

EXPLORATION DES SIGNAUX HARMONIQUES EN MICROSCOPIE MULTIPHOTONIQUE POUR LE PHÉNOTYPAGE DU MUSCLE ET DU SYSTÈME NERVEUX

Laurence DUBREIL ^{1,2}

laurence.dubreil@oniris-nantes.fr

1. INRA/Oniris UMR703 PAnTher,
44307 NANTES, France.

2. LUNAM Université, Oniris, École nationale vétérinaire,
agro-alimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique,
44307 NANTES, France.

RESUME

L'excitation multiphotonique permet d'obtenir des signaux de génération de seconde et troisième harmonique ((SHG et THG). Il s'agit d'un processus optique non linéaire pour lequel deux ou trois photons d'une fréquence donnée sont convertis en un seul photon avec une fréquence doublée et/ou triplée [1]. Les signaux de SHG peuvent être produits uniquement par des arrangements denses de molécules non-centro-symétriques. Le collagène fibrillaire et les myofilaments sont les sources majeures de SHG générées dans le tissu musculaire. D'un point de vue histologique, l'imagerie de la SHG permet d'explorer la fibrose au sein des muscles sans réalisation préalable d'immunomarquage. Les signaux SHG sont également exploités pour analyser les modifications d'organisation et d'orientation des fibres de collagène en lien avec une maladie [17].

Les signaux THG sont générés lorsqu'il y a des interfaces [(eau/huile) ou (air/eau)] dans un échantillon tissulaire. C'est pourquoi, ils permettent d'imager les vésicules lipidiques ou les bulles d'air. L'intérêt biologique de la détection des signaux THG est que ces derniers permettent d'observer le tissu adipeux dans le muscle dystrophique et la myéline riche en corps gras pour l'exploration du système nerveux.

Il existe des nanoparticules harmoniques capables de générer à la fois des signaux SHG et THG. Ces outils sont très prometteurs pour suivre des agents thérapeutiques cellulaires tels que les cellules souches adultes dérivées du muscle développées par l'équipe de Karl Rouger [24, 26].

MOTS CLÉS

Microscopie multiphotonique, Génération de Seconde Harmonique, Génération de Troisième Harmonique, Phénotypage tissulaire, Collagène, Myosine, Myéline, Nanoparticules

ABSTRACT

Multiphoton excitation produces second and third harmonic generation (SHG and THG) signals. It is a nonlinear optical process for which two or three photons of a given frequency are converted into a single photon with their double and/or triple frequency [1]. SHG signals are obtained exclusively from dense assemblies of non-centrosymmetric molecules. Fibrillar collagen and myofilaments are the major sources of SHG generated in the muscle tissue. From an histological point of view, SHG imaging makes it possible to explore fibrosis without doing previous immunolabeling. SHG signals are also used to analyze changes in the organization and orientation of collagen fibers in relation to the course of the disease [17]. THG signals are generated when there are [(water/oil) or (air/water)] interfaces in a tissue sample. This is why they are often observed in lipid vesicles or air bubbles. The main biological interest of THG signals detection is that they allow fat tissue observation in dystrophic muscle and fat-rich myelin exploration in the central nervous system. There are harmonic nanoparticles capable of generating both SHG and THG signals. These tools are very promising for tracking cell therapeutic agents such as adult muscle-derived stem cells developed by Karl Rouger's team [24, 26].

KEY WORDS

Multiphotonic microscopy, Second Harmonic Generation, Third Harmonic Generation, tissue phenotyping, Muscle, Collagen, Myosin, Myelin, Nanoparticles

INTRODUCTION

La théorie selon laquelle l'excitation à deux photons résulte de l'absorption simultanée de deux photons a été développée par Maria Goeppert Mayer au cours de ses travaux de thèse en 1931 [1]. L'absorption linéaire à deux photons a ensuite été expérimentée par Kaiser en 1961 suite à l'apparition des premières sources laser à impulsion [2] et la mise en pratique dans le domaine de la microscopie par Denk en 1990 [3]. Cette nouvelle technique de microscopie non linéaire de fluorescence, caractérisée par des capacités d'analyse non destructrice et d'imagerie tridimensionnelle à haute résolution spatiale est devenue une technique alternative à la microscopie confocale de fluorescence pour l'étude des tissus épais.

