

L'IMAGERIE MULTIPHOTON DES PEAUX NATURELLES ET SYNTHÉTIQUES

Un nouvel outil pour l'évaluation des produits cosmétiques

Marie-Claire SCHANNE-KLEIN
Laboratoire d'Optique et
Biosciences, École polytechnique,
CNRS, Inserm, Université Paris-
Saclay, Palaiseau, France
marie-claire.schanne-klein@polytechnique.edu

Depuis l'article fondateur de W. Webb en 1990, la microscopie multiphoton s'est imposée comme l'outil de référence pour l'imagerie tridimensionnelle des tissus biologiques. Elle est particulièrement utile en cosmétique pour visualiser le réseau de fibres de collagène présent dans le derme, et commence à s'imposer comme un outil de référence pour tester des actifs *ex vivo* sur des peaux naturelles ou reconstruites.

La microscopie multiphoton, ou microscopie optique non-linéaire, est apparue au début des années 90 suite à l'article fondateur de W. Webb et de ses collaborateurs de l'université Cornell aux USA [1]. Cette technique a été développée comme une alternative à la microscopie confocale permettant d'améliorer l'imagerie en profondeur des tissus biologiques. En effet, la microscopie multiphoton est basée sur des processus optiques non-linéaires qui ne se produisent qu'au niveau du volume focal du microscope, là où l'intensité de la lumière est la plus forte. Cette localisation tridimensionnelle (3D) intrinsèque présente l'avantage d'être peu sensible à la diffusion et donc de faciliter la pénétration dans les tissus: d'une part, la lumière diffusée lors de l'excitation n'est pas assez intense pour créer un signal non-linéaire (contrairement à ce qui se passe en microscopie confocale où ces signaux parasites doivent être éliminés par un diaphragme); d'autre part, l'absence de diaphragme sur les voies de détection, alliée à une forte ouverture numérique de ces voies de détection, permet de détecter correctement les signaux diffusés. L'utilisation d'une excitation dans le rouge-proche infrarouge, typiquement 700-1200 nm, moins diffusée et absorbée que les excitations bleues

utilisées en microscopie classique, permet encore d'améliorer la profondeur de pénétration dans les tissus biologiques. Au final, la microscopie multiphoton permet d'imager un tissu tel que la peau jusqu'à une profondeur de quelques centaines de microns avec une résolution sub-micrométrique. Par ailleurs, c'est une technique globalement peu invasive car basée sur une excitation laser femtoseconde de forte puissance crête, mais de puissance moyenne modérée (en général un laser titane-saphir).

Un deuxième avantage décisif de la microscopie multiphoton est son caractère multimodal: il est possible de détecter l'ensemble des signaux optiques non-linéaires connus des physiciens et pas uniquement la fluorescence excitée à 2 photons. De plus, ces différents signaux peuvent être émis par des éléments constitutifs des tissus et non par des colorants ou des protéines fluorescentes ajoutés artificiellement [2]. Il est alors possible d'imager en profondeur un tissu intact, sans coloration, en visualisant de manière spécifique ses diverses composantes. Cette forte spécificité est un avantage décisif de la microscopie multiphoton par rapport aux autres techniques optiques d'imagerie 3D. Ces dernières, telles que la microscopie confocale de réflectance ou la

tomographie optique cohérente, sont moins complexes et coûteuses et tout aussi peu invasives que la microscopie multiphoton, mais néanmoins pas ou peu spécifiques. Ce sont les divers signaux multiphoton endogènes de la peau et l'intérêt de leur visualisation dans le cadre de la cosmétique qui sont présentés dans la suite de cet article.

Imagerie multiphoton sans marquage de la peau

Que veut-on visualiser dans la peau ?

Un schéma simplifié de l'anatomie de la peau est présenté à la *figure 1*. L'épiderme est constitué de couches de cellules, essentiellement des kératinocytes qui

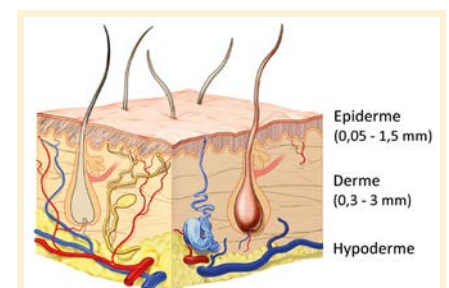


Figure 1. Schéma de la structure de la peau (adapté de dermnetnz.org).

