Perret opticiens (2010) *Anatomie (2) les couches anatomiques de l'oeil*. [http://www.perret-optic.ch/optometrie/anatomie\\_oeil/opto\\_anato\\_oeil\\_2\\_f.htm](http://www.perret-optic.ch/optometrie/anatomie_oeil/opto_anato_oeil_2_f.htm) (Consulté le 2012-04-30)
- Phillips C, Laing R & Yee R (2005) Specular Microscopy. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management*, Krachmer J, Mannis M & Holland E (Édit.) Elsevier Mosby, St. Louis, MO, 2<sup>nd</sup> Ed. Vol 1. p 261-282.
- Plamann K, Aptel F, Arnold CL, Courjaud A, Crotti C, Deloison F, Druon F, Georges P, Hanna M, Legeais JM, Morin F, Mottay É, Nuzzo V, Peyrot DA & Savoldelli M (2010) Ultrashort pulse laser surgery of the cornea and the sclera. *J Opt.* 12(8):1-31.
- Platt BC & Shack R (2001) History and principles of Shack-Hartmann wavefront sensing. *J. Refract. Surg.* 17(5):S573-S577.
- Plotnikov SV, Millard AC, Campagnola PJ & Mohler WA (2006) Characterization of the Myosin-Based Source for Second-Harmonic Generation from Muscle Sarcomeres. *Biophys. J.* 90(2):693-703.
- Polack FM (1974) The posterior corneal surface in Fuchs' dystrophy. Scanning electron microscope study. *Invest. Ophthalmol.* 13(12):913-922.
- Polyanskiy M (2012) *Refractive index database*. <http://refractiveindex.info/?group=GASES&material=Air> (Consulté le 2012-04-30)
- Pons T, Moreaux L, Mongin O, Blanchard-Desce M & Mertz J (2003) Mechanisms of membrane potential sensing with second-harmonic generation microscopy. *J. Biomed. Opt.* 8(3):428-431.
- Prahl S (2012) *Mie scattering calculator*. [http://omlc.ogi.edu/calc/mie\\_calc.html](http://omlc.ogi.edu/calc/mie_calc.html) (Consulté le 2012-04-30)

- Probst LE & Doane J (2010) *Chapter 11 : Laser In Situ Keratomileusis*. [http://www.aceproindia.com/ACE%20Sample%20Projects/ePDF\\_ePUB/Probst\\_Refractive%20Surgery-A%20Color%20Synopsis/OEBPS/chapter011.html](http://www.aceproindia.com/ACE%20Sample%20Projects/ePDF_ePUB/Probst_Refractive%20Surgery-A%20Color%20Synopsis/OEBPS/chapter011.html) (Consulté le 2012-04-30)
- Proulx S, Bensaoula T, Nada O, Audet C, d'Arc Uwamaliya J, Devaux A, Allaire G, Germain L & Brunette I (2009) Transplantation of a tissue-engineered corneal endothelium reconstructed on a devitalized carrier in the feline model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50(6):2686-2694.
- Proulx S & Brunette I (2012) Methods being developed for preparation, delivery and transplantation of a tissue-engineered corneal endothelium. *Exp. Eye Res.* 95(1):68-75.
- Proulx S, Uwamaliya JD, Carrier P, Deschambeault A, Audet C, Giasson CJ, Guérin SL, Auger FA & Germain L (2010) Reconstruction of a human cornea by the self-assembly approach of tissue engineering using the three native cell types. *Mol. Vision* 16:2192-2201.
- Psilodimitrakopoulos S, Artigas D, Soria G, Amat-Roldan I, Torre I, Gratacos E, Planas AM & Loza-Alvarez P (2009) Contrast enhancement in second harmonic imaging: Discriminating between muscle and collagen. *European Conferences on Biomedical Optics (ECBO)*. (Munich, SPIE, Vol 7367. p 73670S-73671.
- Qi B, Phillip Himmer A, Maggie Gordon L, Victor Yang XD, David Dickensheets L & Alex Vitkin I (2004) Dynamic focus control in high-speed optical coherence tomography based on a microelectromechanical mirror. *Opt. Commun.* 232(1-6):123-128.
- Rehberg M, Krombach F, Pohl U & Dietzel S (2011) Label-Free 3D Visualization of Cellular and Tissue Structures in Intact Muscle with Second and Third Harmonic Generation Microscopy. *PLoS ONE* 6(11):e28237.
- Reiser KM, Bratton C, Yankelevich DR, Knoesen A, Rocha-Mendoza I & Lotz J (2007) Quantitative analysis of structural disorder in intervertebral disks using second harmonic generation imaging: Comparison with morphometric analysis. *J. Biomed. Opt.* 12(6):0640191-06401917.
- Revillod G (2006) *Diffusion hyper Rayleigh des assemblages moléculaires*. Thèse de doctorat (Université Claude Bernard - Lyon 1, Lyon). 158 p.
- Ricard-Blum S & Ruggiero F (2005) The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol. Biol.* 53(7):430-442.
- Roth S & Freund I (1979) Second harmonic generation in collagen. *J. Chem. Phys.* 70(4):1637-1643.
- Roth S & Freund I (1981) Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon. *Biopolymers* 20(6):1271-1290.



