

MICROSCOPIE UV

Mieux comprendre la dégénérescence tissulaire

avec la lumière ultraviolette

un photon + un photon = un photon

Les dégénérescences tissulaires apparaissent dans de nombreux stades précoces de pathologies. Mieux les appréhender permet de poser un diagnostic plus précoce. La répartition des fibres dans les tissus peut être mesurée en utilisant des méthodes de microscopie photonique optiques de pointe. Première technique : la fluorescence induite par excitation biphotonique et la microscopie de génération de seconde harmonique. Lorsque deux photons sont focalisés dans un femtovolume pendant un temps inférieur à la picoseconde, des phénomènes non-linéaires apparaissent : les deux photons peuvent s'additionner pour être absorbés par une molécule normalement excitable par un photon d'une énergie double. De plus, une diffusion non-linéaire avec des règles de sélection propres génère une harmonique secondaire (signal SHG).

Seconde technique utilisable : la microscopie de fluorescence dans la gamme des ultraviolets profonds (DUV) produits par rayonnement synchrotron.

Ces deux techniques ont été installées sur la ligne DISCO de SOLEIL afin de comparer les informations qu'elles apportent respectivement sur plusieurs types de tissus.

Queue de rat et foie de souris

Le tendon de queue de rat, très riche en collagène, est un bon exemple d'étude pour comparer la complémentarité d'informations obtenues par les deux techniques. On voit ainsi (figure 1) qu'il est possible d'imager rapidement le collagène fibrillaire, le collagène non

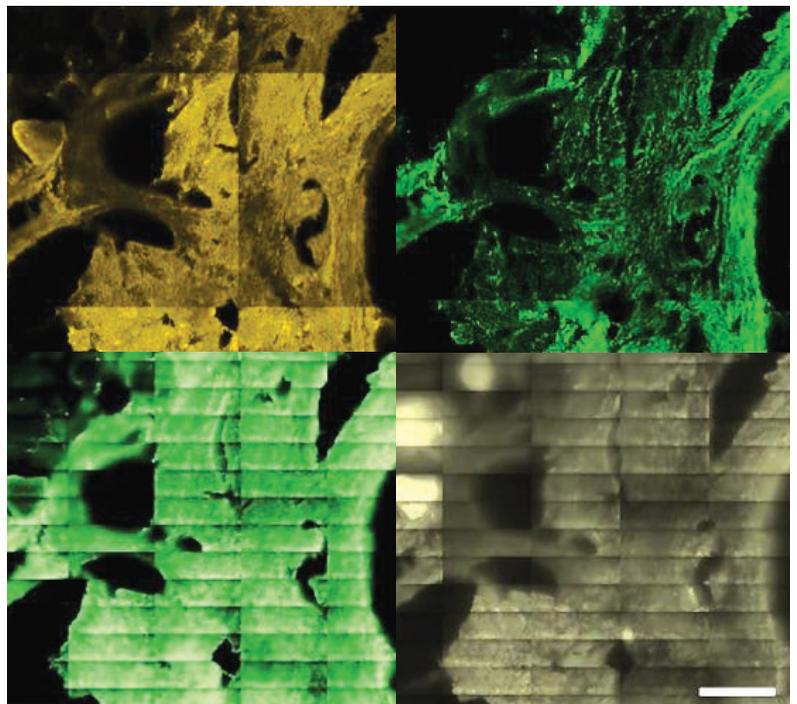


Figure 1. Tendon de queue de rat observé suivant différentes modalités d'imagerie UV sur DISCO (excitation biphotonique en haut et monophotonique en bas). Collagène fibrillaire (haut gauche). NADH et FAD (haut droite). Collagène, élastine et NADH (bas gauche). Collagène et acides aminés aromatiques (bas droite). La barre d'échelle est de 100 μm .

fibrillaire, les acides aminés aromatiques ainsi que le NADH et le FAD.

Après avoir mis au point la technique sur ce modèle d'étude il devenait intéressant de regarder son application sur un premier type de pathologie. Le Centre Hépatobiliaire de l'APHP (Kremlin Bicêtre), Université Paris Sud, INSERM, a préparé un modèle de

dégénérescence tissulaire chez la souris avec une gradation de la maladie, qui débute par une simple stéatose, évolue en stéatose hépatique non-alcoolique (NASH) puis en fibrose, et peut conduire à une cirrhose et finalement un hépatocarcinome.