synthétisent la kératine, une protéine fibreuse qui confère à la peau ses propriétés d'imperméabilité et de protection contre les agressions extérieures. D'autres cellules, les mélanocytes, synthétisent la mélanine responsable de la couleur de la peau. Plus en profondeur se situe le derme, constitué majoritairement de fibres de collagène et de fibres élastiques, avec peu de cellules. C'est lui qui confère à la peau ses propriétés mécaniques. C'est aussi lui qui est le plus touché lors du vieillissement, en raison notamment de la diminution de la densité de collagène et d'élastine, et de leurs modifications structurelles. Enfin, la partie la plus profonde de la peau est constituée d'un tissu adipeux, l'hypoderme.

Des peaux reconstruites sont aussi utilisées en cosmétique pour tester les divers actifs. Il s'agit de substituts tissulaires soit de peau complète, soit de derme ou d'épiderme. Les substituts de derme sont basés sur différents types de matrices de collagène dans lesquelles sont ensemencées des cellules extraites de peaux humaines. Sur ces dermes reconstruits peuvent être cultivés des kératinocytes, là aussi extraits de peaux humaines, afin d'obtenir une peau complète dont la structure est la plus proche possible de la peau humaine. La caractérisation de ces substituts tissulaires et de l'effet d'actifs sur leur structure est un enjeu tout aussi important en cosmétique que celui de la visualisation de la peau naturelle.

Les signaux de fluorescence des chromophores cellulaires, de la kératine et de l'élastine

Trois types de chromophores sont présents naturellement dans la peau et peuvent être imagés par fluorescence excitée à 2 photons (2PEF) comme le montre la *figure 2*. Tout d'abord, les chromophores présents dans le cytoplasme cellulaire (NAD(P)H, FAD...) permettent de visualiser les diverses couches de cellules de l'épiderme ou les cellules présentes dans le derme. Un signal de fluorescence est aussi obtenu au niveau de la kératine présente dans l'épiderme et des fibres élastiques présentes dans le derme. Il faut noter que les divers types de mélanine absorbent la lumière visible et proche infrarouge, mais n'émettent quasiment pas de fluorescence. Il est cependant possible d'imager spécifiquement la mélanine par imagerie pompe-sonde, mais cette technique reste encore peu développée [3].

Ces signaux 2PEF donnent donc une image morphologique de la peau, notamment de l'épiderme. Mais on peut aussi obtenir des informations sur l'activité des cellules en étudiant plus précisément le signal 2PEF du NAD(P)H, impliqué dans le métabolisme cellulaire. On peut ainsi mesurer le rapport des signaux 2PEF du NAD(P)H et du FAD (excités et détectés à des longueurs d'onde différentes) ou la durée de vie de fluorescence du NAD(P)H, qui varient avec l'état redox des cellules, et donc avec leur activité métabolique. Ceci permet une imagerie dite métabolique de la peau ou de substituts d'épiderme, très intéressante pour évaluer l'état de différenciation des différentes couches cellulaires par exemple.

Les signaux de génération de second harmonique du collagène

La microscopie de génération de second harmonique (SHG) est devenue aujourd'hui la technique de référence pour imager les fibres de collagène