- Rouiller C, Danon D & Ryter A (1954) Application of the electron microscope to the study of the cornea. *Acta Anat. (Basel)* 20(1):39-52.
- Rowiak (2009) *Rowiak TissueSurgeon*. [http://issuu.com/cellogics/docs/brochure\\_tissuesurgeon](http://issuu.com/cellogics/docs/brochure_tissuesurgeon) (Consulté le 2012-04-30)
- Rumelt S, Cohen I, Skandarani P, Delarea Y, Ben Shaul Y & Rehany U (2001) Ultrastructure of the lamellar corneal wound after laser in situ keratomileusis in human eye. *J. Cataract Refract. Surg.* 27(8):1323-1327.
- Saar BG, Freudiger CW, Reichman J, Stanley CM, Holtom GR & Xie XS (2010) Video-rate molecular imaging in vivo with stimulated Raman scattering. *Science* 330(6009):1368-1370.
- Sanchez F (1999) *optique non linéaire: cours et problèmes résolus* ellipses universités, Paris. 256 p.
- Sanchez I, Martin R, Ussa F & Fernandez-Bueno I (2011) The parameters of the porcine eyeball. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 249(4):475-482.
- Sarayba MA, Ignacio TS, Binder PS & Tran DB (2007) Comparative study of stromal bed quality by using mechanical, IntraLase femtosecond laser 15- and 30-kHz microkeratomes. *Cornea* 26(4):446-451.
- Schwiegerling J (2004) *Field Guide To Visual And Ophthalmic Optics*. SPIE Press, Bellingham, WA. 109 p.
- Shen YR (1989) Surface properties probed by second-harmonic and sum-frequency generation. *Nature* 337(6207):519-525.
- Shiuey Y (1998) *Cornea/refractive surgery quiz 21*. [http://www.djo.harvard.edu/site.php?url=/physicians/kr/451&page=KR\\_AN](http://www.djo.harvard.edu/site.php?url=/physicians/kr/451&page=KR_AN) (Consulté le 2012-04-30)
- Shousha MA, Perez VL, Wang J, Ide T, Jiao S, Chen Q, Chang V, Buchser N, Dubovy SR, Feuer W & Yoo SH (2010) Use of Ultra-High-Resolution Optical Coherence Tomography to Detect in Vivo Characteristics of Descemet's Membrane in Fuchs' Dystrophy. *Ophthalmology* 117(6):1220-1227.
- Sonigo B, Iordanidou V, Chong-Sit D, Auclin F, Ancel JM, Labbe A & Baudouin C (2006) In vivo corneal confocal microscopy comparison of intralase femtosecond laser and mechanical microkeratome for laser in situ keratomileusis. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 47(7):2803-2811.
- Squier J, Muller M, Brakenhoff G & Wilson KR (1998) Third harmonic generation microscopy. *Opt. Express* 3(9):315-324.

- Squirrell JM, Wokosin DL, White JG & Bavister BD (1999) Long-term two-photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability. *Nat. Biotechnol.* 17(8):763-767.
- Steven P, Koop N & Huttmann G (2008) Confocal microscopy vs. Two-photon microscopy - Imaging of ocular surface pathologies. *Photonics West.* (San Jose, CA, SPIE, Vol 6860. p 686023-686021.
- Stoller P, Kim BM, Rubenchik AM, Reiser KM & Da Silva LB (2002a) Polarization-dependent optical second-harmonic imaging of a rat-tail tendon. *J. Biomed. Opt.* 7:205-214.
- Stoller P, Reiser KM, Celliers PM & Rubenchik AM (2002b) Polarization-Modulated Second Harmonic Generation in Collagen. *Biophys. J.* 82(6):3330-3342.
- Su PJ, Chen WL, Li TH, Chou CK, Chen TH, Ho YY, Huang CH, Chang SJ, Huang YY, Lee HS & Dong CY (2010) The discrimination of type I and type II collagen and the label-free imaging of engineered cartilage tissue. *Biomaterials* 31(36):9415-9421.
- Sudmeyer T, Imai Y, Masuda H, Eguchi N, Saito M & Kubota S (2008) Efficient 2nd and 4th harmonic generation of a single-frequency, continuous-wave fiber amplifier. *Opt. Express* 16(3):1546-1551.
- Sun C-K, Chen C-C, Chu S-W, Tsai T-H, Chen Y-C & Lin B-L (2003) Multiharmonic-generation biopsy of skin. *Opt. Lett.* 28(24):2488-2490.
- Sun C-K, Chu S-W, Chen S-Y, Tsai T-H, Liu T-M, Lin C-Y & Tsai H-J (2004) Higher harmonic generation microscopy for developmental biology. *J. Struct. Biol.* 147(1):19-30.
- Sun C-K, Chu S-W, Tai S-P, Chan M-C, Hsiao I-C, Lin C-H, Chen Y-C & Lin B-L (2005) Origins of backward second-harmonic-generation emission in a biological sample examined by laser scanning microscopes. *Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO)*. (San Jose, CA. p 1524-1526.
- Sun C-K, Yu C-H, Tai S-P, Kung C-T, Wang IJ, Yu H-C, Huang H-J, Lee W-J & Chan Y-F (2007) In vivo and ex vivo imaging of intra-tissue elastic fibers using third-harmonic-generation microscopy. *Opt. Express* 15(18):11167-11177.
- Svaldenienė E, Babrauskienė V & Paunksnienė M (2003) Structural features of the cornea: light and electron microscopy. *Veterinarija ir Zootechnika* (24):50-55.
- Swanson E, Hee M, Tearney G, Boumar B, Boppart S, Izatt J, Fujimoto J, Brezinski M, Schuman J & Puliavito C (1996) Optical Coherence Tomography: Principles, Instrumentation, and Biological Applications. *Biomedical Optical Instrumentation and Laser-Assisted Biotechnology*, Scheggi AMV (Édit.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Vol 325. p 291-304.