La microscopie à deux photons a en effet un certain nombre d'avantages tels que :

- La meilleure pénétration dans les tissus biologiques, liée notamment à l'utilisation d'un laser excitateur infrarouge plutôt que visible comme en microscopie confocale [4,5].
- Le meilleur rapport signal/bruit en profondeur, lié au fait que la génération de fluorescence se produit seulement au point focal [5]. De plus, la longueur d'onde d'excitation biphotonique est deux fois la longueur d'onde d'émission de fluorescence. Il est donc très facile de séparer efficacement le signal de fluorescence émis de la lumière d'excitation en utilisant des filtres appropriés (Figure 1).

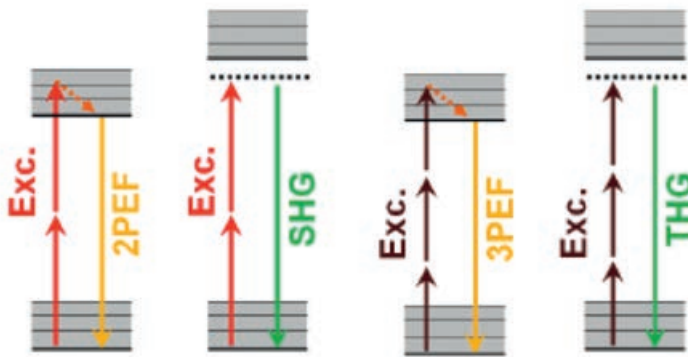


Figure 1 : Diagramme simplifié de Jablonsky. 2PEF, Emission de fluorescence à 2 Photons. SHG, Génération de Seconde Harmonique. 3PEF, Emission de Fluorescence à 3 Photons. THG, Génération de Troisième Harmonique.

- La réduction de la phototoxicité due au confinement de l'excitation dans le plan d'imagerie, et donc la grande compatibilité avec l'analyse des échantillons biologiques vivants.
- La possibilité d'utiliser simultanément différents modes de contraste notamment de combiner fluorescence avec la génération de seconde harmonique (SHG) et/ou la génération de troisième harmonique (THG).

La SHG est un processus optique non linéaire au cours duquel deux photons d'une fréquence donnée sont convertis en un seul photon à la fréquence double. Ce phénomène a été observé pour la première fois par Franken et al., [6]. Cette technique est passée relativement inaperçue pendant plusieurs décennies en raison du faible nombre de matériaux connus capables de générer de la SHG. Les résolutions spatiales de la fluorescence et de la microscopie harmonique (SHG, THG) sont comparables. Cependant, la génération d'harmonique et l'émission de fluorescence obtenues à partir d'une excitation multiphotonique sont fondamentalement différentes dans leur nature.

La fluorescence multiphotonique est basée sur l'absorption simultanée de deux photons (2P) ou trois photons (3P), chacun de ces photons apportant la moitié ou le tiers de l'énergie nécessaire à la transition électronique du fluorophore pour produire l'émission d'un photon unique (**Figure 1**). La SHG et la THG sont basées sur la diffusion non linéaire de deux ou trois photons de basse énergie produisant respectivement un photon avec une fréquence doublée ou triplée sans perte d'énergie (**Figure 1**).

La microscopie harmonique pour le phénotypage du tissu

• Le collagène et la myosine génèrent des signaux de seconde harmonique

La découverte de marqueurs endogènes capables de produire de la SHG et/ou de la THG a suscité un intérêt grandissant chez les biologistes. Cette technique d'imagerie rend en effet possible la visualisation de molécules ou de structures sans marquage préalable.

Ainsi la SHG permet l'observation de structures organisées de molécules non centrosymétriques sans la contribution de sondes exogènes. Ces macrostructures denses relativement rares dans les tissus vivants donnent à la technique une spécificité

très intéressante. Les sources endogènes de SHG en biologie sont principalement le collagène fibrillaire [7-10], les filaments de myosine [11-14] et les faisceaux de microtubules polarisés [14, 15]. L'imagerie du collagène et des filaments de myosine sont illustrés dans la **Figure 2**.