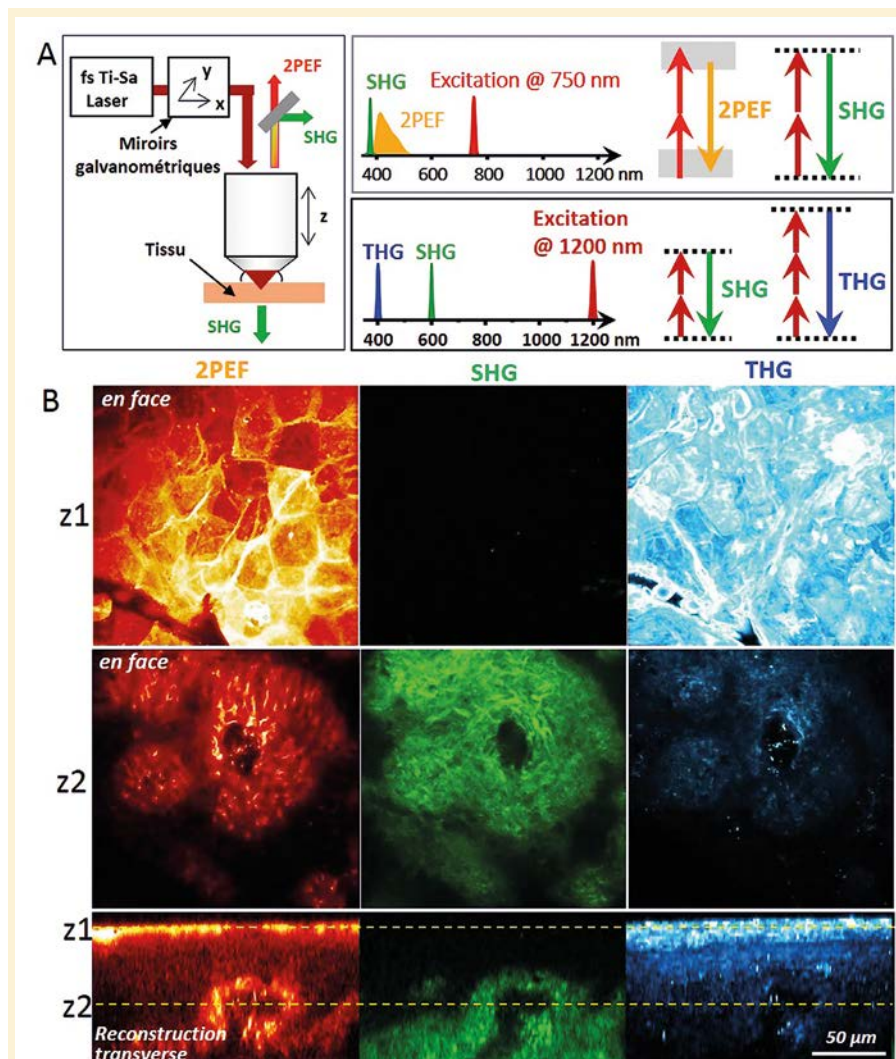


Figure 2. Imagerie multiphoton d'une biopsie de peau humaine non marquée. (A) Schémas de principe de la microscopie multiphoton. (B) Images « en face » 2PEF (cellules, fibres élastiques), SHG (collagène) et THG (morphologie cellulaire, lipides) à diverses profondeurs, et reconstruction d'une coupe optique transverse. (Images réalisées au LOB, CNRS, École polytechnique, Inserm, par E. Beaufrepire et M.-C. Schanne-Klein.)

à l'échelle micrométrique, en raison de sa forte spécificité et de son excellent contraste. Ces avantages sont directement liés à l'origine physique du signal SHG dans les tissus biologiques. À l'échelle moléculaire, le signal SHG est généré par les liaisons peptidiques qui présentent des électrons délocalisés dans un environnement non centro-symétrique, élément essentiel pour obtenir un signal SHG. Ces liaisons peptidiques constituent le squelette de toutes les protéines, mais seule une protéine de structure fibrillaire comme le collagène permet de conserver la non centro-symétrie à l'échelle micrométrique. La forte densité des fibres de collagène permet de plus d'obtenir un signal SHG relativement important et donc de détecter des fibrilles de collagène d'un diamètre aussi petit que 30 nm [4] !

L'imagerie SHG est ainsi de plus en plus utilisée pour imager l'organisation 3D des fibres de collagène dans le derme de peaux naturelles ou reconstruites (*figure 2*). L'analyse des images est alors une étape critique pour accéder à des paramètres de structure quantitatifs et pouvoir comparer divers échantillons. Ceci nécessite encore des développements, notamment pour réaliser une véritable analyse 3D [5]. Par ailleurs, il est possible d'effectuer une analyse polarimétrique des signaux SHG et d'accéder ainsi plus précisément à la direction des fibres de collagène. Ces images SHG résolues en polarisation permettent de plus d'évaluer le degré d'organisation des fibres de collagène dans le volume focal, c'est-à-dire à l'échelle micrométrique, ce degré d'organisation pouvant varier lors de pathologies.