- Tai SP, Tsai TH, Lee WJ, Shieh DB, Liao YH, Huang HY, Zhang K, Liu HL & Sun CK (2005) Optical biopsy of fixed human skin with backward-collected optical harmonics signals. *Opt. Express* 13(20):8231-8242.
- Tang S, Krasieva TB, Chen Z, Tempea G & Tromberg BJ (2006) Increasing efficiency of two-photon excited fluorescence and second harmonic generation using ultrashort pulses. *Photonics West*. (San Jose, CA, SPIE, Vol 6089. p 60891R-60891.
- Tauber J & Jehan F (2005) Parasitic Keratitis and Conjunctivitis. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management*, Krachmer J, Mannis M & Holland E (Édit.) Elsevier Mosby, St. Louis, MO, 2nd Ed. Vol 1. p 427-446.
- Teng SW, Tan HY, Peng JL, Lin HH, Kim KH, Lo W, Sun Y, Lin WC, Lin SJ, Jee SH, So PTC & Dong CY (2006) Multiphoton autofluorescence and second-harmonic generation imaging of the ex vivo porcine eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47(3):1216-1224.
- Teng SW, Tan HY, Sun Y, Lin SJ, Lo W, Hsueh CM, Hsiao CH, Lin WC, Huang SCM & Dong CY (2007) Multiphoton fluorescence and second-harmonic-generation microscopy for imaging structural alterations in corneal scar tissue in penetrating full-thickness wound. *Arch. Ophthalmol.* 125(7):977-978.
- Terhune RW, Maker PD & Savage CM (1962) Optical Harmonic Generation in Calcite. *Phys. Rev. Lett.* 8(10):404-406.
- Terry MA (2003) Deep lamellar endothelial keratoplasty (DLEK): pursuing the ideal goals of endothelial replacement. *Eye* 17(8):982-988.
- Thalhammer M & Penzkofer A (1983) Measurement of third-order nonlinear susceptibilities by non-phase matched third-harmonic generation. *Appl. Phys. B: Lasers Opt.* 32(3):137-143.
- Thompson V, Seiler T & Hardten TN (2007) Photorefractive Keratectomy (PRK). *Refractive Surgery*, Azar TD, Gatinel D & Hoang-Xuan T (Édit.) Elsevier Mosby, St. Louis, MO, 2nd Ed. p 223-238.
- Tomlins PH & Wang RK (2005) Theory, developments and applications of optical coherence tomography. *J. Phys. D. Appl. Phys.* 38:2519-2535.
- Tromberg BJ (2008) Biomedical Applications of Nonlinear Optical Microscopy. *Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy*, Masters BR & So PTC (Édit.) Oxford University Press Inc., New York, NY. p 707-714.
- Tsai TH, Tai SP, Lee WJ, Huang HY, Liao YH & Sun CK (2006) Optical signal degradation study in fixed human skin using confocal microscopy and higher-harmonic optical microscopy. *Opt. Express* 14(2):749-758.
- Tsang TYF (1995) Optical third-harmonic generation at interfaces. *Phys. Rev. A* 52(5):4116-4125.

- Tserevelakis GJ, Filippidis G, Krmpot AJ, Vlachos M, Fotakis C & Tavernarakis N (2010) Imaging caenorhabditis elegans embryogenesis by third-harmonic generation microscopy. *Micron* 41(5):444-447.
- Tserevelakis GJ, Filippidis G, Megalou EV, Fotakis C & Tavernarakis N (2011) Cell tracking in live Caenorhabditis elegans embryos via third harmonic generation imaging microscopy measurements. *J. Biomed. Opt.* 16(4):0460191-0460196.
- Unite for Sight inc (2012) *Cours en ligne de 'Unite for Sight' : santé ophtalmologique.* <http://www.uniteforsight.org/course/french/cornealdisease.php> (Consulté le 2012-04-30)
- Van den Berg TJ & Spekreijse H (1997) Near infrared light absorption in the human eye media. *Vision Res.* 37(2):249-253.
- Vasilenko L, Chebotaev V & Troitskii YV (1965) Visual observation of infrared laser emission. *Soviet physics, JETP* 21:513-514.
- Vayr F, Chastang P & Hoang-Xuan T (2007) Laser and mechanical microkeratomes. *Refractive Surgery*, Azar TD, Gatinel D & Hoang-Xuan T (Édit.) Elsevier Mosby, St. Louis, MO, 2nd Ed. p 147-156.
- Vesaluoma MH, Petroll WM, Perez-Santonja JJ, Valle TU, Alio JL & Tervo TM (2000) Laser in situ keratomileusis flap margin: wound healing and complications imaged by in vivo confocal microscopy. *Am. J. Ophthalmol.* 130(5):564-573.
- Vogel A, Noack J, Nahen K, Theisen D, Busch S, Parlitz U, Hammer DX, Noojin GD, Rockwell BA & Birngruber R (1999) Energy balance of optical breakdown in water at nanosecond to femtosecond time scales. *Appl. Phys. B* 68(2):271-280.
- Vogel A & Venugopalan V (2003) Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues. *Chem. Rev.* 103(2):577-644.
- Vohnsen B & Artal P (2008) Second-harmonic microscopy of ex vivo porcine corneas. *J Microsc.* 232(1):158-163.
- Vosmerbaeumer U & Jonas JB (2008) Structure of intracorneal femtosecond laser pulse effects in conical incision profiles. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 246(7):1017-1020.
- Wang BG, Eitner A, Lindenau J & Halbhuber KJ (2008) High-resolution two-photon excitation microscopy of ocular tissues in porcine eye. *Lasers Surg. Med.* 40(4):247-256.
- Wang J, Simpson TL & Fonn D (2004) Objective measurements of corneal light-backscatter during corneal swelling, by optical coherence tomography. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 45(10):3493-3498.
- Wang W, Liu Y, Xi P & Ren Q (2010) Origin and effect of high-order dispersion in ultrashort pulse multiphoton microscopy in the 10 fs regime. *Appl. Opt.* 49(35):6703-6709.