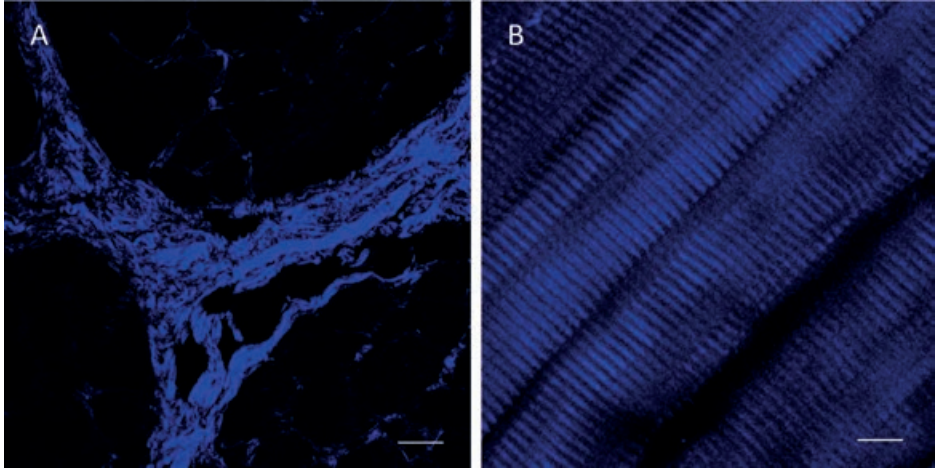


Figure 2 : A) SHG générée par le collagène dans le muscle squelettique. B) SHG générée par les bandes de myosine dans le muscle squelettique. Barre d'échelle 50 μm .

La microscopie SHG présente de nombreux avantages par rapport aux techniques histologiques conventionnelles. Ce mode endogène de contraste est applicable aux sections non marquées. En outre, la microscopie harmonique représente un outil intéressant pour obtenir une reconstruction d'image 3D du collagène par rapport à des techniques immunohistochimiques et de colorations histologiques limitée à des sections en 2D. Récemment, l'importance du remodelage du réseau de collagène a été associée à la définition de tumeur [16-17]. Ce remodelage pourrait fournir de nouveaux marqueurs sur l'évolution de maladies et permettre d'évaluer les avantages potentiels de stratégies thérapeutiques. L'équipe de Nina Raben a démontré que la combinaison des signaux de fluorescence et des signaux harmoniques obtenus en microscopie biphotonique détecte également des défauts sarcomériques qui devraient être utiles dans l'analyse et le diagnostic d'un large éventail de pathologies du muscle squelettique [18].

• La myéline et le tissu adipeux génèrent des signaux de troisième harmonique

La THG est un mécanisme de contraste sensible au changement d'indice de réfraction au sein des structures observées, elle est particulièrement observée aux interfaces air/eau et au niveau des interfaces lipidiques. Dans le processus THG, trois photons incidents sont convertis en un photon avec une triple énergie et en utilisant une longueur d'onde d'excitation dans la plage d'excitation de 1,2 μm à 1,5 μm . Contrairement à la SHG, la THG ne requiert pas d'asymétrie moléculaire. La THG est utilisée pour imager des hétérogénéités optiques détectées dans des échantillons biologiques, visualiser la morphologie des cellules, des noyaux, des vaisseaux et des tissus non colorés, en particulier pour détecter les structures lipidiques comme le tissu adipeux dans le muscle ou la myéline [19-21].

L'imagerie de la myéline dans la moelle épinière et du tissu adipeux dans le muscle est illustrée dans la **Figure 3**. La myéline majoritairement localisée dans la substance blanche de la moelle épinière génère de la THG (A). La combinaison des signaux de seconde harmonique du collagène et des signaux de troisième harmonique du tissu adipeux contribue à fournir des indicateurs complémentaires sur la fibrose et le niveau d'infiltration adipeuse (B), faisant de la microscopie multiphotonique une technique prometteuse pour le phénotypage du tissu.