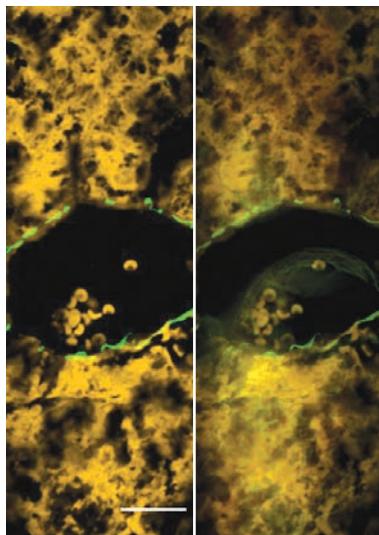


Figure 2. À gauche : les UV obtenus par excitation biphotonique sont spécifiques uniquement du collagène fibrillaire (en vert) et ne détectent pas le collagène non fibrillaire observable (à droite) en excitation monophotonique (en vert au centre).

Des techniques aux résultats complémentaires

La complémentarité des deux techniques devient évidente sur la figure 2 où le collagène non-fibrillaire qui supporte les hématies dans la veine n'est pas visible en excitation biphotonique. Grâce à cette dernière on peut donc imager aisément le collagène fibreux de type I et II mais on ne détecte pas les autres types de collagène. La technique monophotonique en UV profond met de son côté en évidence tous les types de collagène, sans discrimination. La combinaison de ses deux modalités de microscopie sur la même zone de tissu offre une meilleure vue d'ensemble des collagènes fibrillaires dans les pathologies.

La figure 3 confirme que le collagène observable en excitation SHG est surtout structurant, c'est-à-dire qu'il correspond principalement aux limites du tissu, à l'encadrement des veines (haut de la figure). En revanche, le collagène observable en excitation UV

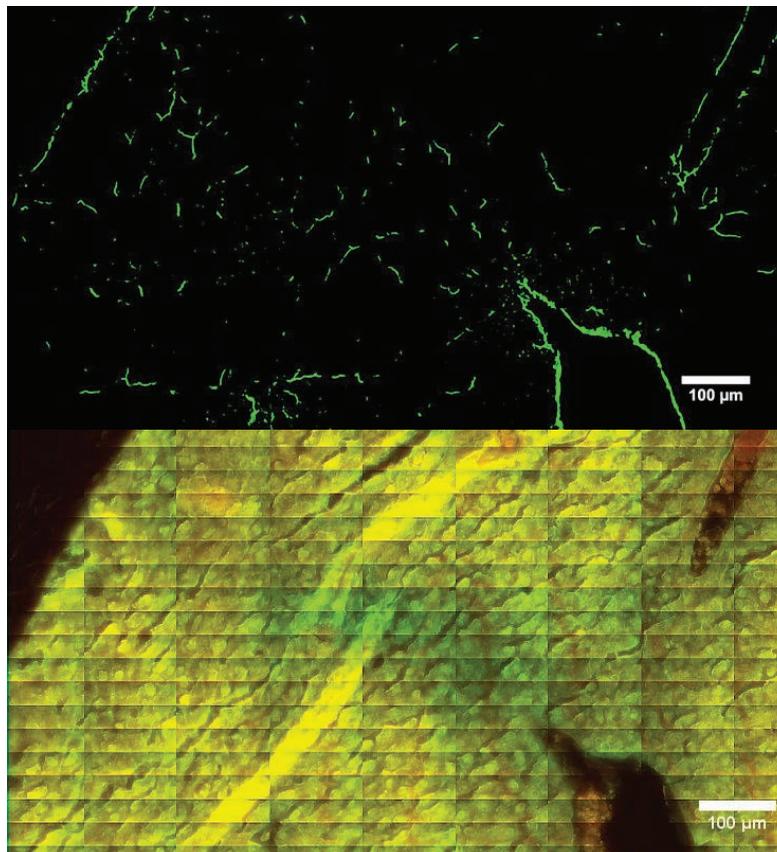


Figure 3. Tissu de souris NASH en excitation SHG (haut) et en excitation ultraviolette monophotonique (bas).

monophotonique n'est pas uniquement structurant, on peut donc relier la quantité de collagène mesurée dans chaque image au grade de la maladie. Il a ainsi été observé chez toutes les souris atteintes de NASH une augmentation du développement du collagène total.

Les résultats obtenus montrent que certains types de collagène du foie peuvent être quantifiés en utilisant la microscopie de génération de seconde harmonique (SHG). La microscopie DUV est moins spécifique que le SHG, cependant, elle permet de détecter toutes les protéines et plus de classes de collagène. Il est à noter que, à la connaissance des chercheurs impliqués, la combinaison de ces trois techniques est utilisée pour la première fois pour l'analyse histologique du foie. Une augmentation du développement du collagène a ainsi été observée dans le foie des souris NASH.

Au-delà de ces premiers résultats, cette combinaison de techniques peut facilement être utilisée sur d'autres pathologies que les maladies hépatiques, pathologies impliquant également une dégénérescence tissulaire.

→ **Contact:**
matthieu.refregiers@synchrotron-soleil.fr

Référence :
Zubkovs, V. et al.
Analyst, 139(11): 2663 (2014).