- Ward J & New G (1969) Optical third harmonic generation in gases by a focused laser beam. *Phys. Rev.* 185(1):57-73.
- Weisenthal RW & Streeten BW (2005) Posterior Membrane Dystrophies. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management*, Krachmer J, Mannis M & Holland E (Édit.) Elsevier Mosby, St. Louis, MO, 2<sup>nd</sup> Ed. Vol 1. p 929-954.
- Wikipedia (2011a) *Membrane de Bowman*. [http://fr.wikipedia.org/wiki/Membrane de Bowman](http://fr.wikipedia.org/wiki/Membrane_de_Bowman) (Consulté le 2012-04-30)
- Wikipedia (2011b) *Surface second harmonic generation*. [http://en.wikipedia.org/wiki/Surface second harmonic generation](http://en.wikipedia.org/wiki/Surface_second_harmonic_generation) (Consulté le 2012-04-30)
- Wikipedia (2012a) *Collagène: biosynthèse du collagène*. [http://fr.wikipedia.org/wiki/Collag%C3%A8ne#Biosynth.C3.A8se du collag.C3.A8ne](http://fr.wikipedia.org/wiki/Collag%C3%A8ne#Biosynth.C3.A8se_du_collag.C3.A8ne) (Consulté le 2012-04-30)
- Wikipedia (2012b) *Edema*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Edema> (Consulté le 2012-04-30)
- Wikipedia (2012c) *Elastin*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Elastin> (Consulté le 2012-04-30)
- Wikipedia (2012d) *Flavine*. [http://fr.wikipedia.org/wiki/Flavine %28groupe%29](http://fr.wikipedia.org/wiki/Flavine_%28groupe%29) (Consulté le 2012-04-30)
- Wikipedia (2012e) *Focus stacking*. [http://en.wikipedia.org/wiki/Focus stacking](http://en.wikipedia.org/wiki/Focus_stacking) (Consulté le 2012-04-30)
- Wikipedia (2012f) *Histology: embedding*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Histology#Embedding> (Consulté le 2012-04-30)
- Wikipedia (2012g) *Masson's trichrome stain*. [http://en.wikipedia.org/wiki/Masson%27s trichrome stain](http://en.wikipedia.org/wiki/Masson%27s_trichrome_stain) (Consulté le 2012-04-30)
- Wikipedia (2012h) *Melanin*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Melanin> (Consulté le 2012-04-30)
- Wikipedia (2012i) *Methods of contour integration*. [http://en.wikipedia.org/wiki/Methods of contour integration](http://en.wikipedia.org/wiki/Methods_of_contour_integration) (Consulté le 2012-04-30)
- Wikipedia (2012j) *Microfilament*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Microfilaments> (Consulté le 2012-04-30)
- Wikipedia (2012k) *Microscope optique: microscopie en réflexion*. [http://fr.wikipedia.org/wiki/Microscope optique#Microscopie en r.C3.A9flexion](http://fr.wikipedia.org/wiki/Microscope_optique#Microscopie_en_r.C3.A9flexion) (Consulté le 2012-04-30)
- Wikipedia (2012l) *Mitochondrion*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Mitochondrion> (Consulté le 2012-04-30)

- Williams RM (*Second Harmonic Generation (SHG) Microscopy: The Forward-to-Backward (F/B) issue*. [http://www.drbio.cornell.edu/ApplicationNotes/SHG\\_Imaging\\_FvsB.pdf](http://www.drbio.cornell.edu/ApplicationNotes/SHG_Imaging_FvsB.pdf) (Consulté le 2012-04-30)
- Williams RM, Zipfel WR & Webb WW (2005) Interpreting Second-Harmonic Generation Images of Collagen I Fibrils. *Biophys. J.* 88(2):1377-1386.
- Wilson (2009) Confocal Microscopy. *Biomedical Optical Imaging*, Fujimoto JG & Farkas DL (Édit.) Oxford University Press, New York, NY. p 3-28.
- Wilson SE & Hong JW (2000) Bowman's layer structure and function: critical or dispensable to corneal function? A hypothesis. *Cornea* 19(4):417-420.
- Wirbelauer C & Pham DT (2005) Imaging interface fluid after laser in situ keratomileusis with corneal optical coherence tomography. *J. Cataract Refract. Surg.* 31(4):853-856.
- Wirbelauer C, Winkler J, Bastian G, Häberle H & Pham D (2002) Histopathological correlation of corneal diseases with optical coherence tomography. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 240(9):727-734.
- Wolffsohn JS, Doshi S & Harvey W (2008) *Ophthalmic imaging*. Butterworth Heinemann/Elsevier. 172 p.
- Wong ACM, Wong CC, Yuen NSY & Hui SP (2002) Correlational study of central corneal thickness measurements on Hong Kong Chinese using optical coherence tomography, Orbscan and ultrasound pachymetry. *Eye* 16(6):715-721.
- Yaqoob Z, Wu J & Yang C (2005) Spectral domain optical coherence tomography: a better OCT imaging strategy. *Biotechniques* 39(6 Suppl):S6-13.
- Yeh AT, Nassif N, Zoumi A & Tromberg BJ (2002) Selective corneal imaging using combined second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Opt. Lett.* 27:2082-2084.
- Yelin D & Silberberg Y (1999) Laser scanning third-harmonic-generation microscopy in biology. *Opt. Express* 5(8):169-175.
- Zaret MM (1965) *Federation Proc.* 24, Suppl.(14):S62.
- Zipfel WR, Williams RM, Christie R, Nikitin AY, Hyman BT & Webb WW (2003a) Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(12):7075-7080.
- Zipfel WR, Williams RM & Webb WW (2003b) Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat. Biotechnol.* 21(11):1369-1377.