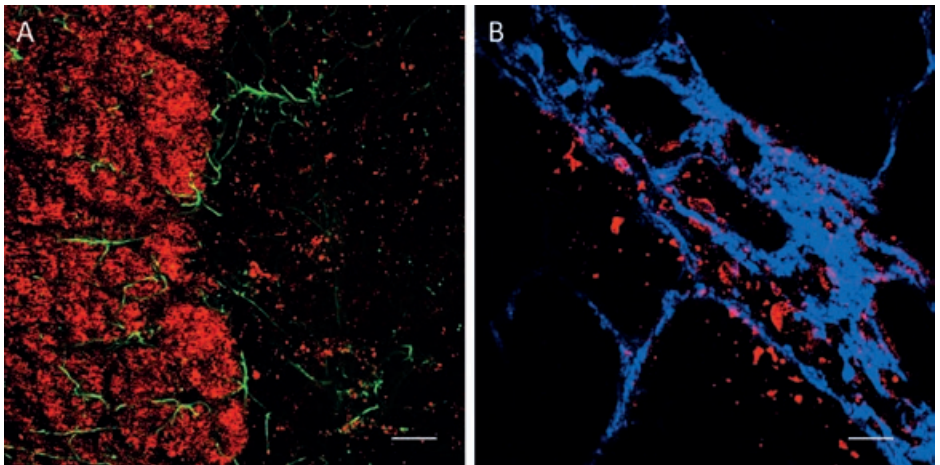


Figure 3 : A) THG générée par la myéline dans la moelle épinière enregistré dans le canal rouge. B) THG générée par le tissu adipeux dans le muscle dystrophique enregistré dans le canal rouge. SHG générée par le collagène enregistré dans le canal bleu. Barre d'échelle 50 μm .

Farrar et al., [22] a démontré que l'acquisition simultanée des signaux de la THG et de la fluorescence à deux photons permettait d'imager les gaines de myéline entourant les axones marqués par fluorescence, et de suivre la perturbation de la myéline après une lésion de la moelle épinière. Ces résultats démontrent que la microscopie THG est un outil prometteur pour l'étude de l'altération de la myéline.

La microscopie harmonique pour tracer les cellules

Les nanoparticules harmoniques (HNPs) sont de nouveaux types de particules développées pour l'imagerie multiphotonique. Parmi celles-ci, les nanoparticules BFO (Bismuth Ferrite), qui sont des nano-cristaux non centro-symétriques capables de générer simultanément des signaux de seconde harmonique (SHG) et des signaux de troisième harmonique (THG). Ces nanoparticules sont photostables, d'une taille moyenne de 120 nm avec une longueur d'onde d'excitation accordable entre 680 nm et 1200 nm [23-24]. Une évaluation des effets cytotoxiques des nanoparticules BFO a été réalisée sur des lignées cellulaires [25]. Les résultats montrent que les nanoparticules BFO très peu cytotoxiques sont des outils prometteurs pour l'imagerie des cellules.

Suite à ces travaux, ces nanoparticules ont été utilisées pour marquer des cellules souches adultes du muscle, les cellules hMuStem, candidats thérapeutiques cellulaires pour traiter la Myopathie de Duchenne [26-27]. Le marquage des cellules hMuStem a pour objectif de renseigner leur biodistribution suite à leur administration chez l'animal. Cette information est exigée par les agences réglementaires pour valider la mise sur le marché d'un produit thérapeutique. L'imagerie des nanoparticules harmoniques dans les cellules hMuStem et le muscle injecté est illustrée dans la **Figure 4**.

Il a également été montré que l'acquisition simultanée des signaux de SHG et THG générés par les nanoparticules, aide à les différencier du tissu [25]. De même, il a été démontré que l'exposition des cellules hMustem aux nanoparticules HNPs BFO n'induisait pas de modifications significatives sur leur caractéristiques prolifératives et leur morphologie, révélant ainsi la forte biocompatibilité des nanoparticules [25].

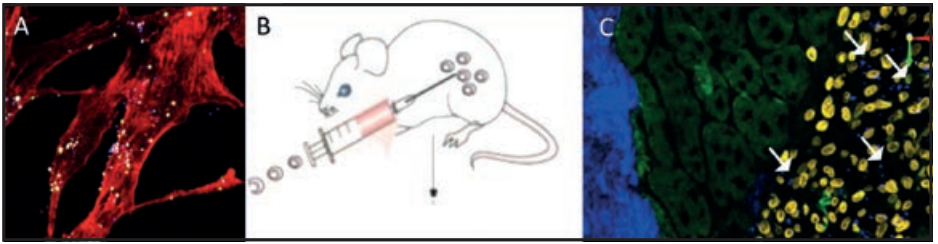


Figure 4 : A) Cellules marquées par les nanoparticules BFO ; signal SHG en bleu, fluorescence rouge de la Phalloidin-AL555. B) administration intramusculaire des cellules marquées chez la souris. C) Tracking des cellules marquées in situ dans le muscle.