Les signaux de génération de troisième harmonique des couches lipidiques et des interfaces cellulaires

La génération de troisième harmonique (THG) est un processus présent dans tous les matériaux sans condition sur leur symétrie, mais il s'annule en régime focalisé à cause du glissement de phase du champ exciteur au point

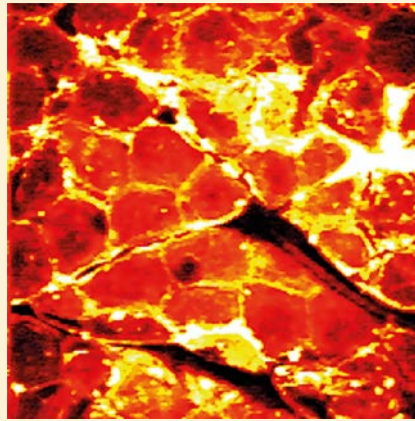


Figure 3. Image SRS de peau de souris intacte (fraichement excisée, sans coloration) acquise à la vibration d'élongation des liaisons CH₂. L'organisation des cellules de l'épiderme est clairement visible grâce aux signaux des structures riches en lipides. Taille de l'image: environ 200 × 200 µm. (Adapté de: <https://bernstein.harvard.edu/research/SRS.htm>.)

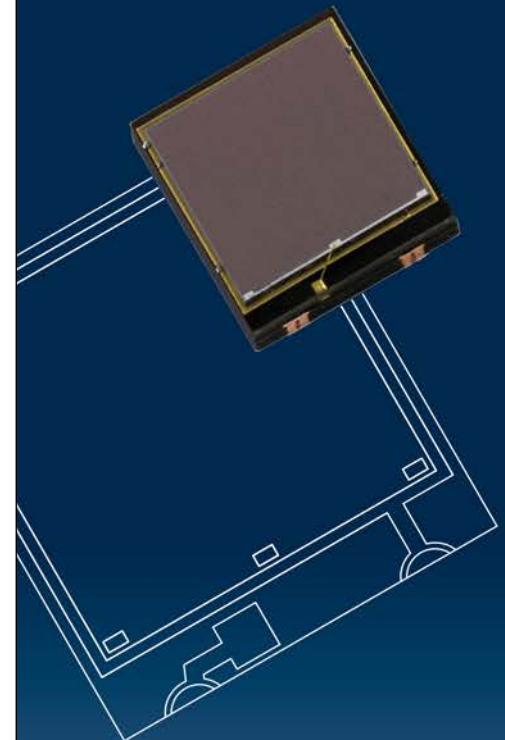
focal. Cette phase, dite de Gouy, crée des interférences destructives entre les signaux provenant des zones avant et après le plan focal, sauf si le matériau est hétérogène à l'échelle du volume focal. La microscopie THG permet donc de visualiser toutes les hétérogénéités optiques de taille micrométrique dans les tissus: interfaces cellulaires, vésicules lipidiques [6]... Il s'agit d'une imagerie morphologique, assez proche en pratique de l'OCT, qui permet de visualiser principalement les couches lipidiques et les contours des cellules de l'épiderme (*figure 2*). De plus, comme en SHG, la microscopie THG résolue en polarisation permet d'imager la direction principale et le degré de désordre de ces couches lipidiques [7].

Les signaux Raman non-linéaires des lipides

Il est aussi possible de détecter des signaux de diffusion Raman stimulée (ou SRS) ou de diffusion Raman anti-Stokes cohérente (ou CARS), dont l'intérêt est de permettre une cartographie chimique sans aucun marquage. En raison de la faiblesse de ces signaux, ce sont les lipides qui sont principalement détectés, comme en THG, ce qui permet de cartographier les couches cellulaires les plus externes

Obtenir le meilleur de l'innovation, c'est notre métier.

Nos photomultiplicateurs en silicium sont ultrasensibles, petits, rapides et remplacent efficacement les photomultiplicateurs classiques utilisant un tube à électrons.



de l'épiderme [8]. La *figure 3* présente une image de peau de souris obtenue par microscopie SRS.

L'avantage de ces divers modes de contraste est qu'ils peuvent être combinés facilement (du moins 2PEF, SHG et THG), pour réaliser une imagerie multimodale des différentes composantes de la peau (*figure 2*).

Les systèmes multiphoton commerciaux et les perspectives de développement

Les microscopes commerciaux

Un seul système multiphoton est autorisé en Europe pour l'imagerie *in vivo* de la peau. Il s'agit du MPTFlex de Jenlab, entreprise créée par K. König qui a été l'un des précurseurs de l'imagerie multiphoton de la peau [9]. Ce microscope comprend un bras articulé qui facilite l'accès aux diverses zones corporelles, et un système aimanté pour immobiliser l'objectif sur la peau. Il offre deux canaux de détection pour imager simultanément SHG (collagène) et 2PEF (cellules, élastine), et éventuellement des modules de durée de vie de fluorescence et de diffusion Raman anti-Stokes cohérente.