Zoumi A, Yeh A & Tromberg BJ (2002) Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(17):11014-11019.





## ANNEXE A

### Calculs optiques pour le choix des lentilles oculaire et de tube

Comme il a été dit dans la section "objectifs et méthodes" (voir le chap. 5.2.2 3)) le rôle de ces lentilles est d'assurer le recouvrement de la pupille arrière de l'objectif condenseur et d'empêcher que le faisceau bouge à cet endroit.

Voyons ainsi ces trois conditions:

#### 1) Recouvrement de la pupille arrière

Le laser t-pulse a un faisceau d'un diamètre de 1.2 mm à 30 cm depuis sa fenêtre de sortie (le col du faisceau minimum est situé d'après le constructeur  $\pm 0.5$  cm de la fenêtre de sortie). Ainsi le col du faisceau à cette position est de 0.6 mm.

En optique gaussienne, le col de faisceau est donné par:

$$w(z) = w_0 \left( 1 + \left( \frac{z}{z_R} \right)^2 \right)^{1/2},$$

et

$$w_0 = \left( \frac{\lambda z_R}{\pi} \right)^{1/2},$$

où  $w_0$  est le col minimum,  $z$  la position depuis le col minimum,  $z_R$  la distance de Rayleigh,  $\lambda$  la longueur d'onde d'émission laser.

Comme 2.2 m sépare la fenêtre de l'oscillateur du premier miroir galvanométrique de la tête de balayage, le faisceau avait alors un diamètre de 2.8 mm sur le miroir galvanométrique.

Par ailleurs la pupille arrière de l'objectif Olympus est de 8.0 mm. Nous avons donc choisi pour être sûr de couvrir la pupille arrière de l'objectif, un système de lentilles qui grossisse de trois

fois le faisceau si bien qu'à hauteur de la pupille arrière de l'objectif celui-ci ait un diamètre de 8.4 mm.

Pour cet élargisseur de faisceau, nous avons choisi un jeu de deux lentilles plano-convexes de focale 100 mm et 300 mm. Voyons dans le point suivant quel déplacement sur l'échantillon, ce système afocal induit pour une certaine déviation angulaire des miroirs galvanométriques

## 2) Calibration des distances avec le balayage optique

La plage angulaire totale que peut couvrir le miroir galvanométrique (dans l'une ou l'autre direction) est de  $45^\circ$  cependant pour nos expériences nous ne pouvions pas exploiter toute la plage angulaire entre autres à cause des pupilles que présentaient les optiques entre la tête de balayage et l'objectif. Par ailleurs le nombre de bits total pour cette déviation angulaire complète dans une direction est de  $2^{16}$  bits et il est possible d'avoir la résolution, i.e. quelle déviation angulaire implique 1 bit. Voyons donc ici à quoi la spécification des paramètres de déplacement dans notre interface LABVIEW pour le balayage optique donnée en bits (ex. Data Axis Distance -DAD- ) correspondait comme distance de parcours réelle sur l'échantillon.

Soit

$$\alpha = \text{DAD} \cdot R,$$

où  $\alpha$  est l'angle parcouru (rad) pour la DAD spécifiée (bit) et  $R$ , la résolution (rad/bit).

Cet angle implique une image par la lentille oculaire qui focalise en un point avec une ordonnée comptée depuis l'axe optique  $Y_{oc}$ . Cette ordonnée est donnée dans la limite paraxiale qui est notre situation, par:

$$Y_{oc} = \alpha \cdot f_{oc},$$

où  $f_{oc}$  est la focale de la lentille oculaire.

Enfin ce même point va à son tour être imager par l'objectif condenseur. Pour savoir à quelle ordonnée ce point va être imagé dans l'échantillon il suffit de considérer le grandissement de l'objectif qui est donné pour un objectif corrigé à l'infini par:

$$G = \frac{f_T}{f_{Obj}} ,$$

où  $f_T$  et  $f_{obj}$  sont respectivement les focales de la lentille de tube et celle de l'objectif

Ainsi la déviation métrique correspondante sur l'échantillon pour la spécification d'une DAD en bits est donnée par:

$$Y_{ech} = \frac{DAD \cdot R \cdot f_{oc} \cdot f_{Obj}}{f_T} .$$

Ainsi pour 4000 bits spécifiés comme dans nos images, nous avons avec  $f_T$ ,  $f_{oc}$  et  $f_{obj}$  en mm.

$$Y_{ech} = \frac{4000 \times 1.2 \cdot 10^{-5} \times 100 \times 3}{300} ,$$

$$Y_{ech} = 48 \mu\text{m} .$$

Cette correspondance a été confirmée par l'utilisation d'une lame de microscope graduée (lame micrométrique avec deux axes d'échelle linéaire, Edmund Optics Inc., Barrington, NJ).

### 3) Positionnement des lentilles d'oculaire et de tube

Le dernier point abordé dans cette annexe concerne le placement des lentilles du système afocal de telle façon que le col du laser t-pulse soit bien immobile à hauteur de la pupille arrière de l'objectif condenseur. Pour réaliser ce calcul nous pouvons utiliser l'optique matricielle puisque de nombreux composants interviennent.