CONCLUSION

Les résultats décrits dans ce chapitre démontrent la forte potentialité de la microscopie multiphotonique pour le phénotypage tissulaire avec des applications concrètes dans le muscle et le système nerveux. L'intérêt de la SHG et de la THG repose (i) sur le fait qu'il n'est pas nécessaire d'effectuer de marquage du tissu pour obtenir ces signaux (ii) qu'il est possible d'obtenir des informations sur la structure des macromolécules imagées et de relier ces informations à une pathologie ou à l'efficacité d'un traitement [11], [161], [18]. Les signaux harmoniques peuvent également être générés par des nanoparticules métalliques utilisées pour le suivi de cellules souches adultes du muscle, candidats thérapeutiques pour traiter la myopathie de Duchenne [24]. Enfin, l'exploration combinée des signaux harmoniques et de la fluorescence émise par les tissus font de la microscopie multiphotonique une technique de choix pour l'imagerie du vivant.

REMERCIEMENTS

Les travaux de l'UMR703 cités dans ce chapitre ont reçu le soutien des Pays de la Loire et de NeurATRIS. Les images ont été réalisées avec un microscope biphotonique A1RMP de la plateforme APEX UMR703 PanTher INRA Oniris, Centre d'Excellence Nikon.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Göppert-Mayer M : Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann. Phys.*, 1931, **401**, (3), 273–294.
2. Kaiser W and Garrett C : Two-Photon Excitation in CaF₂:Eu²⁺. *Phys. Rev. Lett.*, 1961, **7**, (6), 229–231.
3. Denk W, Strickler JH, and Webb WW : Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 1990, **248**, (4951), 73–6.
4. Centonze VE and White JG : Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging. *Biophys. J.*, 1998, **75**, (4), 2015–2024.
5. Vroom JM : Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two-photon excitation microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**, (8), 3502–3511.
6. Franken PA, Hill AE, Peters CW, Weinreich G : Generation of optical harmonics, *Phys. Rev. Lett.*, 1961, **7**, (4), 118.
7. Freund I, Deutsch M, and Sprecher A : Connective tissue polarity. Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon, *Biophys. J.*, 1986, **50**, (4), 693–712.
8. Zoumi A, Lu X, Kassab GS, and Tromberg BJ : Imaging coronary artery microstructure using second-harmonic and twophoton fluorescence microscopy, *Biophysical journal*, 2004, **87**, (4), 2778–86.
9. Jiang LW, Wang XF, Wu ZY, Lin PH, DU HP, Wang S, Li LH, Fang N, Zhuo SM, Kang DZ, Chen JX : Label-free detection of fibrillar collagen deposition associated with vascular elements in glioblastoma multiforme by using multiphoton microscopy, *J. Microsc.*, 2017, **265**, (2), 207–213.
10. Campagnola PJ et al. : Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues, *Biophys. J.*, 2002, **82**, (1) (1), 493–508, 2002.
11. Rouede D, Recher G, Bellanger JJ, Lavault MT, Schaub E, and Tiaho F : Modeling of supramolecular centrosymmetry effect on sarcomeric SHG intensity pattern of skeletal muscles, *Biophys. J.*, 2011, **101**, (2), 494–503.
12. Huang SH, Der Hsiao C, Lin DS, Chow CY, Chang CJ, and Liao I : Imaging of zebrafish In Vivo with second harmonic generation reveals shortened sarcomeres associated with myopathy induced by statin, *PLoS One*, 2011, **6**, (9).
13. Dempsey WP, Hodas NO, Ponti A, and Pantazis P : Determination of the source of SHG verniers in zebrafish skeletal muscle.,” *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 18119.