Des microscopes multiphoton d'usage général sont par ailleurs disponibles commercialement auprès de nombreux fournisseurs. Ces systèmes ne sont pas autorisés *in vivo*, mais ils sont dans l'ensemble plus performants en termes de sensibilité et de variété de modes de contraste que le microscope de Jenlab et donc plus adaptés pour des études *ex vivo* ou pour la caractérisation de peaux reconstruites et le test de divers actifs.

Les développements technologiques en cours

Diverses équipes académiques mènent des recherches pour améliorer l'imagerie multiphoton de la peau. Il s'agit tout d'abord d'améliorer l'ergonomie de ces systèmes par le développement

de fibroscopes ou d'endoscopes flexibles, ce qui nécessite de pré-compenser ou limiter la dispersion des impulsions femtoseconde dans les fibres utilisées. Mais il s'agit surtout d'améliorer la profondeur de pénétration dans la peau, limitée essentiellement par la diffusion et les aberrations introduites par le tissu. Pour cela, des dispositifs d'optique adaptative sont développés pour pré-compenser les aberrations et conserver une bonne résolution en profondeur. De plus est étudiée l'application d'actifs qui limitent la diffusion en homogénéisant l'indice de réfraction du tissu (clarification optique), la principale difficulté étant de limiter la toxicité de ces actifs pour l'imagerie *in vivo* et de s'assurer qu'ils ne perturbent pas la structure du tissu.

Plus généralement, la microscopie multiphoton est toujours un domaine en fort développement, que ce soit au niveau des sources laser d'excitation, des modes de contrastes (mélange de fréquences...) et de son intégration avec divers outils de manipulation des tissus. Par exemple, la microscopie multiphoton a été utilisée récemment pour suivre la réorganisation du réseau

de collagène lors de mesures de force sur une peau *ex vivo* en traction [10] afin d'accéder aux propriétés biomécaniques multiéchelles de la peau, essentielles en cosmétique.

Conclusion

En conclusion, la microscopie multiphoton est un outil puissant pour visualiser l'architecture 3D de la peau à l'échelle micrométrique. Son principal avantage est d'offrir une grande spécificité pour diverses composantes essentielles de la peau, et ceci sans aucun marquage. En particulier, le signal SHG intrinsèque du collagène permet une imagerie très performante du derme, bien supérieure à celle obtenue par d'autres techniques. La microscopie multiphoton apparaît donc comme un outil de pointe en cosmétique, malgré son coût et sa complexité. Si elle est pour l'instant limitée essentiellement aux tests d'actifs *ex vivo*, gageons qu'elle sera associée dans un avenir proche au diagnostic *in vivo* du vieillissement cutané en cosmétique et à des caractérisations ou diagnostics de diverses pathologies en dermatologie.

POUR EN SAVOIR PLUS

- [1] Denk, W., Strickler, J.H. & Webb, W.W. Two-photon laser scanning microscopy. *Science* **248**, 73-76 (1990)
- [2] Zipfel, W.R. et al. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 7075-7080 (2003)
- [3] Fischer, M.C., Wilson, J.W., Robles, F.E. & Warren, W.S. Invited Review Article: Pump-probe microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* **87**, 031101 (2016)
- [4] Bancelin, S. et al. Determination of collagen fibril size via absolute measurements of second-harmonic generation signals. *Nat. Commun.* **5**, 4920 (2014)
- [5] Decenciere, E. et al. Automatic 3D segmentation of multiphoton images: a key step for the quantification of human skin. *Skin Res. Technol.* **19**, 115 (2013)
- [6] Débarre, D. et al. Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy. *Nat. Methods* **3**, 47 (2006)
- [7] Zimmerley, M., Mahou, P., Debarre, D., Schanne-Klein, M.-C. & Beaufort, E. Probing ordered lipid assemblies with polarized third-harmonic-generation microscopy. *Phys. Rev. X* **3**, 011002 (2013)
- [8] Drutis, D.M. et al. Three-dimensional chemical imaging of skin using stimulated Raman scattering microscopy. *J. Biomed. Opt.* **19**, 111604 (2014)
- [9] König, K. & Riemann, I. High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution. *Journal of Biomedical Optics* **8**, 432 (2003)
- [10] Bancelin, S. et al. Ex vivo multiscale quantitation of skin biomechanics in wild-type and genetically-modified mice using multiphoton microscopy. *Sci. Rep.* **5**, 17635 (2015)