Les matrices de transformation du faisceau depuis la tête de balayage jusqu'à la pupille arrière de l'objectif sont les suivantes pour agir sur les coordonnées du faisceau:

$$F = \begin{pmatrix} y \\ \alpha \end{pmatrix} \text{ avec } y \text{ l'ordonnée depuis l'axe optique et } \alpha \text{ l'angle de déviation. Dans notre cas } y \text{ vaut } 0$$

puisque l'incidence se fait théoriquement sur le centre du miroir le long de l'axe optique et  $\alpha$  peut être choisi arbitrairement puisqu'au final il faudra que le point sur la pupille arrière de l'objectif

ait  $F' = \begin{pmatrix} 0 \\ \alpha \end{pmatrix}$  quel que soit  $\alpha$ . Ainsi le calcul pour le placement des lentilles revient à résoudre une équation établie par les différentes matrices optiques où seule une inconnue subsiste.

a) matrice de libre propagation entre le miroir galvanométrique et l'incidence sur la lentille oculaire

$$M_{\text{lib1}} = \begin{pmatrix} 1 & d_1 \\ 0 & 1 \end{pmatrix},$$

où  $d_1$  est la distance qui sépare le miroir galvanométrique de la lentille oculaire le long de l'axe optique. Elle est justement l'inconnue recherchée.

b) matrice de transformation par la lentille oculaire

$$M_{\text{Loc}} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ \frac{-1}{100} & 1 \end{pmatrix},$$

puisque la  $f_{\text{oc}} = 1.0 \cdot 10^2$  mm

c) matrice de libre propagation entre les deux lentilles du système afocal

$$M_{\text{lib1}} = \begin{pmatrix} 1 & 400 \\ 0 & 1 \end{pmatrix}.$$

Le système de lentilles devant être afocal, la distance séparant les deux composants doit être égale à la somme de leur focale  $4.0 \cdot 10^2$  mm

d) matrice de transformation par la lentille oculaire

$$M_{\text{Loc}} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ \frac{-1}{300} & 1 \end{pmatrix},$$

puisque la  $f_T=3.0 \cdot 10^2$  mm.

e) matrice de libre propagation entre la lentille de tube et la pupille arrière de l'objectif

$$M_{\text{lib1}} = \begin{pmatrix} 1 & 100 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} .$$

Cette distance est laissée libre mais il est préférable pour avoir un microscope compact qu'elle soit courte. Nous l'avons fixée à  $1.0 \cdot 10^2$  mm.

Ainsi en résolvant l'équation sur l'ordonnée ci-dessous:

$$\begin{pmatrix} 0 \\ \alpha \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -3 & -3d_1 + \frac{11}{3} \cdot 10^2 \\ 0 & -\frac{1}{3} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ \alpha \end{pmatrix}$$