14. Dombeck DA, Kasischke KA, Vishwasrao HD, Ingelsson M, Hyman BT, and Webb W : Uniform polarity microtubule assemblies imaged in native brain tissue by second-harmonic generation microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, **100**, (12), 7081–7086.
15. Fritzky L and Lagunoff D : Advanced methods in fluorescence microscopy, *Anal. Cell. Pathol. (Amst)*., 2013, **36**, (1–2), 5–17.
16. Burke K, Smid M, Dawes RP, Timmermans MA, Salzman P, Van Deurzen CMH, Beer DG, Foekens JA, Brown E : Using second harmonic generation to predict patient outcome in solid tumors, *BMC Cancer*, 2015, **15**, (1), p. 929.
17. Conklin MW, Eickhoff JC, Riching KM, Pehlke CA, Eliceiri KW, Provenzano PP, Friedl A, Keely PJ : Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma, *Am. J. Pathol.*, 2011, **178**, (3), 1221-1232.
18. Ralston E, Swaim B, Czapiiga M, Hwu WL, Chien Y, Pittis MG, Bembi B, Schwartz O, Plotz P, Raben N : Detection and Imaging of Non-Contractile Inclusions and Sarcomeric Anomalies in Skeletal Muscle by Second Harmonic Generation Combined with Two-Photon Excited Fluorescence, *J Struct Biol.*, 2008, **162**(3), 500–508.
19. Barad Y, Eisenberg H, Horowitz M, and Silberberg Y : Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation, *Appl. Phys. Lett.*, 1997, **70**, (8), 922.
20. Débarre D, Supatto W, Pena AM, Fabre A, Tordjmann T, Combettes L, Schanne-Klein MC, Beaurepaire E. : Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy, *Nat. Methods*, 2006, **3**, (1), 47–53.
21. Lim H, Sharoukhov D, Kassim I, Zhang Y, Salzer JL and Melendez-Vasquez CV : Label-free imaging of Schwann cell myelination by third harmonic generation microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2014, **111**, (50), 18025–18030.
22. Farrar MJ, Wise FW, Fetcho JR, Schaffer CB : In vivo imaging of myelin in the vertebrate central nervous system using third harmonic generation microscopy, *Biophys J.*, 2011, **100**, (5), 1362–1371.
23. Schwung S, Rogov A, Clarke G, Joulaud C, Magouroux T, Staedler D, Passemar S, Jüstel T, Badie L, Galez C, Wolf JP, Volkov Y, Prina-Mello A, Gerber-Lemaire S, Rytz D, Mugnier Y, Bonacina L and Le Dantec R : Nonlinear optical and magnetic properties of BiFeO₃ harmonic nanoparticles, *Journal of Applied Physics*, 2014, **116**, 114306.
24. Dubreil L, Leroux I, Ledevin M, Schleder C, Lagalice L, Lovo C, Fleurisson R, Passemar S, Kilin V, Gerber-Lemaire S, Colle MA, Bonacina L, Rouger K. : Multi-harmonic Imaging in the Second Near-Infrared Window of Nanoparticle-Labeled Stem Cells as a Monitoring Tool in Tissue Depth, *ACS Nano.*, 2017, **11**(7), 6672-6681.

25. Staedler D, Passemard S, Magouroux T, Rogov A, Maguire CM, Mohamed BM, Schwung S, Rytz D, Jüstel T, Hwu S, Mugnier Y, Le Dantec R, Volkov Y, Gerber-Lemaire S, Prina-Mello A, Bonacina L, Wolf JP : Cellular uptake and biocompatibility of bismuth ferrite harmonic advanced nanoparticles, *Nanomedicine*, 2015, **11**, (4), 815-24.
26. Rouger K, Larcher T, Dubreil L, Deschamps JY, Le Guiner C, Jouvion G, Delorme B, Lieubeau B, Carlus M, Fornasari B, Theret M, Orlando P, Ledevin M, Zuber C, Leroux I, Deleau S, Guigand L, Testault I, Le Rumeur E, Fiszman M, Chérel Y. : Systemic delivery of allogenic muscle stem cells induces long-term muscle repair and clinical efficacy in duchenne muscular dystrophy dogs., *Am J Pathol.* 2011, **179**, (5), 2501-18.
27. Lorant J, Saury C, Schleder C, Rodriguet F, Lieubeau B, Négroni E, Leroux I, Chabrand L, Viau S, Babarit C, Ledevin M, Dubreil L, Hamel A, Magot A, Thorin C, Guevel L, Delorme B, Péréon Y, Butler-Browne G, Péréon Y, Butler-Browne G, Mouly V, Rouger K : Skeletal muscle regenerative potential of human MuStem cells following transplantation into injured mice muscle, *Mol Ther*, 2017, October 18, 2017