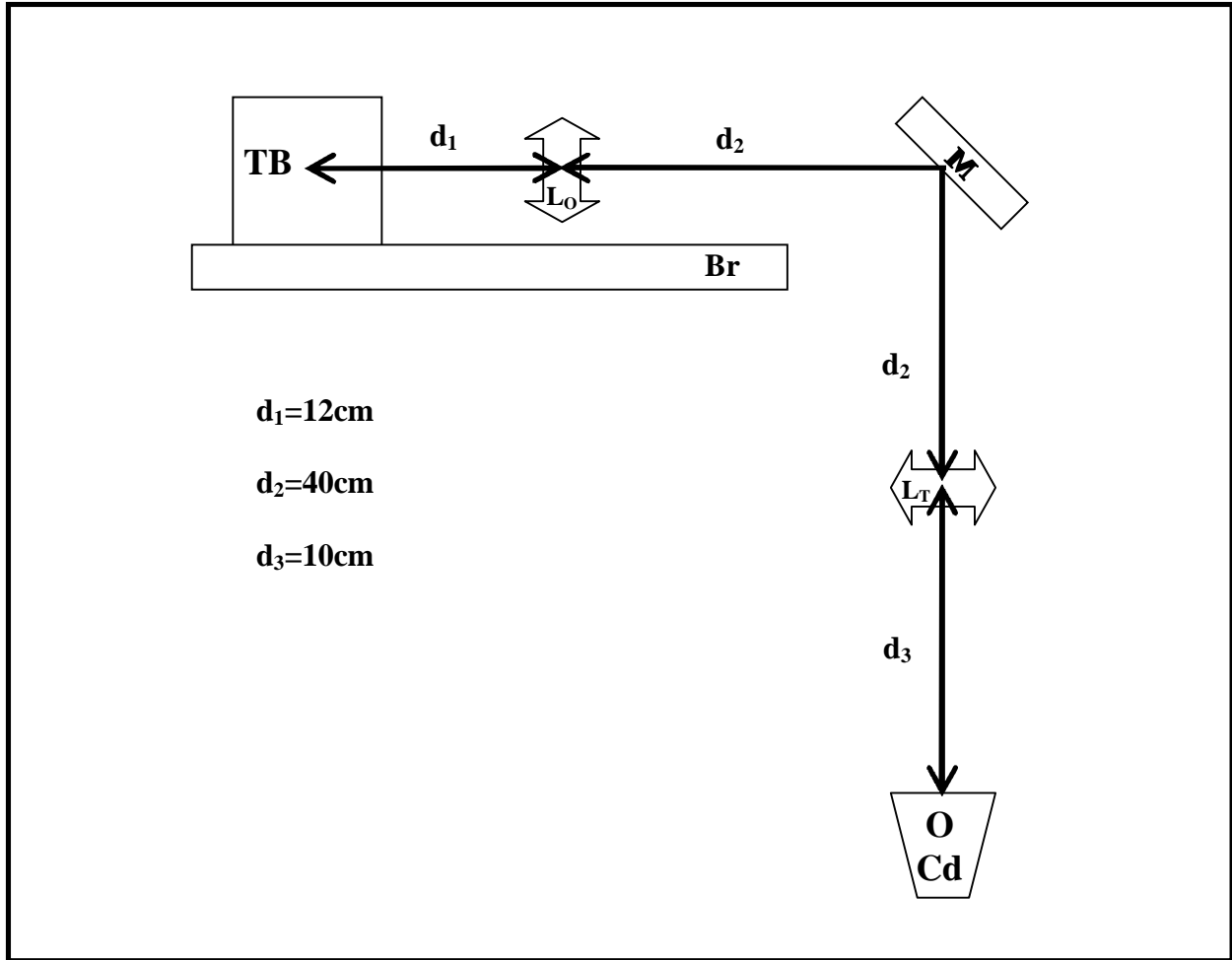
soit

$$-3d_1 + \frac{11}{3} \cdot 10^2 = 0 ,$$

d'où

$$d_1 = 1.2 \cdot 10^2 \text{ mm} .$$

Pour conclure le dessin en page suivante représente le schéma du microscope avec ces distances entre les différentes optiques.



**Schéma résumant le système optique pour le balayage optique**

M : miroirs ; P : périscope ; TB : Tête de Balayage ; Br : Breadboard ;  $L_o$  : lentille oculaire ;  $L_T$  : lentille de tube ;  
 O Cd : objectif condenseur.

## ANNEXE B

### Calcul de d'intensité de GTH

Cette situation correspond à celle développée dans le chapitre 4.2, i.e sur une interface perpendiculaire à l'axe optique dans le cas où la dispersion est négligeable devant la focalisation (hypothèse f) ).

En prenant en compte cette hypothèse f), l'équation 60 peut se réécrire<sup>26</sup> du côté du milieu 1  $[-\infty ; z_i]$  :

$$A_{3(1)}(\mathbf{r}, z) = \frac{i(3\omega)}{2n_{1(3\omega)} \cdot c} \chi_1^{(3)} A_{01}^3 \frac{1}{(1+i\zeta_1)} e^{\frac{-3r^2}{w_0^2(1+i\zeta_1)}} \left[ -\frac{b}{2i} \left( \frac{1}{1+i\zeta_1} \right) \right]_{-\infty}^{z_i},$$

soit,

$$A_{3(1)}(\mathbf{r}, z) = \frac{i(3\omega)}{2n_{1(3\omega)} \cdot c} \chi_1^{(3)} A_{01}^3 \frac{1}{(1+i\zeta_1)} e^{\frac{-3r^2}{w_0^2(1+i\zeta_1)}} \left[ -\frac{b}{2i} \left( \frac{1}{1+i\zeta_1} \right) \right]_{-\infty}^{z_i}.$$

De la même façon, dans le milieu 2  $[z_i ; +\infty]$ ,

$$A_{3(2)}(\mathbf{r}, z) = \frac{3w_0^2 \omega^2 n_{2(\omega)}}{4n_{2(3\omega)} c^2} \chi_2^{(3)} (t_{1/2}^{\omega} \cdot A_{01})^3 \frac{1}{(1+i\zeta_2^i)} \frac{1}{(1+i\zeta_2)} e^{\frac{-r^2}{w_0^2(1+i\zeta_2)}}.$$

Pour calculer le champ total pour  $z \gg z_i$ , superposons les deux champs qui sont émis dans chacun des deux milieux 1 et 2 en prenant en compte qu'à la traversée de l'interface, il y ait une transmission donnée sous incidence normale de :

$$t_{1/2} = \frac{2n_1}{n_1 + n_2}.$$

Par ailleurs,

$$t_{1/2}^{3\omega} \approx (t_{1/2}^{\omega})^3.$$

26 : dans les calculs qui suivent nous reprenons la notation avec  $\zeta = 2z/b_{1ou2}$  et  $\zeta^i = 2z_i/b_{1ou2}$ , son indice fait soit référence au milieu 1 soit au milieu 2 et son exposant i fait référence à  $z_i$ , la position de l'interface (lorsqu'il n'y pas d'exposant, c'est simplement la variable z). Par ailleurs pour simplifier nous poserons  $r^2 = x^2 + y^2$

Ainsi

$$A_T(r,z) = -t_{1/2}^{3\omega} \frac{3w_0^2 \omega^2 n_1(\omega)}{4n_1(3\omega)c^2} \chi_1^{(3)} A_{01}^3 \frac{1}{(1+i\zeta_1^i)} \frac{1}{(1+i\zeta_1)} e^{\frac{-r^2}{w_{03}^2(1+i\zeta_1)}} +$$

$$\frac{3w_0^2 \omega^2 n_2(\omega)}{4n_2(3\omega)c^2} \chi_2^{(3)} \left( t_{1/2}^\omega \cdot A_{01} \right)^3 \frac{1}{(1+i\zeta_2^i)} \frac{1}{(1+i\zeta_2)} e^{\frac{-r^2}{w_{03}^2(1+i\zeta_2)}} \quad \text{.} \quad \text{éq. 63}$$

Cette expression permet déjà de confirmer que si la fondamentale est focalisée dans un matériau homogène et isotrope, donc concernant les grandeurs  $n$ ,  $\chi$ ,  $t$  ( $t$  alors = 1) et  $b$  celles-ci sont alors les mêmes dans les deux milieux, la TH n'est pas générée. Dans le cas contraire ( $1 \neq 2$ ), l'irradiance totale fait apparaître chacune des irradiances dans l'un et l'autre milieu et un terme interférentiel :

Soit avec  $z \gg z_i$ , avec,

$$I_T = \frac{1}{2} n_2 \varepsilon_0 c E_T E_T^* \quad .$$

Soit en considérant  $A_T$  et son conjugué  $A_T^*$  (deuxième bloc) :



$$\begin{aligned}
I_T = \frac{1}{2} n_{2(3\omega)} \epsilon_0 c \cdot & \left[ \left( -t_{1/2}^{3\omega} \frac{3w_0^2 \omega^2 n_{1(\omega)}}{4n_{1(3\omega)} c^2} \chi_1^{(3)} A_{01}^3 \frac{1}{(1+i\zeta_1^i)} \frac{1}{(1+i\zeta_1)} e^{\frac{-r^2}{w_{03}^2(1+\zeta_1^2)}} e^{\frac{i2zr^2}{w_{03}^2(1+\zeta_1^2)b_1}} + \right. \right. \\
& \left. \left. t_{1/2}^{3\omega} \frac{3w_0^2 \omega^2 n_{2(\omega)}}{4n_{2(3\omega)} c^2} \chi_2^{(3)} A_{01}^3 \frac{1}{(1+i\zeta_2^i)} \frac{1}{(1+i\zeta_2)} e^{\frac{-r^2}{w_{03}^2(1+\zeta_2^2)}} e^{\frac{i2zr^2}{w_{03}^2(1+\zeta_2^2)b_2}} \right) \right. \\
& \left( -t_{1/2}^{3\omega} \frac{3w_0^2 \omega^2 n_{1(\omega)}}{4n_{1(3\omega)} c^2} \chi_1^{(3)} A_{01}^3 \frac{1}{(1-i\zeta_1^i)} \frac{1}{(1-i\zeta_1)} e^{\frac{-r^2}{w_{03}^2(1+\zeta_1^2)}} e^{\frac{-i2zr^2}{w_{03}^2(1+\zeta_1^2)b_1}} + \right. \\
& \left. \left. t_{1/2}^{3\omega} \frac{3w_0^2 \omega^2 n_{2(\omega)}}{4n_{2(3\omega)} c^2} \chi_2^{(3)} A_{01}^3 \frac{1}{(1-i\zeta_2^i)} \frac{1}{(1-i\zeta_2)} e^{\frac{-r^2}{w_{03}^2(1+\zeta_2^2)}} e^{\frac{-i2zr^2}{w_{03}^2(1+\zeta_2^2)b_2}} \right) \right]
\end{aligned}$$

· **éq. 64**

Soit au final :

$$\begin{aligned}
I_T = & \left( \frac{1}{2} n_{2(3\omega)} \varepsilon_0 c \right) \times \\
& \left[ \left( t_{1/2}^{3\omega} \frac{3w_0^2 \omega^2 n_{1(\omega)} \chi_1^{(3)} A_{01}^3}{4n_{1(3\omega)} c^2} \right)^2 \frac{1}{\left(1 + (\zeta_1^i)^2\right)} \frac{1}{\left(1 + (\zeta_1)^2\right)} e^{\frac{-2r^2}{w_{03}^2 (1 + \zeta_1^2)}} + \right. \\
& \left( t_{1/2}^{3\omega} \frac{3w_0^2 \omega^2 n_{2(\omega)} \chi_2^{(3)} A_{01}^3}{4n_{2(3\omega)} c^2} \right)^2 \frac{1}{\left(1 + (\zeta_2^i)^2\right)} \frac{1}{\left(1 + (\zeta_2)^2\right)} e^{\frac{-2r^2}{w_{03}^2 (1 + \zeta_2^2)}} - \\
& \left( t_{1/2}^{3\omega} \right)^2 \frac{9w_0^2 \omega^2 n_{1(\omega)} \chi_1^{(3)} w_0^2 \omega^2 n_{2(\omega)} \chi_2^{(3)} A_{01}^6}{4n_{1(3\omega)} c^2 4n_{2(3\omega)} c^2} e^{\frac{-r^2 \left( 2 + (\zeta_1)^2 + (\zeta_2)^2 \right)}{w_{03}^2 \left( 1 + (\zeta_1)^2 \right) \left( 1 + (\zeta_2)^2 \right)}} \cdot \\
& \frac{1}{\left(1 + (\zeta_1^i)^2\right) \left(1 + (\zeta_2^i)^2\right)} \frac{1}{\left(1 + (\zeta_1)^2\right) \left(1 + (\zeta_2)^2\right)} \cdot \\
& 2 \cdot \left[ \cos \left( \frac{r^2 \left( \zeta_2 \left( 1 + (\zeta_1)^2 \right) - \zeta_1 \left( 1 + (\zeta_2)^2 \right) \right)}{w_{03}^2 \left( 1 + (\zeta_1)^2 \right) \left( 1 + (\zeta_2)^2 \right)} \right) \left[ \left( 1 + \zeta_1^i \zeta_2^i \right) \left( 1 + \zeta_1 \zeta_2 \right) - \left( \zeta_1^i - \zeta_2^i \right) \left( \zeta_1 - \zeta_2 \right) \right] - \right. \\
& \left. \sin \left( \frac{r^2 \left( \zeta_2 \left( 1 + (\zeta_1)^2 \right) - \zeta_1 \left( 1 + (\zeta_2)^2 \right) \right)}{w_{03}^2 \left( 1 + (\zeta_1)^2 \right) \left( 1 + (\zeta_2)^2 \right)} \right) \left[ \left( 1 + \zeta_1^i \zeta_2^i \right) \left( \zeta_1 - \zeta_2 \right) + \left( \zeta_1^i - \zeta_2^i \right) \left( 1 + \zeta_1 \zeta_2 \right) \right] \right] \cdot \quad \text{éq. 65}
\end{aligned}$$

Cette équation 65 donne donc l'expression générale de l'intensité de GTH dans les conditions qui sont décrites en chapitre 4.2. Le reste du chapitre 4.2 discute de ce résultat et donne l'expression de la résolution spatiale axiale de la microscopie de GTH dans ce cadre d'approximation.